

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Istraživanje patogeneze tularemije na modelu miša te unutarstaničnog života <i>Mycobacterium bovis</i> , soj BCG, u B limfocitima		
Trajanje projekta	01.01.2013. – 31.12.2016.		
Ključne riječi (najviše do 5)	<i>Francisella</i> , <i>Mycobacterium</i> , patogeneza, B limfociti		
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Bakterije roda <i>Francisella</i>, gram negativni su, fakultativno unutarstanični patogeni, uzročnici tularemije ljudi i životinja. <i>Francisella tularensis</i> najčešći je uzročnik tularemije u ljudi, dok <i>F. novicida</i>, iako genetski vrlo slična, ne uzrokuje infekciju u imunokompetentnih osoba međutim virulentna je za miševce. Stoga je model infekcije miševa sa <i>F. novicida</i> prikladan za istraživanje virulentnih čimbenika <i>F. tularensis</i> te same patogeneze tularemije. Ključnu ulogu u preživljavanju francizele i razvojnom tijeku bolesti imaju fagocitne stanice. Skupina gena unutar <i>Francisella</i> patogenog otoka omogućuje joj preživljavanje unutar fagosoma, ranog i kasnog endosoma makrofaga te izlazak i replikaciju u citosolu. Cilj predloženog istraživanja je otkriti gene odgovorne za procesuiranje unutar <i>Francisella</i>-fagosoma, u endosomsko-lizosomskom putu degradacije, te patogenezu tularemije u miša. Naši preliminarni rezultati u suradnji s grupom prof. dr. sc. Y. Abu Kwaika pokazuju da 202 od 2500 ispitivanih gena ima važnu ulogu u razmnožavanju <i>F. novicida</i> u humanim makrofagima. Stoga ćemo za ispitivanje čimbenika virulencije koristiti transpozon-insercijske izogene mutante <i>F. novicida</i>: FTN_1319, FTN_0759, FTN_0768, FTN_1172, FTN_0556, FTN_1624, FTN_1457, FTN_0038. Na <i>in vitro</i> modelu, nastojat ćemo objasniti molekularnu i staničnu osnovu interakcije <i>Francisella</i>-stanica domaćina (humani makrofazi-U937 i <i>Acanthamoeba castellanii</i>), te			

	opisati čimbenike virulencije koji su važni u interakciji bakterije i stanice domaćina. Pratit ćemo unutarstanično razmnožavanje te prijanjanje na stanicu domaćina, a za određivanje unutarstaničnog procesuiranja tvari koristit ćemo se različitim ranim/kasnim endosomskim biljezima. Promjenu ultrastrukture inficiranih stanica pratit ćemo uz pomoć transmisijskog elektronskog mikroskopa. Najveći dio pokusa provest će se na staničnom modelu infekcije. Mutante za koje se utvrdi da imaju promjene u biogenezi fagosoma i virulenciji <i>F. novicida</i> (<i>in vitro</i>), dodatno ćemo ispitati na životinjskom modelu i pri tome posebno pratiti ulogu pojedinih citokina. Na životinjskom modelu infekcije planiramo ispitati najviše dvije mutante. U <i>in vivo</i> modelu infekcije koristit će se BALB/c miševi. Nakon infekcije pratit će se ukupan broj bakterija u jetri, slezeni i plućima te patohistološke promjene. Za praćenje imunološkog odgovora analizirat će se sljedeći citokini i kemokini: IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IP-10, monocitni kemotaktični protein-1 i makrofagni upalni protein (MIP)-1 beta. Prijašnji rezultati pokazuju da mnogi unutarstanični patogeni kao što su: <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Chlamydia trachomatis</i>, <i>Brucella abortus</i> te <i>F. tularensis</i>, inficiraju primarne B stanice i stanične linije mišjeg i humanog porijekla. B stanice su antigen prezentirajuće stanice te aktivno sudjeluju u imunološkom odgovoru na bakterijsku infekciju, prepoznajući antigene na površini bakterijske stanice, a također i proteine koje izlučuje sama bakterija. Također, dokazano je i da različiti podtipovi B stanica sisavaca pokazuju sposobnost fagocitoze. Prema istraživanjima, 14-17 % B-1a stanica, 8.6-11.4 % B-1b i manje od 1.5 % B-2 B stanica u peritonealnoj šupljini pokazuje fagocitnu aktivnost. Naša dosadašnja istraživanja pokazuju da <i>F. tularensis</i> inficira mišje primarne B limfocite, te mišje i humane B-stanične linije (5-10 % stanične populacije). Nadalje, <i>in vitro</i> istraživanja pokazuju da su B1-b i B-2 peritonealne stanice inficirane u manjem postotku nego B-1a stanice. Također, BCR (receptor na B stanicama, <i>engl.</i> B cell receptor) na B-1a stanicama dostatan je za ulazak bakterije
--	---

	u stanicu, dok je kod B1-b i B-2 stanica važna interakcija BCR sa koreceptorom CR1/2. Za razliku od toga, <i>in vivo</i> model ukazuje isključivo na infekciju B-1a stanica ubrzo nakon intraperitonealne infekcije s <i>F. tularensis</i>. Slične karakteristike s francizelom dijeli još jedna unutarstanična bakterija, <i>Mycobacterium bovis</i>. <i>Mycobacterium bovis</i>, soj BCG, može inficirati različite populacije fagocitnih te ne-fagocitnih stanica, uključujući B stanice. Nedovoljno je istražen ulazak, preživljavanje i širenje <i>M. bovis</i> unutar B stanica. Stoga ćemo, u okviru planiranog istraživanja pokušati razjasniti ulogu B stanica u ranoj fazi infekcije s <i>M. bovis</i>, soj BCG. Konfokalnom i elektronskom mikroskopijom pratit će se životni ciklus <i>M. bovis</i>, BCG soj, unutar B stanica.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Opis virulentnih čimbenika <i>F. novicida</i> i patogeneza same infekcije uvelike doprinose razumijevanju patogeneze tularemije u ljudi, koje se mogu primijeniti u daljnjim pripremama cijepljiva, budući da ne postoji licencirano cjepivo za tularemiju. Isto tako, razlučivanje nepoznanica oko uloge B stanica u ranoj fazi razvoja infekcije <i>Mycobacterium bovis</i>, razlučivanje receptora bitnih za ulazak bacila u stanicu, te razumijevanje umnožavanja i širenja unutar stanice, od ključnih su čimbenika za kontrolu, prevenciju i razvoj terapije tuberkuloze.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti BALB/c miševi. Za potrebe pokusa potrebno je otprilike 55 miševa.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Kod miševa inficiranih intradermalno mutantama <i>F. novicida</i>, s obzirom na mali broj bakterija u inokulumu (50 bakterija po mišu), može doći do umjerene promjene općeg stanja životinje, te slabljenja. Miševi će u krajnjim točkama mjerenja (2, 24, 48 i 72 h) biti propisno žrtvovani, radi uzimanja uzoraka organa za daljnju analizu. Skupina miševa koja će biti inficirana intraperitonealno s <i>M. bovis</i>, BCG sojem, neće osjetiti više od prolazne blage nelagode prilikom injiciranja. Intraperitonealna infekcija neće utjecati na promjenu zdravstvenog stanja životinja, niti će životinje osjećati bol, stoga se pokus može okarakterizirati kao blag. Pokus završava usmrćivanjem životinja u krajnjim točkama istraživanja (10 minuta, 2 i 24 sata) a radi uzimanja stanica B limfocita. Uoči li se teža

	promjena općeg stanja i patnja u pojedinim jedinki, iste će biti usmrćene na human način.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	U do sada objavljenim istraživanjima navodi se važnost mišjeg modela infekcije u istraživanju imunološkog odgovora na infekciju, koji je uvjetovan različitim čimbenicima (mjesto infekcije, virulencija soja, genetske osnove domaćina). Osim toga, opisane razlike u rezultatima dobivenim na ispitivanju unutarstanične patogeneze <i>F. tularensis</i> na <i>in vivo</i> modelu te <i>in vitro</i> na staničnim linijama mišjeg i humanog porijekla (A20 i Ramos) ukazuju na važnost korištenja životinjskog modela radi vjerodostojnosti rezultata.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Najveći broj istraživanja provest će se <i>in vitro</i> (na staničnoj liniji humanih makrofaga- U937 te stanicama ameba). One mutante <i>F. novicida</i> za koje se utvrdi da imaju promjene u biogenezi fagosoma i virulenciji <i>F. novicida in vitro</i>, ispitat će se dodatno na životinjskom modelu infekcije. Na životinjskom modelu infekcije planiramo ispitati najviše dvije mutante. Ukupan broj životinja nastojati će se smanjiti provođenjem mjerenja samo u ključnim točkama istraživanja, tamo gdje se očekuje značajan ishod rezultata.
3. Poboljšanje Objasnite izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasnite opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	BAI.B/c miševi uobičajeno se primjenjuju kao životinjski model istraživanja patogeneze bakterijskih infekcija. U već publiciranim radovima navodi se važnost mišjeg modela infekcije u istraživanju imunološkog odgovora, koji je uvjetovan različitim čimbenicima (mjesto infekcije, virulencija soja i genetske osnove domaćina). Također, u našim istraživanjima koristili smo BALB/c miševe, te je na izoliranim primarnim B-1 i B-2 limfocitima uspostavljen model za istraživanje interakcije sa <i>F. tularensis</i>. Nadalje, u istraživanjima imunološkog odgovora na infekciju <i>Mycobacterium</i> također su korišteni BALB/c miševi. Uz adekvatan smještaj i njegu, prije i tijekom pokusa, tjeskoba kod životinja nastojati će se maksimalno smanjiti, kao i stres prouzročen samom aplikacijom i pregledom životinja. Sve fiziološke potrebe životinja bit će zadovoljene, a okoliš strukturno oplemenjen postavljanjem kartonskih tunela i pregrada. Životinje će se svakodnevno promatrati, a uoči li se bilo kakva promjena općeg stanja, bit će usmrćeni na human način.