

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Signalni put koštanih morfogogenetskih proteina u upalnim i malignim bolestima crijeva		
Trajanje projekta	12.3.2014.-31.12.2017. * Pokusi koji uključuju laboratorijske životinje provode se od 1.3. 2017. do 31.12.2017. god., odnosno od datuma izdavanja odobrenja ukoliko bude izdano poslije 1.3.2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Upalna bolest crijeva, Koštani morfogogenetski proteini, Osteoporoza		
	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)
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Upalna bolest crijeva, UBC (engl. inflammatory bowel disease, IBD) uključuje dva glavna klinička i patohistološka oblika. Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. UBC je kronična upala probavnog sustava za sada nedovoljno razjašnjenog uzroka, a za koju se pokazalo da je činitelj rizika nastanka karcinoma debelog crijeva. Incidencija UBC i karcinoma debelog crijeva je u stalnom porastu. Koštani morfogogenetski proteini (engl. bone morphogenetic proteins, BMPs) su multifunkcionalni citokini prvotno izolirani iz kosti na osnovi svojega osteoinduktivnog svojstva. BMP-i imaju važnu ulogu u razvoju i oporavku skeletnih i neskeletnih tkiva. Jedna od dugoročnih komplikacija UBC je osteoporoza, a posljedica je osnovne bolesti i/ili primjene terapije osobito glukokortikoida. Patogeneza osteoporoze u UBC nije u potpunosti poznata. Stoga, u projektu ćemo istražiti aktivnost signalnog puta BMP-a u kolorektalnom karcinomu i pokusnom modelu upalne bolesti crijeva analizom izražaja Smad1/5/8 molekule te ispitati učinak primjene kortikosteroida odnosno BMP7 proteina na aktivnost ovoga signalnog puta u UBC. Dodatno ćemo istražiti ulogu molekula RANK/RANKL/OPG sustava u modelu upalne bolesti crijeva te njihovu povezanost sa gubitkom koštane mase tijekom bolesti. Kako se vrlo malo pokusa ove vrste može lako i etički provesti na ljudima u ovom istraživanju koristit će se model kemijski induciranog kolitisa, TNBS kolitis, u štakora koji po svojoj patofiziologiji i kliničkoj slici nalikuje Crohnovoj bolesti u ljudi.		
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).	UBC postaje veliki javnozdravstveni problem jer incidencija ove bolesti je u stalnom porastu osobito u zemljama sa zapadnjačkim načinom života i prehrane. Zbog toga je od izuzetne važnosti rasvijetliti molekularne mehanizme koji su uključeni u patogenezu UBC i njenih komplikacija kako bi se mogla bolje razumjeti etiologija ove bolesti, a time i uspješnije razviti nove terapijske protokole. Poznavanje molekularnih mehanizama tijekom akutnog i kroničnog oblika bolesti može imati, također, važne implikacije u razumijevanju, a posljedično i u liječenju karcinoma debelog crijeva. Rezultati ovih		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	istraživanja dovest će do boljeg razumijevanja uloge BMP-a u UBC i osteoporozi kao jednoj od komplikacija bolesti te u razvijanju novih terapijskih postupaka. Očekujemo da će ovaj projekt pozitivno utjecati na razvoj temeljnih biomedicinskih istraživanja i obrazovanje mladih istraživača na Sveučilištu u Rijeci.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti	U istraživanju koristit će se laboratorijski štakori, soja Sprague Dawley, ukupno 138 životinja.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna i očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Tijekom izvođenja pokusa, pri indukciji TNBS kolitisa štakorima će biti administrirana opća anestezija pri intrarektalnoj aplikaciji TNBS/etanol klizine kako bi se prolazna nelagodu i stres sveli na najmanju razinu. U tu svrhu koristit će se kombinacija ketamin/ksilazin anestetika (doze 100 mg/kg ketamina; Xylapan, 5 mg/kg) sukladno Protokolu za anesteziju i analgeziju kojeg propisuje Institutional Animal Care and Use Committee IACUC (http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/Rat%20Anesthesia-analgesia%20Formulary.doc). Za provođenje terapijskih protokola, životinje će biti tretirane deksumetazonom ili fiziološkom otopinom u obliku supkutane injekcije, BMP7 proteinom ili puferom i v u repnu venu. Ne očekuje se da će životinje osjetiti više od prolazne nelagode ubodom igle propisane veličine prilikom injiciranja (igla 23G), te se neće anestezirati prilikom ovoga postupka. Ukoliko se uoči neočekivana promjena u smislu pretjeranog gubitka mase ili promjene u ponašanju, životinja će biti izuzeta iz pokusa, te će se primijeniti humana krajnja točka u svrhu uklanjanja daljnje patnje. U pokusnom modelu TNBS kolitisa očekivana kategorija težine postupka se mijenja sukladno razvoju bolesti u rasponu od blage do umjerene. Štakori će se eutanizirati na način da se anesteziraju kombinacijom anestetika (ketamin/ksilazin), a potom iskrvare intrakardijalnom punkcijom prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Uzorkovanje ciljnih organa i tkiva za daljnje analize bit će izvedeno <i>post mortem</i>.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Za ostvarenje svih predloženih ciljeva ovom projektu ne postoje znanstveno prihvatljive alternativne metode opisane u literaturi koje ne uključuju pokusne životinje. UBC je složen patološki proces praćen sa mnogestrukim promjenama u različitim organima s velikim brojem simptoma te se za sada ne mogu proučavati na staničnim kulturama i linijama. Istraživanja signalnih putova uključenih u patogenezu UBC te praćenje i učinak novih terapijskih pristupa u liječenju bolesti nije moguće provesti na modelima koji bi isključili korištenje životinja jer ne mogu dati cjelovit uvid u funkcioniranje cijelog organizma.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	Na temelju prethodnih istraživanja, statističkih analiza te preciznog dizajna pokusa, broj štakora koji se planira koristiti u pokusima sveden je na minimalnu razinu s obzirom na količinu raspoloživog tkiva.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

3. Pohuljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje	Životinjski modeli UBC predstavljaju uobičajeni pristup izučavanju patogeneze i drugih kompleksnosti UBC u ljudi. Za ostvarivanje ciljeva predloženog projekta izabrani su štakori soja Sprague Dawley jer razvijaju kolitis u 98-100% slučajeva, imaju nisku agresivnost i normalnu gustoću kosti te su zbog toga pogodni za predviđena istraživanja. Značajna homologija je potvrđena usporednom endoskopskog nalaza crijeva štakora u TNBS kolitisu i UBC u ljudi kao i ekspresiji gena osobito na razini bioloških signalnih putova. Ovim modelom je osiguran razvoj bolesti s najmanjim posljedicama za životinje te niska stopa smrtnosti uz visok stupanj reproducibilnosti. Prilikom smještanja životinja u kaveze vodi se računa o fiziološkim i etološkim potrebama životinje/grupe životinja i osigurava im se optimalni životni prostor pritom vodeći računa o njihovoj dobrobiti uvažavajući propise i smjernice iz suvremene prakse u radu sa laboratorijskim životinjama. Životinjama će se omogućiti dovoljno velik (najviše 3 štakora u kavezni) i sadržajan prostor, pri čemu životinje mogu iskazati raspon svojeg uobičajenog ponašanja, a da to ne ugrožava očekivani ishod istraživanja. Svakodnevno će se provoditi nadzor i kontrola navedenih uvjeta te će se redovito vršiti higijena prostora i kaveza. U cilju osiguranja najmanjeg stupnja nelagode, stresa i patnje kod pokusnih životinja, svi postupci sa životinjama će se izvoditi na način da se svedu na minimalnu razinu, a brigu i nadzor o njima provodit će stručno osposobljeno osoblje. Na kraju pokusa štakori će biti eutanazirani u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)
---	---

