

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Preuređivanje memorije: Manipuliranje T-staničnom memorijom u svrhu unapređenja učinkovitosti cjepiva		
Trajanje projekta	48 mjeseci		
Ključne riječi (najviše do 5)	T stanice, memorija, signaliranje, afinitet		
	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 dohrobiti 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)	U ovom projektu istraživat ćemo utjecaj intenziteta aktivacije T staničnog receptora na stvaranje memorije putem transkripcijskog faktora Eomesa. Ovo je temeljno istraživanje koje će nam pružiti uvid u proces nastanka imunološke memorije.		
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).	U znanstvenom smislu, ovaj projekt omogućit će razumijevanje molekularnih mehanizama putem kojih razlike u intenzitetu aktivacije T staničnog receptora utječu na formiranje imunološke memorije. Osim toga, ovaj projekt ima za svrhu i unapređenje učinkovitosti cjepiva. Manipulacijom imunološkog odgovora prilikom cijepljenja možemo poboljšati samu imunost te omogućiti prepoznavanje šireg spektra patogena. Na taj način omogućili bi i prepoznavanje više različitih (mutiranih) formi istog patogena.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju namjeravamo koristiti C57BL/6 miševe divljeg soja kao i genetički modificirane sojeve dobivene genetičkim preinačavanjem C57BL/6; mišjeg soja. Broj laboratorijski miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom navedenog perioda je 1600 (400 miševa godišnje).		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Kako je opisano u dokumentu: "Obrazac 2", koristit ćemo različite metode kako bi postigli specifične ciljeve istraživanja. Miševe ćemo krizati te također izolirati tkiva i organe nakon njihova usmrćivanja. Namjeravamo i adoptivnim transferom specifične imunološke stanice		

	prenijeti u miševe primatelje kako bi analizirali ponašanje stanica imunološkog sustava u kontroliranim (in genetički preinačenim) uvjetima. Osim toga, namjeravamo inficirati miševe s mCMVom ili LCMVom kako bi istražili odgovor stanica imunološkog sustava na infekciju kao i na stvaranje memorije. Kako bi analizirali proliferaciju stanica <i>in vivo</i>, životinje ćemo injicirati s BrdU. Nadalje, pomoću specifičnih monoklonskih protutijela ukloniti ćemo određene populacije stanica imunološkog sustava kako bi istražili imunološki odgovor u odsustvu istih. Kako bi manipulirali imunološkom memorijom tretirat ćemo životinje s niskim dozama specifičnog inhibitora apoptoze (ABT-199/Venetoclax). Sve navedene tehnike ne uzrokuju značajnu bol ili patnju životinja, očekivana razina težine postupka je blaga. Radi navedenog, moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa će se životinje pratiti nakon injiciranja. Kako bi zamijenili hematopoetični odjeljak životinja specifičnim genetički preinačenim koristimo model kimeri koštane srži. U većini slučajeva ovaj postupak ne uzrokuje štetne posljedice te se stoga klasificira kao blagi. No, u iznimno rijetkim slučajevima dovodi do pojave radijacijske bolesti. Životinje kod kojih uočimo simptome ove bolesti bit će odmah usmrćene kako bi spriječili njegovu daljnju patnju. Kako bi ispitali tumorski potencijal, malom broju životinja, injicirat ćemo B16 stanice melanoma. Ako se injicira intravenski, očekivana razina težine postupka je blaga budući da životinje žrtvujemo na humani način prije razvoja patnje i boli. Razvoj intravenski injiciranog tumora kvantificiramo metastazama u plućima dok supkutano injiciranje stanica B16 melanoma rezultira stvaranjem solidnih tumora. U tom modelu (s.c. B16 melanom) miševe ćemo usmrtiti na humani način kada tumor dosegne određenu veličinu. Očekivana razina težine ovog postupka je teška. Na kraju opisanih pokusa, miševi će biti usmrćeni na humani način u svrhu analize stanica imunološkog sustava nakon izolacije tkiva ili organa tih životinja i/ili kvantifikacije titra virusa.
Primjena načela 3R 1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Imunološkog sustava je iznimno kompleksan sustav koji se nalazi na nekoliko lokacija u našem tijelu i sastoji se od obilja različitih stanica koje su u međusobnoj interakciji

	Imajući to u vidu, <i>in vitro</i> modeli ne mogu predočiti cjelokupnu sliku stvarnih zbivanja u organizmu tijekom imunološke reakcije, posebice ako uzmeremo u obzir i činjenicu da još uvijek nisu poznati svi čimbenici koji su uključeni u regulaciju tih odnosa. Iako ne možemo kompletno zamijeniti pokuse s laboratorijskim životinjama, uspostavom specifičnih <i>in vitro</i> modela za generiranih memorijskih stanica analizirali smo ponašanje stanica tijekom vremena što nam je dalo bolji uvid u regulaciju imunoloških stanica <i>in vivo</i>. Zahvaljujući <i>in vitro</i> modelu, možemo precizirati najpogodnije vremenske točke za analizu imunološkog odgovora, što je posljedično zamijenilo nekoliko <i>in vivo</i> pokusa. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	Korištenje <i>in vitro</i> modela dobiti ćemo bolji uvid u regulaciju imunoloških stanica <i>in vivo</i> te na taj način odrediti najpogodnije vremenske točke za analizu imunološkog odgovora, što posljedično rezultira smanjenjem broja životinja koje koristimo u <i>in vivo</i> pokusima infekcije. Dodatno smanjenje broja životinja ćemo postići korištenjem naprednih genetičkih modela. To će nam omogućiti vrlo precizno praćenje ponašanja stanica imunološkog sustava u našim pokusima te ćemo tako direktno moći odgovoriti na postavljena istraživačka pitanja uz smanjenje ukupnog broja pokusa. Također, model kimerne koštane srži omogućuje nam praćenje i analizu dvije potpuno različite populacije imunoloških stanica u istoj životinji, čime smanjujemo broj životinja za dva puta. Uz to, koristimo tehnike i modele koje smo usavršili budući da imamo dugogodišnje iskustvo u istim. Na taj način se smanjuje varijacija unutar grupe što rezultira također smanjenjem broja životinja potrebnog kako bi se postigla statistička značajnost.
3. Pобољшanje 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 stete za životinje	Pобољшanje je postignuto uspostavom modela infekcije koji uzrokuju minimalni k nički utjecaj na životinje. Naš zavod dugi koristi mCMV kao model koji uzrokuje subkliničku infekciju. Također uspostavili smo i LCMV model za analizu CD8⁺ T staničnog odgovora. Iako namjeravamo koristiti model B16 melanoma, zahvaljujući dostupnosti LCMV-Ova možemo smanjiti broj pokusa s tumorskim modelom na minimum.

	U planiranom istraživanju za većinu planiranih pokusa očekivana razina težine postupaka je blaga te će se u slučaju pojave boli, stresa i nelagode životinje usmrtniti na humani način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu. U pokusima u kojima se miševima induciraju tumori svakodnevno ćemo pratiti njihov izgled, ponašanje te kada se uoče simptomi boli (izoliranje iz grupe, pogrbljeno držanje, nakostriješeno krzno) životinja će biti usmrćena na human način. Na taj način pokušat ćemo svesti patnju životinje na minimum a da ne ugrozi provođenje pokusa. Budući da je radi potreba istraživanja potrebno uzeti različita tkiva ili organe, životinje će biti usmrćene na prethodno opisani način, te radi toga nije moguća rehabilitacija životinja. Uz to u svim pokusima će se provoditi obogaćivanje kaveza pomoću skloništa ili materijala za pravljenje gnijezda te će se životinjama rukovati samo osobe koje su educirane za navedeno. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u individualno ventiliranim kavezima (engl. Individually ventilated cages, IVC). Na kraju svih pokusa životinje će biti eutanazirane na human način.
--	--