

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Uloga unutarstaničnog života <i>Francisella tularensis</i> u patogenezi eksperimentalne tularemije		
Trajanje projekta	15.04.2017. - 14.04.2021. * Pokusi na životinjama će se provoditi od datuma izdavanja odobrenja, ukoliko odobrenje bude izdano nakon 15.04.2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	<i>Francisella</i> , LVS; FPO mutante; autofagija		
	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
Opisite ciljeve projekta (na primjer, znanstveni, neprofitni ili znanstveni ili kliničke potrebe)	Bakterije roda <i>Francisella</i>, gram negativni su, fakultativno unutarstanični patogeni, uzročnici tularemije u ljudi i životinja. Otkrivanje molekularnih i staničnih mehanizama unutarstaničnog života <i>F. tularensis</i> neophodno je kako za razumijevanje patogeneze tularemije, tako i razvoj novih lijekova i cjepiva u cilju što uspješnijeg nadzora nad infekcijom. U predloženim istraživanjima koristit ćemo model infekcije s vakcinalni sojem <i>F. tularensis</i> (engl. Live Vaccine Strain, LVS), dobivenim od subsp. <i>holartica</i>, iako potpuno neinfektivan za čovjeka, LVS je virulentan za miša, stoga je idealan za proučavanje čimbenika virulencije i patogeneze infekcije s <i>F. tularensis</i>. Također, u pokusima će se koristiti i mutante FPO (<i>Francisella patogeni otok</i>) <i>iglC</i>, <i>iglI</i>, <i>iglG</i>, <i>pdpC</i> i <i>pdpE</i> LVS soja bakterije. Dokazano je da su mnogi geni FPO nužni za biogenezu fagosoma i bijeg bakterije u citosol, što je ključan trenutak u unutarstaničnom životu francizele. Smatra se da geni FPO kodiraju tip VI sekrecijskog sustava (T6SS). Pretpostavljamo da neki proteini kodirani FPO genima imaju ulogu u procesu autofagije te će predloženi eksperimentalni model u miša doprinijeti boljem razumijevanju uloge autofagije u patogenezi tularemije. Osobito nas zanima uloga FPO proteina tijekom autofagije u plućima i jetri inficiranih miševa. Nadalje,		

	pretpostavljajući da je Atg5 neophodan za progresiju ili inhibiciju infekcije uzrokovane francizelom, jedan od ciljeva istraživanja je i određivanje uloge Atg5 u procesu autofagije tijekom eksperimentalne tularemije. Autofagija se smatra jednim od efektorskih mehanizama urođene imunosti protiv unutarstaničnih bakterija. Dokazana je mogućnost moduliranja autofagije posredstvom određenih citokina, ali i obrnuto, utjecaja autofagije na lučenje proupalnih citokina. Podaci o ulozi autofagije u regulaciji citokinske mreže tijekom tularemije su još uvijek rijetki i proturječni. Stoga je naš cilj odrediti produkciju određenih pro- i protu-upalnih citokina koji su povezani s procesom autofagije koristeći transgene miševe.
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)?	Francizela modulira proces autofagije na različite načine, u pozitivnom i negativnom smislu. Međutim, modulatorna uloga FPO proteina tijekom infekcije s <i>F. tularensis</i> još je uvijek nepoznata. Osim <i>in vitro</i>, istraživanje obuhvaća i regulaciju autofagije od strane francizele u <i>in vivo</i> modelu infekcije. Otkrivanje molekularnih i staničnih mehanizama unutarstaničnog života <i>F. tularensis</i> neophodno je kako za razumijevanje patogeneze tularemije, tako i razvoj novih lijekova i cjepiva u cilju što uspješnijeg nadzora nad infekcijom. Stoga je ovo temeljno biomedicinsko istraživanje bitno za stjecanje novih znanja o patogenezi tularemije koja će pridonijeti razvoju novih terapijskih i preventivnih strategija baziranih na autofagiji.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju ćemo koristiti C57BL/6, C57BL/6 <i>Atg5^{flax/flax}</i> i C57BL/6 <i>Atg5^{flax/flax}-Iyz-Cre</i> transgene miševe. Tijekom četverogodišnjeg razdoblja, u svrhu istraživanja, uglavnom u drugom dijelu projekta bit će potrebno najviše 720 životinja.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U predloženom istraživanju, životinje će biti ošišane kliperom na maloj površini blizu korijena repa te inficirane intradermalno s IVS sojem <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holartica</i> ili FPO mutantama. Miševi će u pokusu provesti najdulje 72 sata, jer je to posljednja krajnja točka mjerenja. Prilikom i.d. infekcije, životinje mogu osjetiti samo prolaznu, blagu nelagodu. Nakon infekcije ne očekuje se smrt životinja, kao niti značajna promjena općeg zdravstvenog stanja te se pokus može karakterizirati kao blag. Ipak, kliničko stanje u životinja će, tijekom trajanja pokusa, svakodnevno dva puta obilaziti voditeljica pokusa M. Mihelčić, dr. vet. med.,

	te će procjenjivati njihovo zdravstveno stanje i bilježiti ocjene prema tablici. Uočili li se značajnija promjena općeg stanja i patnja u pojedinim jedinki (zbroj ocjena veći od 12), iste će biti usmrćene na human način. Kako su krajnje točke mjerenja 2, 24, 48 i 72 h, tri dana je nadalje vrijeme koje će životinje provesti u pokusu. U navedenim vremenskim intervalima (2, 24, 48 i 72 sata nakon infekcije), miševi će biti žrtvovani u dubokoj anesteziji kombinacijom ketamina (100 mg/kg tjelesne težine) i ksilazina (10 mg/kg tjelesne težine) injiciranih intraperitonealno u ukupnom volumenu od 200 μl (Gargiulo i sur., 2012.). Usmrćivanje životinja dovršit će se iskrvarenjem.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Kako je proces patogeneze, a napose imunološki odgovor organizma kompleksan, nemoguće ga je u potpunosti objasniti bez korištenja živog organizma te je neophodno korištenje <i>in vivo</i> modela infekcije. 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. Stoga je predloženi model na C57BL/6 Atg5^{fllox/fllox}-lyz-Cre miševima najprikladniji za istraživanje uloge Atg5 i FPO proteina u procesu autofagije, te praćenje imunološkog odgovora tijekom procesa autofagije u eksperimentalnoj tularemiji.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Cijeli pokus provest će se s minimalnim brojem životinja koje osiguravaju statističku analizu. Za pokuse vezane uz praćenje patogeneze koristit će se po tri životinja po mutanti i ispitivanoj skupini u svakoj točki mjerenja. Kako bi smanjili broj pokusnih životinja uzoreći tkiva izoliranih organa koristit će se za više različitih analiza. Polovica organa koristit će se za patohistološku obradu ili analizu ultrastrukturnih promjena, a druga polovica za određivanje broja bakterija u organima. Prethodnim <i>in vitro</i>

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	istraživanjima, nastojat ćemo isključiti one bakterijske sojeve tj. one mutante čiji geni nisu značajni u unutarstaničnom preživljavanju i razmnožavanju, odnosno odabrati one kojima je značajno odrediti ulogu u patogenezi tularemije u <i>in vivo</i> modelu. Stoga očekujemo da ćemo smanjiti ukupan broj životinja provođenjem mjerenja samo u ključnim točkama istraživanja te isključivo za odabrane sojeve bakterija koje su prethodno ispitane na staničnom modelu.
3. Poboljšanje 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.	U pokusima će se koristiti C57Bl/6 miševi te transgeni sojevi (C57Bl/6 Atg5^{flax/flax}, C57Bl/6 Atg5^{flax/flax} Lyz-Cre) konstruirani na istoj genetskoj pozadini. Eksperimentalna tularemija u mišu predstavlja <i>in vivo</i> model uspostavljen radi praćenja tijeka infekcije, determiniranja imunološkog odgovora domaćina na sustavnoj i lokalnoj (tkivnoj) razini te istraživanja parametara uključenih u proces autofagije što nije u cjelosti moguće dokazati u <i>in vitro</i> uvjetima. Transgeni miševi omogućit će nam proučavanje uloge određenih gena/proteina u imunološkom odgovoru tijekom tularemije bez nepotrebne patnje koja bi mogla biti izazvana u konvencionalnih životinja. Uz adekvatan smještaj i njegu, prije i tijekom pokusa, tjeskoba kod životinja nastojat 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 dva puta obilaziti i promatrati, a uoči li se bilo kakva promjena općeg stanja, bit će usmrćene na human način.