

OBRAZAC 3

Naslov projekta	<i>Anisakis</i> kao kancerogen: izazov rušenja Lancetovog mita ili otkrivanje prave istine (AnisCar) [Projekt je Etičkom povjerenstvu upućen pod radnim naslovom VivAnis: <i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> ispitivanje kancerogenosti proteinskih produkata oblića <i>Anisakis pegreffii</i>]		
Trajanje projekta	01. ožujka 2019. – 28. veljače 2023.		
Ključne riječi (najviše do 5)	oblič, infekcija, <i>Anisakis</i> , zoonoza, kancerogeneza		
	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).	Cilj je otkriti potiču li proteinski produkti (ES, CE) <i>Anisakis</i> ličinke malignu transformaciju fibroblastnih embrionalnih stanica BALB/c 3T3 stanične linije, u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu (poznati kancerogen npr. N-nitroso spoj), te mogu li maligno transformirane stanice transplantirane u BALB/c miševe potaknuti rast novotvorina.		
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).	Saznanja koja bi se stekla ovim model testiranjem kancerogenosti bi pružila uvid u još jednu moguću interakciju između infektivne ličinke i čovjeka kao slučajnog domaćina. Ovo istraživanje bi moglo predstavljati ključni korak za budući razvoj ciljanih terapija u slučaju zaraze nametnikom roda <i>Anisakis</i> u čovjeka, jačanje svijesti o rizicima nalaza infektivne ličinke u morskim proizvodima, te strategijama inspeksijskog nadzora istih.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Planira se koristiti ukupno 40 mužjaka BALB/c miša <i>Mus musculus</i> , starosti 6 tjedana. Za preliminarno istraživanje planira se korištenje ukupno 5 životinja, odnosno po jedna za svaki od 5 tretmana (tretman 1: stanice nakon aplikacije ES; tretman 2: stanice nakon aplikacije CE; tretman 3: stanice nakon aplikacije otapala; tretman 4: stanice nakon aplikacije medija; tretman 5: stanice nakon aplikacije N-nitroso spoja). U glavnom pokusu planiramo imati 35 životinja, što uključuje i 3 kontrolne skupine svaka po 7 miševa (N=21; negativna kontrola 1: bez ES i CE produkata ali s otapalom; negativna kontrola 2: bez ES i CD produkata i bez otapala; pozitivna kontrola: N-nitroso spoj).		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Iz literature je utvrđeno da nakon 4-6 tjedana od aplikacije transformiranih stanica dolazi do pojave potkožnih tumora u mišu, bez pojave popratnih znakova bolesti. Obzirom da će se miševi žrtvovati odmah pri vidljivoj pojavi tumora, ne očekuju se negativni učinci tijekom pokusa.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Miševi se koriste kao potvrda glavnog testa transformacije stanica (cell transformation assay, CTA). Ne mogu se zamijeniti jer samo dokaz transformacije stanica <i>in vitro</i> nije dovoljan, ako se razvoj tumora ne utvrdi i u miša kao <i>in vivo</i> modela. Model kombiniranja CTA i miševa je zamijenio dvogodišnji test ispitivanja kancerogenosti na glodavcima (koji je koristio oko 900 jedinki glodavaca; OECD, 2007), što je samo po sebi znatan napredak u smislu zamjene, a danas se smatra referentnim (ECVAM). Životinje su potrebne kako bi se mogao ustanoviti nastanak tumora u živom organizmu, te analizama utvrditi mehanizmi nastanka.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Izračunat je minimalan broj potrebnih životinja, s obzirom na uzorkovanje tkiva u svrhe RNA sekvenciranja, gdje je neophodno 7 replika po stanju, i histologije (klasične, IHC, TEM), te analize tumorskih bičijega. Naime, 7 miševa po tretmanu je optimalan broj koji omogućava statistički značajnu pouzdanost neophodne razine $p=0.99$ za bioinformatičku interpretaciju rezultata RNAseq i ekspresije gena. Veličina uzorka u glavnom pokusu je izračunata koristeći javno dostupne računalne programe (http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/), a broj miševa u preliminarnom pokusu je reducirana na 1 po tretmanu, ali će nam dati uvid u stvarnu dužinu trajanja razvoja ovog tipa tumora u miševa, odnosno vrijeme neophodno za držanje miševa u glavnom pokusu.
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.	Mužjaci BALB/c miševa će se koristiti jer se CTA test radi na BALB/c 3T3 stanicama, što znači da će se aplikacijom komercijalno dostupne stanične linije homologne s domaćinom u kojeg se transplantira, izbjeći potreba korištenja imunokompromitiranih organizama za <i>in vivo</i> dokazivanje rasta tumora. Pregledom recentne literature ovo je najčešći kompatibilni model <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> dokazivanja tumorogenosti ispitivanih produkata. Tijekom pokusa, stanice se miševima apliciraju potkožno i jednokratno, te posebne mjere smanjenja straha, boli i patnje tijekom aplikacije nisu potrebne. Prije uzorkovanja tumorskih i zdravih tkiva, miševi će se usmrtniti predoziranjem anestetikom (ketaminol, Ketaminhydroklorid, MSD Animal Health; >150 mg/kg, i.p.) pri prvoj vidljivoj pojavi tumora, te će se dodatno napraviti dekapitacija kako bi se utvrdio nastanak smrti. Uzimanje uzoraka tkiva se planira nakon potvrde nastanka smrti životinje, kako bi životinje bile pošteđene patnje. Eksperimentalne tehnike se temelje na načelu poboljšanja tako da se moguća bol, patnja, tjeskoba ili trajno oštećenje uzrokovano životinjama ukloni ili smanji na najmanju moguću mjeru.