

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Uloga progesteronskih receptora i progesterona u patogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)		
	Nadopuna već odobrenog projekta: „Uloga progesterona u reproduktivnim i nereproduktivnim tkivima“ pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva EP 60-2/2016.		
Trajanje projekta	1.3.2018.-31.08.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Progesteronski receptori, eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis, središnji živčani sustav, upala, neuroprotekcija		
	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).	Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišteni eksperimentalni životinjski model koji se koristi za proučavanje multiple skleroze (MS) i smatra se njenim laboratorijskim analogom jer dijele mnoge kliničke i patološke osobine. Multipla skleroza je autoimunosna, upalna bolest središnjeg živčanog sustava (SZS) karakterizirana razgradnjom mijelinskih ovojnica i progresivnim gubitkom motoričkih funkcija. Iako patogenetski mehanizam koji rezultira demijelinizacijom u bolesnika sa MS-om nije u potpunosti razjašnjen, MS se danas smatra tipičnom multifaktorijskom bolešću, pri čemu je sklonost ka bolesti uvjetovana prisustvom određenih gena, a međudjelovanje različitih okolišnih čimbenika u genetski predisponiranih osoba djeluje kao otporac za pokretanje autoimunske reakcije usmjerene na vlastite mijelinske bjelancevine. Povećana sklonost ka bolesti pripisuje se i oslabljenim zaštitnim mehanizmima unutar središnjeg živčanog sustava, nedostatnom reparacijskom/remijelinizacijskom odgovoru na pokrenuti demijelinizacijski inzulat, te neprimjerenom imunoregulaciji nakon inicijalne aktivacije imunološkog sustava. Prethodna su istraživanja pokazala zaštitni učinak progesterona u razvoju bolesti, no mehanizam tog učinka je nepoznat. Posebice ostaje nerazjašnjena uloga progesteronskih receptora kao pretpostavljenih posrednika ovih učinaka s obzirom na poznati "receptorski pleotropizam" steroida i mnoštva njihovih lokalno stvorenih aktivnih metabolita. Polazeći od pretpostavke da progesteronski receptori posreduju neuroprotekciju, odnosno da doprinose otpornosti ka razvoju EAE-a u rezistentnih sojeva miševa, cilj je ovog pokusa ispitati mogu li se izazvati klinički simptomi bolesti i/ili neurohistopatološke promjene standardnom indukcijom bolesti (imunizacijom sa ulomcima mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina uz Freundov adjuvans) u miševa rezistentnog BALB/c soja, no deficijentnih za progesteronske receptore (PRKO; prema engl. <i>progesterone receptor knockout</i>), odnosno selektivno deficijentnih za izoformu A progesteronskih receptora (PRAKO; prema engl. <i>progesterone receptor A knockout</i>) i izoformu B progesteronskih receptora (PRBKO; prema engl. <i>progesterone receptor B knockout</i>). Reaktivnost i promjene u središnjem živčevlju ovih miševa biti će uspoređene sa divljim tipom miševa soja BALB/c (rezistentnog na bolest) i divljim tipom miševa		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	soja C57BL/6 (osjetljivog na bolest) podvrgnutima identičnom imunizacijskom protokolu, te sa neimuniziranim kontrolnim životinjama odgovarajućeg soja i genotipa.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Očekujemo dobivanje novih podataka o mehanizmima kojima progesteron i progesteronski receptori, odnosno njihove izoforme, doprinose neuroprotekciji i sudjeluju u stvaranju otpornosti/sklonosti ka obolijevanju od multiple skleroze. Dobiveni rezultati mogli bi uputiti na daljnja istraživanja usmjerena ka pronalasku novih liječidbenih pristupa u bolesnika s multiplom sklerozom.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanje će biti uključeno ukupno 110 laboratorijskih miševa: - 22 laboratorijska miša soja C57BL/6 (divljeg tipa) - 22 laboratorijska miša soja BALB/C (divljeg tipa) - 22 laboratorijska miša soja BALB/C deficijentnog za progesteronske receptore (PRKO; prema engl. <i>progesterone receptor knockout</i>) - 22 laboratorijska miša soja BALB/C deficijentnog za za izoformu A progesteronskih receptora (PRAKO; prema engl. <i>progesterone receptor A knockout</i>) - 22 laboratorijska miša soja BALB/C deficijentnog za za izoformu B progesteronskih receptora (PRBKO; prema engl. <i>progesterone receptor B knockout</i>) Sve životinje biti će ženke, starosti 9 – 13 tjedana.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Po indukciji bolesti encefalitogenom emulzijom osjetljive životinje će razviti kronični relapsno-remitentni oblik EAE-a pri čemu se razvija pareza i paraliza te posljedična smanjena pokretljivost životinja, a moguća je i pojava inkontinencije. Za miševe soja C57BL/6 koji su osjetljivi na indukciju bolesti težina pokusa biti će umjerena do teška (životinje sa izrazito teškom kliničkom slikom, kojih ne očekujemo u znatnijoj mjeri, biti će iz humanih razloga eutanazirane). Za miševe soja BALB/c koji nisu osjetljivi na indukciju bolesti ovim protokolom, težina pokusa biti će blaga. Za miševe soja BALB/c, deficijentne za progesteronske receptore, odnosno njihove izoforme (PRKO, PRAKO, PRBKO genotipovi) ne može se procijeniti težina pokusa, budući da se u njih ispituje stupanj reaktivnosti na indukciju bolesti, odnosno postojanje osjetljivosti ili rezistencije. Za sve kontrolne životinje težina pokusa biti će neznatna do blaga. Sve životinje se nakon 28 dana od početka pokusa (indukcije bolesti) žrtvuju prema predviđenom protokolu, u svrhu prikupljanja uzoraka tkiva potrebnih za daljnju laboratorijsku analizu.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	U pokusu će se koristiti standardni, široko prihvaćen animalni model multiple skleroze koji omogućuju <i>in vivo</i> istraživanja patogeneze bolesti. Patogeneza MS-a uključuje promjene u više organskih sustava i kompleksne međustanične interakcije. Inicijalna zbivanja koja pokreću patogenezu ove bolesti događaju se u limfnome tkivu, te zahtijevaju složenu suradnju većeg broja različitih imunskih stanica (dendritičke stanice, makrofagi, različite populacije i subpopulacije limfocita), dok su simptomi bolesti posljedica razvoja specifičnih promjena u središnjem živčelju, koje su također uvjetovane međudjelovanjem različitih staničnih populacija (mikroglija, oligodendrociti, ependimske stanice, astrociti, neuroni, progenitorske stanice). Na svim ovim razinama moguće je modulacijsko djelovanje posredstvom progesteronskih receptora. Stoga je u ovom istraživanju rad s malim laboratorijskim životinjama neophodan tj. istraživanje se ne može izvesti uporabom staničnih kultura <i>in vitro</i> . Zbog etičkih razloga nije moguće provesti odgovarajuća istraživanja na ljudskoj populaciji..

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Tijekom istraživanja koristit će se najmanji mogući broj životinja po ispitivanim grupama iz kojeg će se moći dobiti dovoljna količina uzoraka tkiva za daljnju analizu i pri tome statistički relevantne podatke. Izračun potrebnog broja životinja izvršen je pomoću programa Statistica 12 (Power Analysis – Sample Size Calculation). Uzorci tkiva će se pažljivo alikvotirati i pohraniti na -80°C kako bismo imali što više materijala za analizu i tako izbjegli uvođenje dodatnih životinja u pokus.
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 štete za životinje.	U istraživanjima patogeneze i liječenja multiple skleroze najčešće se koristi životinjski model imunizacije mijelinskim antigenima - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), koji se s velikom reproducibilnošću i konzistentnošću može izazvati u miševa, te je široko prihvaćen kao eksperimentalni model. Različita osjetljivost različitih sojeva laboratorijskih miševa ka izazivanju eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primjenom određenog postupka imunizacije, nudi mogućnost istraživanja čimbenika odgovornih za postojanje rezistencije, odnosno prijemljivosti, čime se može doći i do vrijednih podataka o samoj patogenezu bolesti. Prednost je mišjeg modela nad štakorskim dostupnost većeg broja komercijalnih protutijela potrebnih za detekciju molekula uključenih u patogenetska zbivanja, odnosno za karakterizaciju patoloških promjena. Nadalje, postojanje genetski modificiranih mišjih sojeva, deficijentnih za pojedine gene i njihove bjelančevinske produkte, predstavlja izvrstan model kojim se može izravno istražiti uloga i doprinos dotičnog gena/bjelančevine u patogenezu bolesti, odnosno stvaranju otpornosti/osjetljivosti. U ovom istraživanju cilj je ispitati mogu li se izazvati klinički simptomi bolesti i/ili neurohistopatološke promjene standardnom indukcijom bolesti (imunizacijom sa ulomcima mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina uz Freundov adjuvans) u miševa rezistentnog BALB/c soja, no deficijentnih za progesteronske receptore (PRKO; prema engl. <i>progesterone receptor knockout</i>), odnosno selektivno deficijentnih za izoformu A progesteronskih receptora (PRAKO; prema engl. <i>progesterone receptor A knockout</i>) i izoformu B progesteronskih receptora (PRBKO; prema engl. <i>progesterone receptor B knockout</i>). Reaktivnost i promjene u središnjem živčevlju ovih miševa biti će uspoređene s divljim tipom miševa soja BALB/c (rezistentnog na bolest) i divljim tipom miševa soja C57BL/6 (osjetljivog na bolest) podvrgnutima identičnom imunizacijskom protokolu, te s neimuniziranim kontrolnim životinjama odgovarajućeg soja i genotipa. Životinje su tijekom pokusa smještene u propisanim mikroklimatskim uvjetima i pomno se prate. Kod uznapredovale kliničke slike životinjama se posvećuje dodatna pažnja i njega. O svakodnevnim potrebama životinja brigu će voditi timaritelj, a dodatni nadzor će provoditi osobe uključene u izvođenje pokusa na životinjama. Sve osobe uključene u rad sa životinjama imaju završen tečaj osposobljavanja za rad s laboratorijskim životinjama. Životinje će se radnim danom tijekom radnog vremena obilaziti 2-3 puta, a vikendom su organizirana dežurstva u nastambi, tako da osoba koja je dežurna obide životinje tijekom jutra, a potom jedna od osoba uključenih u izvođenje pokusa obide životinje poslijepodne. Kako bi se paraliziranim životinjama osigurala dostupnost hrani i vodi, one će im biti ponuđene unutar kaveza. Primjerena hidracija i prehrana dodatno će se olakšati navlaživanjem hrane ponuđene unutar kaveza, te postavljanjem čiste vode u obliku gela (<i>HydroGel ClearH₂O</i>, Portland ME, USA). Paraliziranim životinjama također će se mijenjati položaj tijela pri svakom obilasku kako bi se potpomogla primjerena cirkulacija krvi. Ukoliko životinja bude zahvaćena teškom paralizom gotovo čitavog tjelesnog mišićja biti će eutanazirana cervikalnom dislokacijom iz humanih razloga.

