

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Clonal dynamics of memory CD8 T cell inflation (Klonalna dinamika inflacije memorijskih CD8 limfocita T)		
Trajanje projekta	01.09.2018.-28.02.2022. Pokusi koji uključuju laboratorijske životinje provodit će se od 01.09.2018., odnosno od datuma izdavanja odobrenja ukoliko odobrenje bude izdano poslije 01.09.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	citomegalovirus, CD8 limfociti T, memorijska inflacija		
	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).	Kod imunokompetentnog domaćina infekcija citomegalovirusom (CMV) se učinkovito kontrolira, ali unatoč učinkovitom imunom sustavu koji ograničava replikaciju virusa, CMV ostaje u domaćinu doživotno u stanju latencije iz koje se periodično reaktivira. Za efikasnu dugotrajnu kontrolu CMV-a najvažniji su CD8 limfociti T. Obilježje odgovora CD8 limfocita T na CMV je da se s protekom vremena tijekom latencije CD8 limfociti T specifični za određene virusne epitope ne kontrahiraju već im raste broj te se akumuliraju u visokoj frekvenciji i imaju fenotip efektorskih memorijskih stanica. Ovaj fenomen naziva se "memorijska inflacija". Čimbenici koji kontroliraju indukciju i održavanje inflacijskih limfocita T još nisu potpuno poznati. Rezultati suradnika na projektu pokazuju da mala subpopulacija CMV-specifičnih inflacijskih limfocita T smještenih u limfnim čvorovima, a koja ispoljava fenotip centralnih memorijskih limfocita T, ima povećan kapacitet proliferacije. Temeljem ovih rezultata postavljena je hipoteza da prezentacija virusnih peptida po reaktivaciji latentno inficiranih ne-hematopoetskih stanica u limfnom čvoru, dovodi do ekspanzije CMV-specifičnih inflacijskih limfocita T centralnog memorijskog fenotipa smještenih u limfnom čvoru, do njihove diferencijacije u stanice efektorskog tipa te migracije u periferna tkiva. Nejasno je i kako se mijenja sastav „poola“ inflacijskih limfocita T tijekom vremena i je li ovaj proces pod utjecajem drugih faktora, poput kostimulacijskih signala. Bazirano na navedenoj hipotezi, planiramo na eksperimentalnom modelu infekcije miševa mišjim CMV-om (MCMV) ispitati ulogu pojedinih kostimulacijskih molekula u oblikovanju populacije CMV-specifičnih inflacijskih CD8 limfocita T, ispitati vremensko-prostornu klonalnu kompoziciju populacije inflacijskih limfocita T te istražiti afinitet MCMV-specifičnih inflacijskih CD8 limfocita T tijekom vremena u različitim tkivima/organima.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Većina cjepiva koja su danas u upotreba usmjerena je ka indukciji humoralnog imunog odgovora, ali postoje neki važni patogeni (npr. HIV, virus hepatitisa C) na koje je, uglavnom zbog velike varijabilnosti njihovih površinskih antigena, vrlo teško inducirati odgovor protutijelima. Stoga su od velike važnosti cjepiva koja potiču odgovor limfocita T na proteine koji su više konzervirani. CMV-i su izuzetno dobri kandidati za vektore za cjepiva budući induciraju veliku populaciju funkcionalnih inflacijskih limfocita T. Stoga je razumijevanje kako se ova populacija efektorskih memorijskih stanica		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	T generira i kako se održava, a što je i cilj ovog projekta, od velike važnosti za korištenje CMV-a kao cjepnih vektora. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem biti će također važni i za kreiranje cjepiva na humani CMV (HCMV) koji je najčešći virusni uzročnik kongenitalne infekcije ljudi te koji uzrokuje teške razvojne malformacije, a za kojega još ne postoji učinkovito cjepivo.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom trajanja projekta je 2271.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Očekivana razina težine postupaka je blaga do umjerena. Očekuje se da životinje mogu osjetiti tek prolaznu blagu nelagodu neposredno nakon injiciranja. Doza MCMV-a koja će se koristiti ne bi trebala izazvati simptome bolesti kod životinja. Redovito ćemo pratiti zdravstveno stanje životinja te ukoliko se kod pojedine životinje tijekom pokusa primijete nepredviđani problemi životinja će biti usmrćena na human način (HEP). Dužina korištenja pojedinih životinja ovisit će o protokolu pokusa, te će sukladno tome pojedini miševi biti eutanazirani nekoliko dana po infekciji, a pojedini miševi nekoliko tjedana ili mjeseci po infekciji. U pokusima umjerene težine životinje će se svakodnevno pratiti te će se ukoliko je nužno eutanazirati na humani način (sukladno tablici točke 4.11.5. obrasca 2).
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda za istraživanje MCMV-a i HCMV-a, odnosno infekcije ovim virusima, koja bi bila zasnovana na modelu staničnih kultura. Citomegalovirusi su specifični za vrstu, a infekcija miševa MCMV-om je najčešće korišteni model za izučavanje HCMV infekcije, s obzirom na veliku sličnost MCMV-a i HCMV-a u imunobiologiji i patogenezi. Ovaj model omogućuje nam istraživanje složenih interakcija virusa s komponentama imunološkog sustava domaćina te organizma kao cjeline.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U grupama životinjama uključenim u istraživanje koristit će se najmanji mogući broj životinja koji omogućava dobivanje statistički relevantnih podataka. Iz svakog pokusa nastojat će se dobiti što veća količina informacija.
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.	Životinje će po injiciranju biti praćene na znakove nelagode ili stresa koji su jači od predviđenih sukladno tablici u točki 4.11.5 (obrasca 2), te u slučaju potrebe biti usmrćene na human način. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u kavezima smještenim u IVC sustave sa obogaćenim okolišem. Na kraju pokusa životinje će biti eutanazirane na human način. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga do umjerena.