

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Ispitivanje utjecaja novih adjuvanata i njihovih nanoformulacija na specifičnu imunološku reakciju		
Trajanje projekta	1.11.2019.-31.12. 2022.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Adjuvant, peptidoglikan, desmuramilpeptidi, imunološki odgovor, nanoformulacije		
	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).	Aktivnost potencijalnih adjuvanata, imunostimulatora, kao niti novih nanolipidnih formulacija nije moguće ispitivati na ljudima. Također, ne postoji pouzdan model za istraživanje mnogih bolesti za koje je potrebno razviti cjepivo, stoga je vrlo teško evaluirati adjuvant za određeni cjepni antigen. Imunogeničnost cjepiva kao i evaluacija adjuvantne aktivnosti ispituju se u različitim animalnim modelima stoga je cilj ovoga projekta ispitati adjuvantnu aktivnost i utjecaj ispitivanih spojeva te njihovih nanoformulacija na specifičnu imunološku reakciju u mišu. Cilj je dobiti podatke koji spoj pojačava imunološku reakciju, te odrediti tip imunološke reakcije, s obzirom na podvrste induciranih antitijela.		
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).	Planirani projekt je nastavak naših istraživanja gdje kontinuirano ispituje utjecaj strukture na biološku aktivnost derivata kako peptidoglikana tako i desmuramil peptida. rezultati će pokazati koje funkcionalne grupe u novosintetiziranim spojevima mogu pojačati adjuvantnu aktivnost i usmjeriti imunološki odgovor u određenom smjeru. Također ćemo ugrađivanjem spojeva u liposome i hidrogelove zaštititi ih od hidrolitičke enzimske razgradnje i pokazati je li im moguće pojačati i produžiti učinak. Svi prikupljeni rezultati biti će važan doprinos u razvoju potentnih adjuvanata nove generacije		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Istraživanja će biti provedena na mišjem soju NIH/OlaHsd budući da je dio prethodnih istraživanja imunomodulacijske aktivnosti proveden na navedenom soju. Prednosti ispitivanja humoralnog imunološkog odgovora u mišjem modelu su dostupnost niza reagencija i obilježenih antitijela za analizu imunoglobulina, na osnovu kojih se procjenjuje učinkovitost testiranog adjuvanta. Nizak trošak smještaja i hrane te jednostavan rad s miševima su također njihova prednost. Istraživanje planiramo provesti na najmanjem mogućem broju životinja koji nam je dostatan za analizu (500 miševa kroz tri (3) godine projekta). Broj miševa ovisit će o broju probiranih spojeva za in vivo testiranje. Probir će se vršiti na osnovu preliminarnih testiranja fizikalno-kemijskim metodama interakcija spojeva sa određenim proteinima kao i in vitro testiranjima. In vivo ćemo testirati samo one spojeve koji se pokazuju kao najbolji kandidati za adjuvante.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Protokoli imunizacije uključuju primarnu imunizaciju i dva docjepljivanja u razmacima 21 dana. Nakon drugog docjepljivanja pokus završava. Tijekom pokusa se ne očekuje nikakav štetan utjecaj na životinje obzirom da spojevi koje koristimo u pokusu nisu toksični, što je pokazano u našim prijašnjim istraživanjima kao i prema literaturnim izvorima. Pokus je blag. Životinje su anestetizirane i smrt nastupa uslijed terminalnog iskrvarenja prilikom uzimanja krvi iz		

	aksilarnog spleta krvnih žila prema standardiziranoj proceduri.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Specifični humoralni imunološki odgovor novosintetiziranih spojeva moguće je testirati samo in vivo na eksperimentalnim životinjama, s obzirom da je to nemoguće izvoditi na ljudima. Preporuke za testiranje adjuvanta: Guideline on Adjuvants in Vaccines, EMEA/CPMP/VEG/17/03/2004v5 Adjuvants for human vaccines: R.K. Gupta, G.R. Siber, Vaccine 1995, 13, 1267. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols, O'Hagan, Derek, T. Humana. Press, 2000
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	S obzirom na svrhu istraživanja i to da u pokusu moramo koristiti žive životinje, njihov broj je sveden na najmanji mogući broj jer smo u dosadašnjim pokusima pokazali da je za procjenu adjuvantske sposobnosti imunomodulatora peptidoglikanske strukture dovoljno analizirati serume poslije drugog docjepljivanja. Krvarenja nakon prvog docjepljivanja su ukinuta. Da bi rezultati bili znanstveno pouzdani (tj. imali dovoljnu statističku snagu od $P < 0.05$ prilikom analize kvantitativnih rezultata jednosmjernom analizom varijance, ANOVA, s post hoc Tukeyevim testom), a s obzirom da svaku eksperimentalnu grupu uspoređujemo s negativnom kontrolom koja je primila samo antigen, u otopini ili antigen u nanonosu, prema literaturi potrebno je uzeti najmanje 10 životinja po skupini. Također, spojevi će proći različite fizikalno-kemijske analize i in vitro testove na osnovu kojih će se izabrati samo najbolji kandidati za in vivo testiranje (QCM metoda – metoda kristalne mikrovage za testiranje interakcije ligand-receptor; ELISA testiranje izlučivanja proupalnih citokina IL-6, IL-10, TNF- α iz PBMC stanica (human peripheral blood mononuclear cells); testiranje adjuvanata da li aktiviraju NOD2 receptor in vitro pomoću validiranih i komercijalno dostupnih testova kao što je HEK-Blue NOD2-dependent NF- κ B-inducible SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) reporter gene assay. Također na osnovu literaturnih podataka o utjecaju pojedinih supstancija na adjuvantsku aktivnost molekula, ciljano su dizajnirani i sintetizirani NOD agonisti, desmuramili peptidi i adjuvantska aktivnost bit će testirana in vivo samo derivatima koji su pokazali najveću aktivnost u in vitro testiranjima.
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.	Imunogeničnost cjepiva kao i evaluacija adjuvantne aktivnosti ispituju se u različitim animalnim modelima i različitim vrstama koje daju različit odgovor u testiranjima, pa čak i unutar jedne vrste, različiti spojevi daju različiti biološki odgovor. Opisana su testiranja adjuvantske aktivnosti u modelu zamorčica i kunića no mišji model je široko prihvaćen. Prednosti ispitivanja humoralnog imunološkog odgovora u mišjem modelu su dostupnost niza reagensija i obilježenih antitijela za analizu imunoglobulina, na osnovu kojih se procjenjuje učinkovitost testiranog adjuvanta. Nizak trošak smještaja i hrane te jednostavan rad s miševima su također njihova prednost. Kako bi se smanjile štete za životinje, 7 dana nakon drugog docjepljivanja životinje će se anestezirati radi uzimanja krvi (seruma). „Kao humana krajnja točka tijekom pokusa, najraniji pokazatelj da životinja u eksperimentu trpi nelagodu, stres i bol, ili da joj predstoji smrt, uzet će se gubitak težine do 20 %, promjene u ponašanju ili bilo kakvi znakovi boli. Životinje će biti eutanazirane prije završetka pokusa od strane osobe zadužene za eutanaziju, uz prisustvo imenovanog veterinar. Nadalje, životinjama ćemo obogatiti prostor tunelima za igru i a za bolje i kvalitetnije korištenje prostora te materijalima za grizenje, trganje i manipuliranje.
Potrebna retroaktivna procjena	da ne

"Ministarstvo poljoprivrede
i šumarstva i vodoprivrede" Republike Hrvatske

projekta (upisuje nadležno tijelo)		
Rezultat retroaktivne procjene projekta (upisuje nadležno tijelo)		

