

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Hrvatski naslov: Manipuliranje imunološkom memorijom: razvoj novih strategija u svrhu stvaranja boljeg memorijskog CD8 T-staničnog odgovora protiv COVID-19 nakon cijepljenja Engleski naslov: Memory manipulation; development of novel strategies to enhance the memory CD8 T cell response against COVID-19 following vaccination.		
Trajanje projekta	24 mjeseci		
Ključne riječi (najviše do 5)	T stanice, memorija, signaliranje, afinitet		
	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 (<i>na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe</i>).	U ovom projektu želimo istražiti ako možemo proširiti opseg i time poboljšati odgovor imunološke memorije protiv SARS-CoV-2 virusnih mutanata.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	U ovom ćemo projektu namjeravamo istražiti ako možemo proširiti opseg imunološke memorije (tj. poboljšati sposobnost prepoznavanja više različitih varijanti virusa) posebno protiv SARS-CoV-2. Stoga je ovaj projekt, u kontekstu razvoja cjepiva, od velike važnosti za cjelokupnu populaciju.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju namjeravamo koristiti C57BL/6 miševe divljeg soja kao i genetički modificirane sojeve dobivene genetičkim preinačavanjem C57BL/6J mišjeg soja. Broj laboratorijski miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom navedenog perioda je 1540.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Kako je opisano u dokumentu: "Obrazac 2", koristit ćemo različite metode kako bi postigli specifične ciljeve istraživanja. Miševe ćemo križati te također izolirati tkiva i organe nakon njihova usmrćivanja. Namjeravamo i		

	adoptivnim transferom specifične imunološke stanice prenijeti u miševe primatelje kako bi analizirali ponašanje stanica imunološkog sustava u kontroliranim (ili genetički preinačenim) uvjetima. Osim toga, namjeravamo inficirati miševe s mCMVom ili LMom kako bi istražili odgovor stanica imunološkog sustava na infekciju kao i na stvaranje memorije. Kako bi manipulirali imunološkom memorijom tretirat ćemo životinje s niskim dozama specifičnog inhibitora apoptoze (BAI1). Sve navedene tehnike ne uzrokuju značajnu bol ili patnju životinja, očekivana razina težine postupka je blaga. Radi navedenog, moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa će se životinje pratiti nakon injiciranja. Samo jedan od navedenih pokusa je spada u kategoriju teških. Kako bi ispitali ukoliko je model imunizacije/cijepljenja uspješan, miševi namjeravamo inficirati s letalnom dozom LM-a koja je smrtonosna za naivne miševe (miševe bez imunološke memorije), ali takvu infekciju preživljavaju bez simptoma miševi koji imaju normalnu imunološku memoriju. U tom modelu miševe ćemo usmrtiti na humani način kada simptomi dosegnu određeni stupanj (sukladno obrascu za procjenu stanja životinje). Očekivana razina težine ovog postupka je teška. Na kraju opisanih pokusa, miševi će biti usmrćeni na humani način u svrhu analize stanica imunološkog sustava nakon izolacije tkiva ili organa tih životinja i/ili kvantifikacije titra virusa.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Imunološkog sustava je iznimno kompleksan sustav koji se nalazi na nekoliko lokacija u našem tijelu i sastoji se od obilja različitih stanica koje su u međusobnoj interakciji. Imajući to u vidu, <i>in vitro</i> modeli ne mogu predočiti cjelokupnu sliku stvarnih zbivanja u organizmu tijekom imunološke reakcije, posebice ako uzmemo u obzir i činjenicu da još uvijek nisu poznati svi čimbenici koji su u uključeni u regulaciju tih odnosa. Iako ne možemo kompletno zamijeniti pokuse s laboratorijskim životinjama, uspostavom specifičnih <i>in vitro</i> modela za generiranih memorijskih stanica analizirali smo ponašanje stanica tijekom vremena što nam je dalo bolji uvid u regulaciju imunoloških stanica <i>in vivo</i>. Zahvaljujući <i>in vitro</i>

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	modelu, možemo precizirati najpogodnije vremenske točke za analizu imunološkog odgovora, što je posljedično zamijenilo nekoliko <i>in vivo</i> pokusa. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Korištenje <i>in vitro</i> modela dobiti ćemo bolji uvid u regulaciju imunoloških stanica <i>in vivo</i> te na taj način odredili najpogodnije vremenske točke za analizu imunološkog odgovora, što posljedično rezultira smanjenjem broja životinja koje koristimo u <i>in vivo</i> pokusima infekcije. Dodatno smanjenje broja životinja ćemo postići korištenjem naprednih genetičkih modela. To će nam omogućiti vrlo precizno praćenje ponašanja stanica imunološkog sustava u našim pokusima te ćemo tako direktno moći odgovoriti na postavljena istraživačka pitanja uz smanjenje ukupnog broja pokusa. Uz to, koristimo tehnike i modele koje smo usavršili budući da imamo dugogodišnje iskustvo u istim. Na taj način se smanjuje varijacija unutar grupe što rezultira također smanjenjem broja životinja potrebnog kako bi se postigla statistička značajnost.
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.	Poboljšanje je postignuto uspostavom modela infekcije koji uzrokuju minimalni klinički utjecaj na životinje. Naš zavod dugo koristi mCMV kao model koji uzrokuje subkliničku infekciju. Također uspostavili smo i LM model za analizu CD8 T staničnog odgovora. U planiranom istraživanju za većinu planiranih pokusa očekivana razina težine postupaka je blaga, te će se u slučaju pojave boli, stresa i nelagode životinje usmrtiti na humani način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu. U pokusima s letalnom dozom LM dva put dnevno ćemo pratiti njihov izgled, ponašanje te kada se uoče simptomi boli (izoliranje iz grupe, pogrbljeno držanje, nakostriješeno krzno) životinja će biti usmrćena na human način. Na taj način pokušat ćemo svesti patnju životinje na minimum a da ne ugrozi provođenje pokusa. Budući da je radi potreba istraživanja potrebno uzeti različita tkiva ili organe, životinje će biti usmrćene na prethodno opisani način, te radi toga nije moguća rehabilitacija životinja.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	Uz to u svim pokusima će se provoditi obogaćivanje kaveza pomoću skloništa ili materijala za pravljenje gnijezda te će sa životinjama rukovati samo osobe koje su educirane za navedeno. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u individualno ventiliranim kavezima (engl. Individually ventilated cages, IVC). Na kraju svih pokusa životinje će biti eutanazirane na human način.
--	---