

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Analýza protilátkové imunitní odpovědi u C57BL/6 RHBDL4-deficientních myší

Doba trvání projektu pokusů v měsících	24
Klíčová slova	Imunizace
myš	RHBDL4
Protilátky	0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem našeho projektu je zjistit význam savčí proteázy RHBDL4 pro imunitní systém, konkrétně T-závislou protilátkovou odpověď. Fyziologická funkce tohoto proteinu v kontextu imunitního systému doposud nebyla studována. Naše předběžná data naznačují význam proteinu RHBDL4 pro funkci B lymfocytů. Cílem projektu je potvrdit či vyvrátit hypotézu, že protein RHBDL4 je důležitým faktorem fyziologické protilátkové odpovědi.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Poněvadž se jedná o primární výzkum, přínosy tohoto projektu jsou převážně dlouhodobé. Studium savčích proteinů a jejich funkcí je zásadní pro detailní porozumění buněčným procesům v lidském organismu. To je nezbytné pro výzkum aplikovaný a medicínu. U řady lidských onemocnění dosud neznáme příčinu či vhodnou léčbu. Jedním z vhodných cílů léčby jsou enzymy, jejichž funkci lze relativně snadno inhibovat. RHBDL4 je savčí serinová proteáza patřící do skupiny rhomboidů, které mohou být specificky inhibovány. Je tedy potenciálním léčebným cílem.

Protein RHBDL4 je studován jako potenciální onkogen, jehož deplece snižuje schopnost metastazování u kolorektálního karcinomu. Pokud by měl být inhibován v rámci léčby karcinomu, je třeba znát i jeho běžné fyziologické funkce, které by takovou léčbou mohly být narušeny.

Výše popsany projekt je zásadní pro zhodnocení významu proteinu RHBDL4 při fyziologické protilátkové imunitní odpovědi.

Poskytne nám velké množství dat, na základě kterých bude možné jednoznačně potvrdit, či vyvrátit naši hypotézu.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Myši budou zpravidla 2x intraperitoneálně injektovány (s odstupem 5 týdnů). Pouze 2 myši budou injektovány 3x (s odstupem 2 týdnů).

Myším bude pravidelně odebírána krev z očního plexu v celkové anestezii, 4x (s odstupem 7 dní).

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Vhodně zvolené objemy a způsoby injekcí a krevních odběrů společně s šetrnou stimulací imunitního systému a použitím anestezie by měly eliminovat nepříznivé účinky na zvířata na minimum. Neočekáváme významné nepříznivé účinky.

Očekáváme chvilkovou bolestivost při intraperitoneální injekci, v intenzitě odpovídající vpichu jehly. Následně zvýšenou citlivost v místě vpichu, která by měla pominout do několika hodin. Injekce bude podávána intraperitoneálně, takže nijak nenaruší přirozenou pohyblivost zvířete. Injekce budou aplikovány zkušenými pracovníky, aby byl eliminován stres zvířete při zákroku.

Odběr krve z očního plexu nezanechává trvalé následky a je prováděn při celkové anestezii.

Ačkoliv neočekáváme významné nepříznivé účinky imunizace, myši budou denně monitorovány a kontrolovány pro případnou ztrátu hmotnosti.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	47	0	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat			
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Po provedení pokusu budou zvířata usmrcena, aby mohly být podrobně analyzovány jejich imunitní orgány co do buněčného složení a histologie. Analýza orgánů je pro nás důležitou součástí pokusu, neboť doplňuje měření hladiny protilátek. Myši, které budou použity k přípravě standardního séra budou po provedení postupu usmrceny, aby bylo možné získat celkový objem krve.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Studium imunitních reakcí může probíhat in vitro či ex vivo, za použití buněk a tkání imunitního systému. Poznání, kterého jsme však takovým způsobem schopni dosáhnout, je limitováno a neodráží komplexní odpověď imunitního systému jako celku. V našem projektu se zabýváme protilátkovou odpovědí proti T-dependentnímu antigenu, která je důsledkem souhry řady buněčných typů, tkání a rozpustných faktorů. Vedle samotné produkce protilátek nás zajímají také související změny v imunitních orgánech. Tuto komplexní reakci není možné v úplnosti simulovat in vitro. Pokusná zvířata v naší studii proto není možné nahradit jiným, nevnímavým modelovým systémem.				
Omezení používání zvířat				
Pro tento projekt byl stanoven maximální počet zvířat: 47 myší. Provedeme nejprve pilotní studii s malým množstvím myší (10 myší). Pakliže nebude pozorován žádný rozdíl mezi zkoumanými zvířaty (wild-type vs. RHBDL4-deficient), hlavní experiment zahrnující většinu zvířat neproběhne. Během studie se snažíme maximalizovat množství informací získaných z jedné myši - provádíme opakovaná měření hladiny protilátek v čase, myši jsou opakovaně stimulovány (sekundární imunitní odpověď) a po ukončení pokusu jsou jim odebrány imunitní orgány pro podrobnou analýzu.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Myši jsou v průběhu projektu každodenně sledovány. Podané injekční objemy jsou minimální a vhodné pro myši, opakované injekce probíhají s dostatečným časovým odstupem. Odběry krve probíhají v celkové anestezii, s dostatečným časovým odstupem, v objemu vhodném vzhledem k hmotnosti zvířete. Pro stimulaci imunitní odpovědi bude použito adjuvans Alum, které obvykle nezpůsobuje vedlejší účinky a je součástí humánních vakcín. V rámci pilotní studie bude pečlivě sledován stav RHBDL4-deficientních myší po imunizaci, neboť tento typ pokusu u nich nebyl doposud proveden. Pokud by došlo ke zhoršení zdravotního stavu zvířat, budou uspana, utracena a analyzována pro příčinu.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myš je savčím modelovým organismem s dlouholetou tradicí použití a nepřeberným množstvím technik v primárním výzkumu. Umožňuje získávat poznatky, které jsou relevantní i pro lidský organismus. Zároveň, myš si pravděpodobně neuvědomuje, že je součástí pokusu, čímž pro ni tato skutečnost není stresující. Cílem našeho projektu je studium funkce savčího proteinu RHBDL4 s relevancí pro lidský organismus. Proto jsme zvolili myš jakožto ideální modelový organismus pro náš záměr.

Pro studium funkce imunitního systému je třeba, aby myši měli imunitní systém již vyvinutý a schopný imunitní odpovědi. Běžně bývají k těmto účelům používány myši ve věku 8-15 týdnů, které jsou zároveň vhodné i pro krevní odběry.