

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Interakce mikrobů s imunitním systémem střevní sliznice a její důsledky pro zánětlivá onemocnění

Doba trvání projektu pokusů v měsících

24

Klíčová slova

slizniční imunita

mikroby

zánětlivá onemocnění

0

0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

0

Translační a aplikovaný výzkum: Gastrointestinální poruchy včetně jater u lidí [PT26]

0

Cíle projektu pokusů

Hlavním cílem těchto experimentů je studovat mechanismy, jak probiotika interagují s přirozenou i adaptivní imunitou hostitele. Budeme porovnávat terapeutický účinek dvou různých probiotických *E. coli* na zvířecím modelu zánětu střeva (kolitida) a extraintestinálního zánětu (artritida) a imunitní reakce vůči těmto mikrobům (místní produkce AMP a cytokinů). Součástí projektu je také analýza, jak se tento účinek přenáší ze střeva do místa zánětu a zda mikrobiální složky, jako jsou vezikuly vnější membrány lze použít místo živých bakterií. Zaměříme se také na změny adaptivního imunitního systému - regulační a efektorové T buňky. Studovat budeme také vliv mikrobiálních složek na schopnost vrozené imunity řídit časnou stimulaci T buněk pomocí pokročilých metod experimenty in vitro.

Potenciální přínosy projektu pokusů

V současné chvíli není jasné, jak časná intervence probiotickými mikrobiy ovlivní vývoj imunitního systému a citlivost k imunitně-podmíněným chorobám, jakými jsou choroby zánětlivé, alergické a autoimunitní. Z epidemiologických dat ale vyplývá, že pro odolnost vůči těmto chorobám je nezbytná intervence v časném dětství a že ovlivnění slizničního imunitního systému střeva dokáže ovlivnit i zánětlivé procesy mimo střevo. Tyto znalosti by v budoucnu mohly vést k prevenci těchto závažných onemocnění. Získané znalosti by v budoucnu mohly vést k prevenci těchto závažných onemocnění.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Myši inbredního kmene BALB/c a C57BL/6 jsou vhodným modelem pro studium experimentálních zánětů. Myši deficitní pro významné imunomodulační molekuly (TLR4def, IL-1beta KO) jsou vhodné zejména pro detailní studium molekulárních mechanismů a myši gnotobiotické (bezmikrobní a kolonizované definovanými mikrobiy) jsou vhodné pro studium interakcí mezi mikrobiy a hostitelem. Bezmikrobní myši také umožňují přenos mikrobiomu i cílenou kolonizací jedním typem mikroba. Myši deficitní na buňky adaptivní imunity (tzv. SCID fenotyp; např. RAG2KO nebo NRG) jsou navíc vhodné pro studium vlivu adaptivní imunity (absence T a B lymfocytů a adoptivní transfer izolovaných buněk) a pro indukci transferového modelu střevního zánětu pomocí transferu buněk syngenního dárce a tak ke studiu mechanismů buněčné imunity. V letech 2021 -2023 použijeme maximálně 1000 ks zvířat všech kmenů. Tento počet je na úrovni minimálního počtu umožňující získat statisticky relevantní výsledky.

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

Orgány pro následné analýzy budou odebrány ze zdravých zvířat po eutanázii, tj. zvíře nenabude vědomí. V experimentech se střední závažností zvířata mohou pocítit déletrvající mírnou bolest a diskomfort způsobený indukci zánětu či vlivem léčby. U závažných experimentů mohou experimentální zvířata cítit déletrvající bolest a v ojedinělých případech může dojít k smrti experimentálních zvířat před vlastním ukončením pokusu (zejména v případě akutní kolitidy indukované TNBS).

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 (<i>Mus musculus</i>) [A1]	60	140	800	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 (předávkování anestetiky, oxid uhličitý, cervikální dislokace) a odevzdána do kafilerního boxu 1. LF UK pro odvoz asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Alternativní metody nám neumožňují sledovat tak komplexní fyziologické, imunologické a metabolické děje, jakými je interakce mikrobiomu s imunitním systémem a vliv této interakce na prostředí zánětlivého infiltrátu, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy.				
Omezení používání zvířat				
V rámci celého projektu použijeme maximálně 1000 ks myší. Zvířata budou používána v minimálních počtech, které umožní statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami. Pokud to bude možné, tak budou sdíleny vzorky získané v experimentech. Spojení studia různých forem zánětu řešené v rámci projektu umožní nejen neobvyklé synergie, ale i redukci počtu zvířat. Plánování paralelních experimentů, jak je popsáno výše, dále umožní redukci zvířat. Analýzou většího počtu parametrů najednou (použití moderních, citlivých metod) docílíme další redukce potřebného počtu zvířat. Vlastní zkušenosti s podobným typem experimentů a údaje v literatuře nám umožnily naplánovat minimální počet zvířat, která potřebujeme k dosažení signifikantních výsledků.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Veškerá manipulace se zvířaty bude co nejohleduplnější a co nejméně narušující přirozené potřeby zvířat. Složitější manipulace budou probíhat v celkové anestezii.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myši inbredního kmene BALB/c a C57BL/6 jsou vhodným modelem pro studium experimentálních zánětů. Myši deficitní pro významné imunomodulační molekuly (TLR4def, IL-1beta KO) jsou vhodné zejména pro detailní studium molekulárních mechanismů a myši gnotobiotické (bezmikrobní a kolonizované definovanými mikroby) jsou vhodné pro studium interakcí mezi mikroby a hostitelem. Bezmikrobní myši také umožňují přenos mikrobiomu i cílenou kolonizaci jedním typem mikroba. Myši deficitní na buňky adaptivní imunity (tzv. SCID fenotyp; např. RAG2KO nebo NRG) jsou navíc vhodné pro studium vlivu adaptivní imunity (absence T a B lymfocytů a adoptivní transfer izolovaných buněk) a pro indukci transferového modelu střevního zánětu pomocí transferu buněk syngenního dárce a tak ke studiu mechanismů buněčné imunity. Expozice probiotickým mikrobům časně po narození je nezbytná pro studium vlivu mikrobů na vyvíjející se imunitní systém a citlivost k zánětlivým chorobám v dospělosti, což také napovídají naše předchozí zkušenosti s těmito modely. V ostatních modelech nemocí budou použity dospělá zvířata (6-8 týdnů).