

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Malé proteiny blokující dráhu IL-23/IL-17 jako inhibitory střevního zánětu sekretované probiotickými bakteriemi

Doba trvání projektu pokusů v měsících

36

Klíčová slova

zánětlivé onemocnění střeva

malé vazebné proteiny

Lactococcus lactis

0

0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

Translační a aplikovaný výzkum: Poruchy imunity u lidí [PT28]

0

0

Cíle projektu pokusů

Ověřit účinek blokátorů IL-17/IL-23/IL-22 na průběh akutní kolitidy monitorováním klinického stavu a hodnocením vybraných imunologických a histologických parametrů.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Navržené experimenty pomohou identifikovat vhodné vazebné blokátory schopné inhibovat prozánětlivé signální dráhy IL-17/IL-23/IL-22 a mohou tak přispět k návrhu efektivnější terapie akutní kolitidy, jejíž forma založená na aplikaci modifikovaných Lactococcus lactis, které inhibitory uvolňují do lumen střeva, je slibnou neinvazivní cestou léčby.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

U zvířat bude chemicky indukována akutní kolitida (dextranulfát sodný v pitné vodě nebo trinitrobenzensulfonová kyselina rektální aplikací) a její průběh bude modifikován podáním rekombinantních proteinových inhibitorů IL-17/IL-23/IL-22 ve formě solubilních proteinů nebo ve formě vektorů - probiotických bakterií Lactococcus lactis. Aplikace testovaných terapeutik bude formou gaváže, orální, v pitné vodě u laktokoků a solubilních inhibitorů a ve formě intraperitoneální injekce u solubilních inhibitorů. Experimentální akutní kolitida bude u každého zvířete navozena pouze jednou a doba experimentu bude podle modelu od 6 do 21 dnů.

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

Indukcí akutní kolitidy dojde u zvířat k redukci hmotnosti, průjmu a případně mírnému krvácení. Tentostav bude trvat dle plánu od 5 do 20 dnů.

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	0	620	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 ukončení postupu budou zvířata usmrcena.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Experiment na zvířeti je nezbytný, neboť neexistuje žádný alternativní in vitro prediktivní model, který by umožnil spolehlivě předpovědět efekt vazebných blokátorů na průběh a závažnost akutní kolitidy a změny v imunologických a histologických parametrech.				
Omezení používání zvířat				
Budou použity inbrední linie myší, čím se zabezpečí snížení genetické variability a maximální homozygotnost zvířat, a tím se sníží počet zvířat pro daný pokus.				
Zvířata budou v SPF kvalitě a tím se zabezpečí snížení rizika modifikace výsledků v důsledku onemocnění.				
Experimenty byly konzultovány s dalšími laboratořemi LF UP Olomouc a byla nabídnuta možnost využití orgánů z myších kadaverů v době ukončení experimentů. Konkrétně budou využity kostní dřeně pro izolaci dendritických buněk.				
Do jednotlivých pokusných skupin bude řazen minimální možný počet zvířat, což podle statistické predikce počítané ze standardní deviace při použití t-testu a hodnotě prahu významnosti 0,05 odpovídá 5 až 8 kusům na jednu skupinu (Festing M and Altman D. ILAR J. 2002 43(4):244-58; Dell et al., ILAR J. 2002 43(4):207-13).				
Iniciální skrínovací experimenty REX-, ILP-, ARS-, Fynomer-, IL-22R1-vážíci proteiny a IL-22 exprimované z LAB, neošetřené kontroly - celkem 13 skupin preparátů (v průměru dva nejlepší preparáty za každou skupinu) bude testováno ve třech cestách administrace (gavage, orální, v pitné vodě) a dva druhy myší pro DSS model (BALB/c a C57BL/6JOlaHsd) celkem 390 myší (při 5				
Šetrné zacházení se zvířaty				
S laboratorními zvířaty se nakládá dle pravidel uvedených v zákonu č. 359/2012 a vyhlášce č. 419/2012, kde je jasně vymezen způsob o nakládání s laboratorními zvířaty. Jednotlivé experimentální pokusy – indukce akutní kolitidy a odběr biologických vzorků jsou jen mírně bolestivé zákroky a tyto budou prováděny podle standardů práce s laboratorními zvířaty. Zákroky, při kterých bude použita sonda do žaludku nebo přes rektum do střeva, budou prováděny v celkové anestezii. Terminální odběr krve a vybraných orgánů bude proveden v celkové anestezii. Myši budou denně monitorované veterinárním lékařem a nebudou cíleně vystavené utrpení. V případě trvalého poškození zdravotního stavu myši v průběhu pokusu bude zvíře humánně utraceno. Postupy plánované v experimentu zahrnují jak neinvazivní metody (aplikace blokátorů/bakterií v pitné vodě), tak i mírně invazivní metody (indukce akutní kolitidy aplikací TNBS trubičkou přes rektum, aplikace bakterií sondou do žaludku, vpichy injekční jehly). Mírně invazivní metody budou prováděny v celkové anestezii (ketamin-xylazin - myš intraperitoneálně ketamin 80 mg/kg + xylazin 15 mg/kg. Techniky odběru krve jsou minimálně invazivní a proto není nutné použít znecitlivění nebo anestezii. Terminální odběr krve (terminální vykrvení z axilárních cév) a vybraných orgánů bude proveden v celkové anestezii. Po ukončení odběru všech vzorků				
Použití druhů zvířat - vysvětlení				

Malá laboratorní zvířata představují klíčový model studia procesů zahrnutých ve vývoji akutní kolitidy. Ačkoliv vývoj nemoci u zvířecích modelů neodpovídá přesně mechanismu pozorovaného u lidí, využití myších modelů představuje nejefektivnější způsob, jakým studovat patogenezy onemocnění a hodnotit účinnost možných terapeutických postupů. V experimentu budou využity laboratorní myši BALB/c nebo C57BL/6JOlaHsd (18 - 22 g, 620 ks).