

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Mapovanie imunogenicity glykoproteínu S koronavírusu SARS-CoV 2 (COVID-19)

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): koronavírus, imunogenicita, povrchový glykoproteín S, bunková a humorálna odpoveď

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Cieľom predkladaného projektu je získať imunologické informácie o novom koronavíruse (COVID 19), napr. informácie o imunogénnych epitopoch vyvolávajúcich protilátkovú alebo T bunkovú odpoveď, ktoré by mohli byť nápomocné vo vývoji špecifickej terapie. Snahou vedeckej komunity je lepšie porozumieť tomuto novému vírusu, získať kontrolu nad jeho šírením, zacieliť terapiu na kľúčové epitopy a poskytnúť tak efektívnu ochranu pred týmto novým koronavírusom. Navrhli sme 10 peptidov derivovaných z proteínu S. Uvedenými peptidmi budeme imunizovať myši a následne analyzovať imunitnú odpoveď. Protilátky získané po imunizácii budeme používať na mapovanie imunogenicity povrchového glykoproteínu S. Zároveň využijeme vhodné bunkové modely a budeme študovať vplyv vytvorených protilátok na väzbu proteínu S na povrch buniek. Okrem protilátkovej odpovede budeme študovať aj bunkovú imunitu indukovanú peptidmi. Pokusy na myšiach sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Prínos z vykonaného projektu:

Získané výsledky by mohli odhaliť epitopy na povrchu proteínu S, ktorý je zodpovedný za vstup vírusu do bunky. Blokovanie takýchto úsekov by mohlo byť jedným z terapeutických prístupov v boji s koronavírusom.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 100 samíc myši Balb/c a 100 samíc myši C57BL/6NCrl (vo veku približne 6 týždňov).

Kmeň BALB/c je vhodný na generovanie protilátkovej odpovede. Naopak na štúdium bunkového typu imunity (T- a B- bunky) sú vhodné C57BL/6NCrl myši.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Nepredpokladáme nepriaznivý vplyv imunizácie na zvieratá, keďže budeme podávať krátke syntetické peptidy konjugované na nosič. Zvieratám bude 3x subkutánne aplikovaný testovaný antigén, 10 dní po poslednej dávke im bude odobratá krv v miernej sedácii z retroorbitálneho plexu s cieľom stanoviť imunogénne peptidy, t.j. stupeň špecifickej protilátkovej odpovede indukovanej jednotlivými peptidmi. Na konci experimentu budú zvieratá humane usmrtené v celkovej anestézii vykvrvením, s následným odberom sleziny.

Zvieratá po injekcii antigénu, a tiež pri odbere krvi sú monitorované a v prípade neadekvátnej reakcie ako nar. výrazná triaška, apatia a pod. sa upovedomí veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point:

Human end point:

	Prejav	Skóre			
1	Akýkoľvek stav vedúci k dlhotrvajúcej alebo nezvratnej neschopnosti prijímať potravu alebo vodu (dlhodobá nehybnosť, letargia...)	0	1	2	3
2	Stavy, ktoré poukazujú na silnú bolesť, strach alebo utrpenie (autoindukovaná trauma, hrbenie, vokalizácia, abnormálne pohyby, otvorené rany,...)	0	1	2	3
3	Rýchla alebo pretrvávajúca strata hmotnosti (>15% očakávanej hmotnosti)	0	1	2	3

4	Zovšeobecnené zníženie starostlivosti a abnormálny vzhľad počas dlhého časového obdobia (naježená srst', rozsiahla alopecie, ...)	0	1	2	3
5	Ťažké alebo pretrvávajúce ťažkosti s dýchaním	0	1	2	3

Hodnotenie:

0 - bez príznakov

1 - mierny príznak

2- stredne silný príznak / konzultácia s veterinárnym lekárom

3- silný príznak -eutanázia

Každý znak sa zhodnotí na základe bodovania 0-3, pričom 0-bez príznakov, 3- silný príznak. Výsledné skóre je súčtom jednotlivých pozorovaných príznakov.

Každé zviera, ktoré bude prejavovať stredne silný príznak bude presunuté do kletky s neobmedzeným prístupom ku krmivu a tekutinám, bude neustále monitorované a jeho stav bude konzultovaný veterinárnym lekárom. Každé zviera prejavujúce silný príznak v ktoromkoľvek prejave, prípadne pri súčte bodov viac ako 8, bude vyradené z experimentu a humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Váženie zvierat – slabá

Značenie zvierat tetovaním – stredná

Krátkodobá fixácia, subkutánna injekcia/opakovaná 3x, v 2 a 3 týždňových intervaloch – stredná

Stav zvierat počas obdobia prežívania- slabá až stredná

Odber krvi (retroorbitálny plexus) v miernej sedácii – stredná

Usmrtenie v anestézii vykvrvením - slabá

Zohľadnenie 3R:

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Počet zvierat v chovnej nádobe zohľadňuje normy dané zákonom. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. Vo zverinci je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieraťa.

Bezprostredne po aplikácii môžeme u niektorých jedincov pozorovať miernu apatiu alebo naopak zvýšenú aktivitu, ktorá odznejie v priebehu pár minút. Pri pretrvávajúcich príznakoch (triaška), zviera oddelíme a umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. Zvieratá sú pravidelne monitorované a hodnotené na základe bodového skóre, v prípade pretrvávajúcej neadekvátnej reakcie sa upovedomí veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere. V jednotlivých skupinách bude maximálne 5 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje variabilitu imunitnej odpovede.

Nahradenie:

Vzhľadom na fakt, že špecifické protilátky vznikajú po imunizácii zvierat, nie je tieto možné nahradiť in vitro systémami.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Nenašli sme žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Začiatkom roka 2020 sa rozšíril nový koronavírus z Číny do celého sveta a spôsobil tak celosvetovú pandémiu. K dňu 4. 4. 2020 bolo zaznamenaných 1 133 969 pozitívnych prípadov spôsobených týmto vírusom a infekcii podľahlo 60 409 osôb. Keďže sa tento vírus objavil len nedávno, nie sú v súčasnosti k dispozícii žiadne imunologické informácie (napr. informácie o imunogénnych epitopoch vyvolávajúcich protilátkové alebo T bunkové odpovede), ktoré by mohli byť nápomocné vo vývoji špecifickej terapie. Snahou vedeckej komunity je lepšie porozumieť tomuto novému vírusu, získať kontrolu nad jeho šírením, zacieliť terapiu na kľúčové epitopy a poskytnúť tak efektívnu ochranu pred týmto novým koronavírusom. Vzhľadom k súčasnému stavu je prínos projektu nad utrpenie zvierat. Utrpenie/ stres zvierat sa snažíme v projekte znížiť na najnižšiu možnú mieru. Subkutánna aplikácia imunogénu trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá maximálne jednu minútu a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Experiment sa ukončí vykvrvením zvierat a v celkovej anestézii a následným odobratím sleziny.

Začiatok pokusu je plánovaný na 29.4.2020 a bude sa realizovať do konca roka, tj. do 31.12.2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

V projekte nebudú použité GMO zvieratá.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.).