

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Príprava hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky s využitím v diagnostike neurodegeneračných ochorení.

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): monoklonálne protilátky, tau proteín, Alzheimerová choroba, produkcia protilátok

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Predkladaný projekt bude zameraný na prípravu monoklonových protilátok namierených voči rôznym formám proteínov, ktoré sú charakteristické pre najzávažnejšie neurodegeneračné ochorenia, vrátane Alzheimerovej choroby. Imunizácia patologickými formami vybraných proteínov navodí u experimentálnych myší imunitnú odpoveď. Slezinové bunky myši budú použité na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky.

Prínos z vykonaného projektu:

Získané monoklonové protilátky voči epitopom zodpovedným za patologické procesy umožnia zostaviť špecifické testy s vysokým selektívnym potenciálom.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 100 myší Balb/c (samice) vo veku približne 6 týždňov.

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

Zvieratám bude opakovane subkutánne aplikovaný testovaný antigén, cca 2 týždne po poslednej dávke im bude odobratá krv v miernej sedácii z retroorbitálneho plexu. Následne v rôznych časových intervaloch budú humane usmrtené v celkovej anestézii dislokáciou krčných stavcov.

Zvieratá po injekcii antigénu, a tiež pri odbere krvi sú monitorované a v prípade pretrvávajúcej neadekvátnej reakcie 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 3-5x, v mesačných intervaloch – stredná

Stav zvierat počas obdobia prežívania- slabá až stredná

Odber krvi (retroorbitálny plexus) v miernej sedácii – stredná

Usmrtenie v anestézii dislokáciou krčných stavcov - 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 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 prísť k humánnemu usmrteniu zvierat'a.

Bezprostredne po aplikácii môžeme u niektorých jedincov pozorovať miernu apatiu alebo naopak zvýšenú aktivitu, ktorá odznej 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:

Hybridómová technológia prípravy monoklonových protilátok vyžaduje použitie splenocytov imunizovaných zvierat ako zdroj plazmatických buniek produkujúcich protilátky špecifické pre daný proteín. Vzhľadom na fakt, že špecifické protilátky vznikajú po imunizácii zvierat, nie je tieto možné nahradiť in vitro systémami.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Predkladaný projekt bude zameraný na prípravu monoklonových protilátok namierených voči rôznym formám proteínov, ktoré sú charakteristické pre najzávažnejšie neurodegeneračné ochorenia, vrátane Alzheimerovej choroby. Získané monoklonové protilátky voči epitomom zodpovedným za patologické procesy umožnia zostaviť špecifické testy s vysokým selektívnym potenciálom. Spresnenie diagnostiky prostredníctvom špecifických monoklonových protilátok, vznikajúcich hybridómovou technológiu s využitím splenocytov imunizovaných zvierat, umožní v konečnom dôsledku cieľnú terapiu daných ochorení.

Počas opakovanej aplikácie antigénu neočakávame nepriaznivý vplyv na zvieratá, subkutánna aplikácia imunogénu trvá niekoľko sekúnd, zvieratá reagujú na podanie antigénu dobre, krátko po

aplikácii sa môže objaviť mierna triaška, ktorá odozve v priebehu pár minút, zvieratá sú bezprostredne po aplikácii sledované až do zotavenia, v mieste vpichu sa môže taktiež objaviť mierne zdurenie, vzhľadom k mesačnému intervalu medzi jednotlivými aplikáciami iné príznaky neočakávame

Odber krvi trvá maximálne jednu minútu a vykonáva sa na sedovaných zvieratách z retroorbitálneho plexu.

Dlhodobé prežívanie zvierat – počas dlhodobého prežívania zvierat, zvieratá okrem bežnej manipulácie nebudú vystavené už žiadnym postupom, nepredpokladáme negatívne zmeny na zdravotnom stave z dôvodu aplikovaného antigénu, môžu sa prejavovať len bežné príznaky starnutia, zvieratám bude denne monitorovaný zdravotný stav a hodnotené bodové skóre, v prípade neočakávaných zmien sa upovedomí vet. lekár a vedúci experimentu aby sa rozhodlo o prípadnom vyradení zvierat'a z experimentu a jeho predčasnom usmrtení cervikálnou dislokáciou v celkovej anestézii.

Experiment sa ukončí odobratím sleziny imunizovaného zvierat'a v celkovej anestézii za účelom získania plazmatických buniek na prípravu hybridómov najmenej tri mesiace od poslednej dávky a najviac rok po poslednej dávke.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.3.2020 a bude sa realizovať v priebehu necelých troch rokov, do 31.12.2022.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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