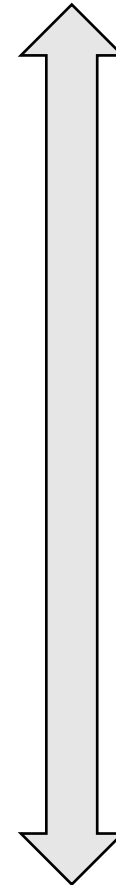


Projekt a pokus v biomedicínském výzkumu

Vědecký projekt - záměr

- **základní věda** – jak co funguje, např. role jednotlivých komponent v systému, **publikace**
- **aplikovaná věda** – jak něco využít v praxi, **nové léky, postupy, materiály**
- **klinika** – jak spolu souvisí jednotlivá pozorování, diagnostika, sběr dat, klinické testy, podnět nebo podpora pro zákl. a apl. výzkum, **nová léčba**
- **výzkum x vývoj (R&D)**



Transfer of knowledge
Transfer of technology

Kde se dělá věda

- Univerzity
- Výzkumné instituce – AV ČR
- Klinická pracoviště – fakultní nemocnice
- Biotech firmy – Johnson and Johnson (JLABS), „inkubátory“
- Vědecko - technologické parky - JAIP

Kdo co financuje

- VaVal – Věda a Výzkum a Inovace
- vládní agentury – GAČR (základní), TAČR (aplikovaný), AZV (medicínský)
- EU – přes MŠMT, Horizon 2020, ERC, Norské fondy
- Neziskový sektor – nadace (Bill Gates – výzkum malárie)
- Soukromý sektor – firmy, většinou vlastní vývoj, hledání potenciálních investic, potřeba již připraveného produktu

Jak si vybrat projekt?

- Vlastní záměr
 - Chci najít lék na rakovinu, Alzheimerova,...
 - Zajímá mě, jak funguje lidské vědomí, regenerace,...
 - Fascinuje mě mikrosvět lidského těla, genetika, biochemie,...
- Okolnosti, možnosti
 - Co se studuje na mé univerzitě
 - Jaké je k dispozici vybavení
 - Jaké jsou finanční možnosti
- Zájem x možnosti – výběr univerzity, oddělení, laboratoře

Navržení a průběh projektu

1. Definice problému, objekt řešení – obecný x konkrétní
2. Znalost problematiky – „literature search“
3. Navržení cílů projektu
4. Navržení metodiky sběru dat - pozorování, modelování, experiment, průzkum
5. Navržení pokusu
6. Pokus
7. Vyhodnocení dat
8. Interpretace (výklad) dat → navržení nových cílů
9. Prezentace dat
10. Závěr

Jak začít?

Záměr, velké téma



Prostudovat téma
„Literature search“



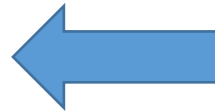
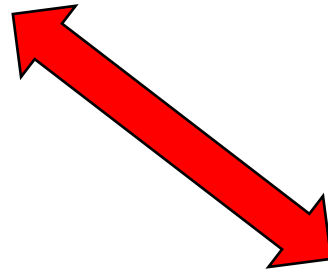
Zaměření na konkrétní část
problematiky



Stanovit cíle projektu

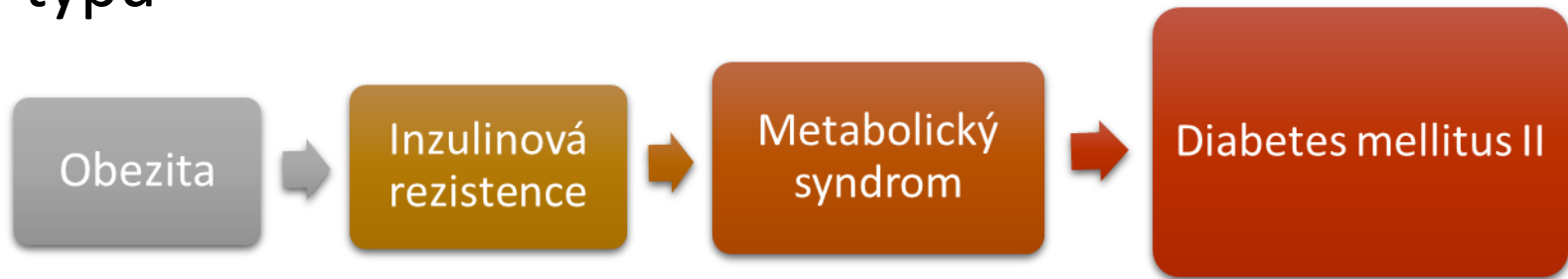
SET GOALS

- 1.
- 2.
- 3.



Příklad – studium cukrovky druhého typu

- Zajímá mne, jak zabránit rozvoji cukrovky druhého typu



- Zaměřím se na rozvoj inzulínové rezistence při obezitě
- Hraje roli zánět v tukové tkáni – důležitá role makrofágů, T buněk
- Moc se neví o vlivu žírných buněk – ovlivňují zánět, mohou hrát roli ve vývoji inzulínové rezistence při obezitě?
- Projekt – Role žírných buněk v rozvoji inzulínové rezistence

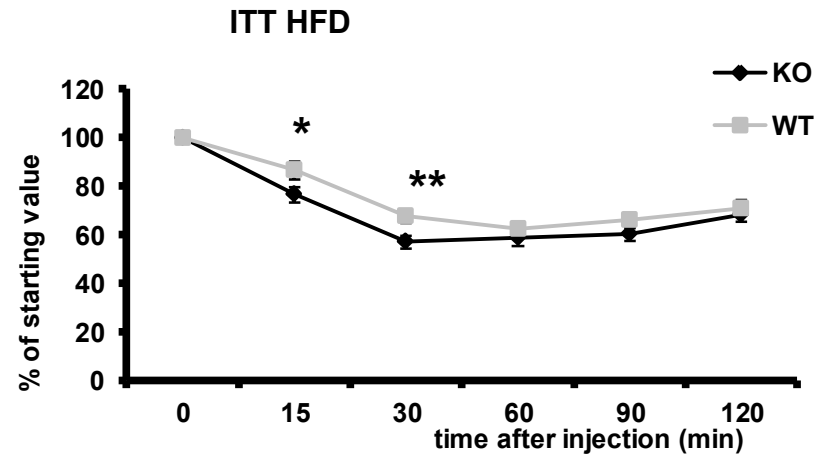
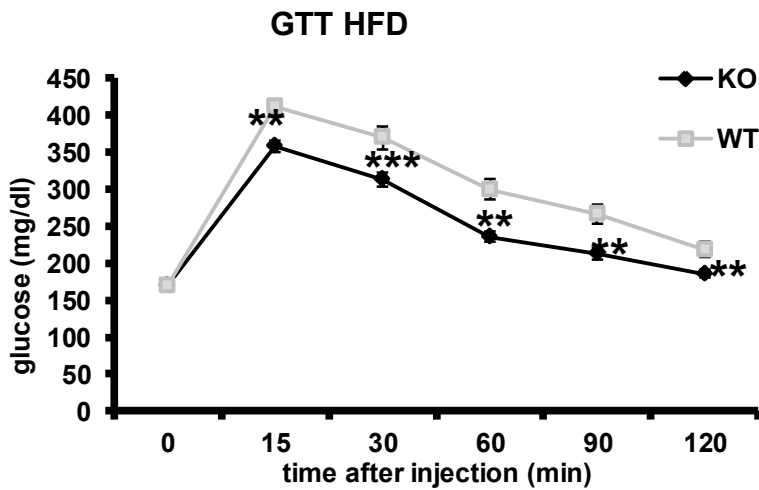
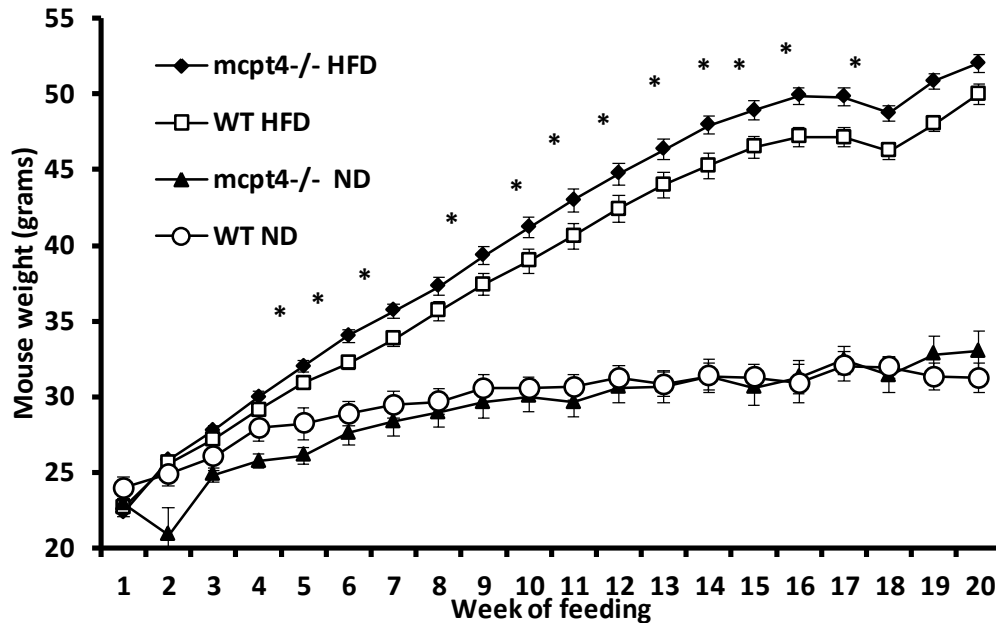
Jak na to?

- Stanovit cíle projektu
 - Zjistit, zda se mění obsah ŽB v tukové tkáni během obezity
 - Zjistit, jestli nepřítomnost ŽB ovlivní vývoj IR
- Zjistit, jaké modely a metody použít – literatura, zkušenosti, dostupnost (možnost alternativ)
- Co potřebuji sledovat a měřit?
- Jak nejlépe postupovat? Co je třeba zjistit nejdřív, od čeho se odrazit?

Postup

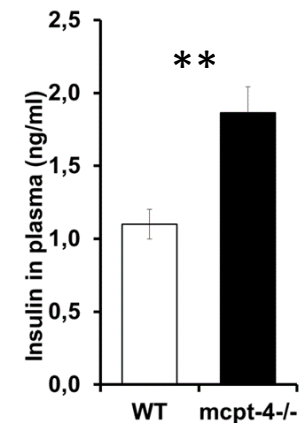
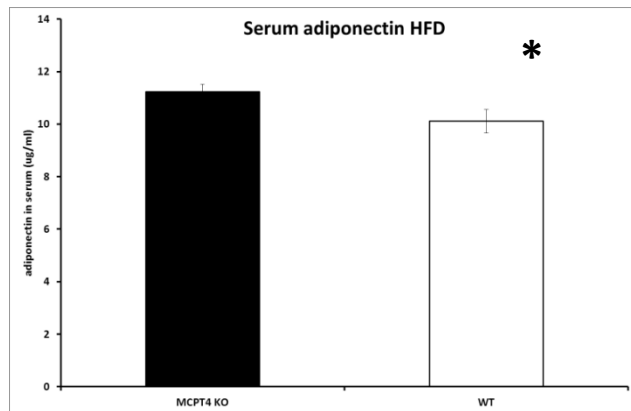
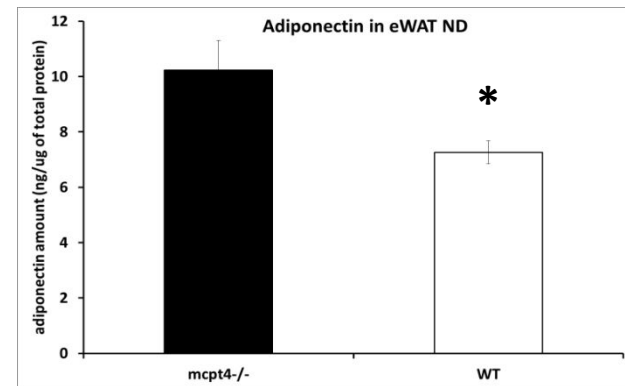
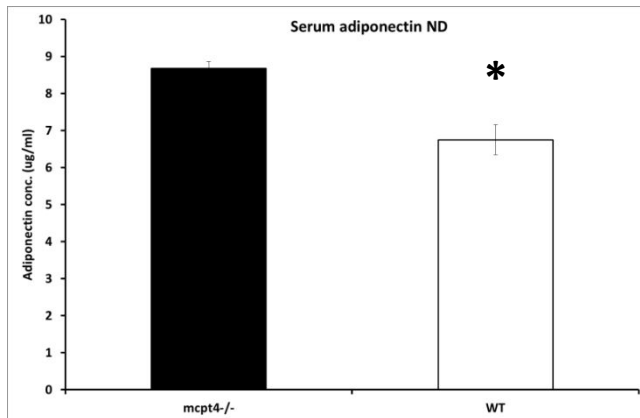
1. Potřebuju model obezity – db/db, Diet Induce Obesiy (DIO)
2. Nechám normální myši (C57BL/6) ztloustnout
 - váha, glukózová tolerance, inzulinová rezistence, hladiny cholesterolu, triglyceridů, volných mastných kyselin, inzulinu
 - analýza tukové tkáně na přítomnost ŽB – cytometrie, histologie, qPCR na specifické markery ŽB
 - **hubená kontrola pro porovnání – NEGATIVNÍ KONTROLA!!!**
 - Zjištění – tlusté myši mají víc ŽB v tukové tkáni
3. WT x ŽB deficientní myši
 - stejný pokus DIO, normální strava u obou kmenů jako kontrola (4 skupiny myši v jednom pokusu)

Nepřítomnost ŽB vede k vyšší hmotnosti myši, ale k lepší IR



Čím to?

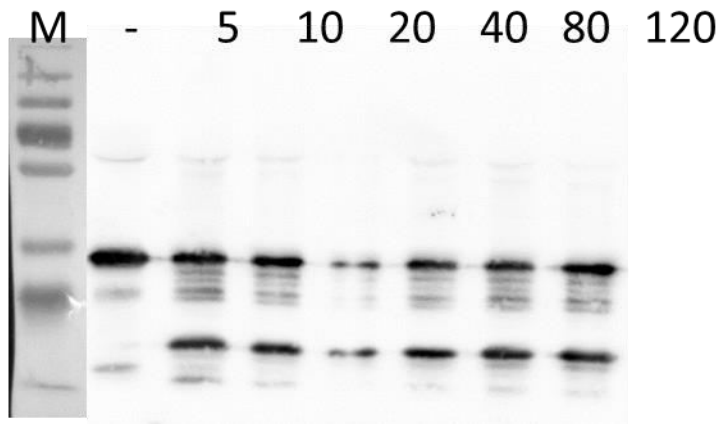
- Záněť tukové tkáně – žádný rozdíl
- Vliv na hormony a cytokiny – víc adiponektinu a inzulinu



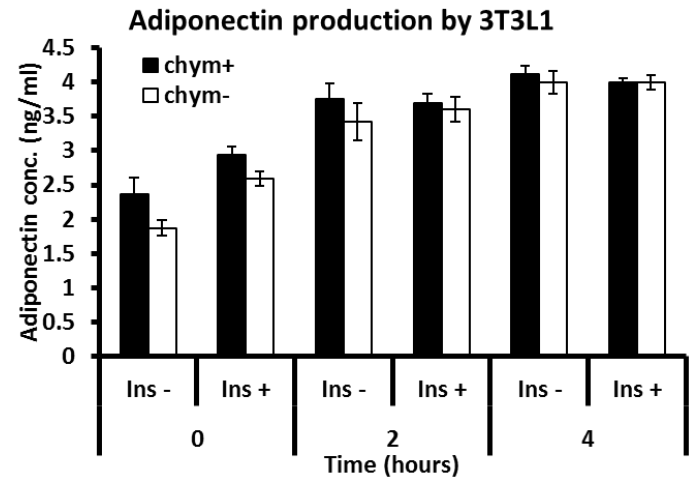
Další otázka – jak můžou ŽB ovlivnit produkci inzulinu a adiponektinu

- ovlivnění produkce adipocyty – *in vitro* pokus – nic
- Vliv na adiponektin

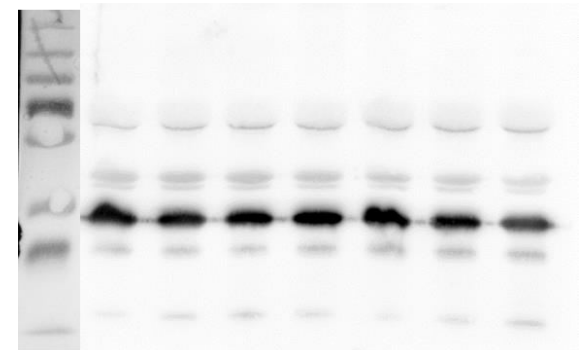
extrakt z ŽB – kultivace ŽB, aktivace, supernatant



Něco to štěpí – chymáza, tryptáza



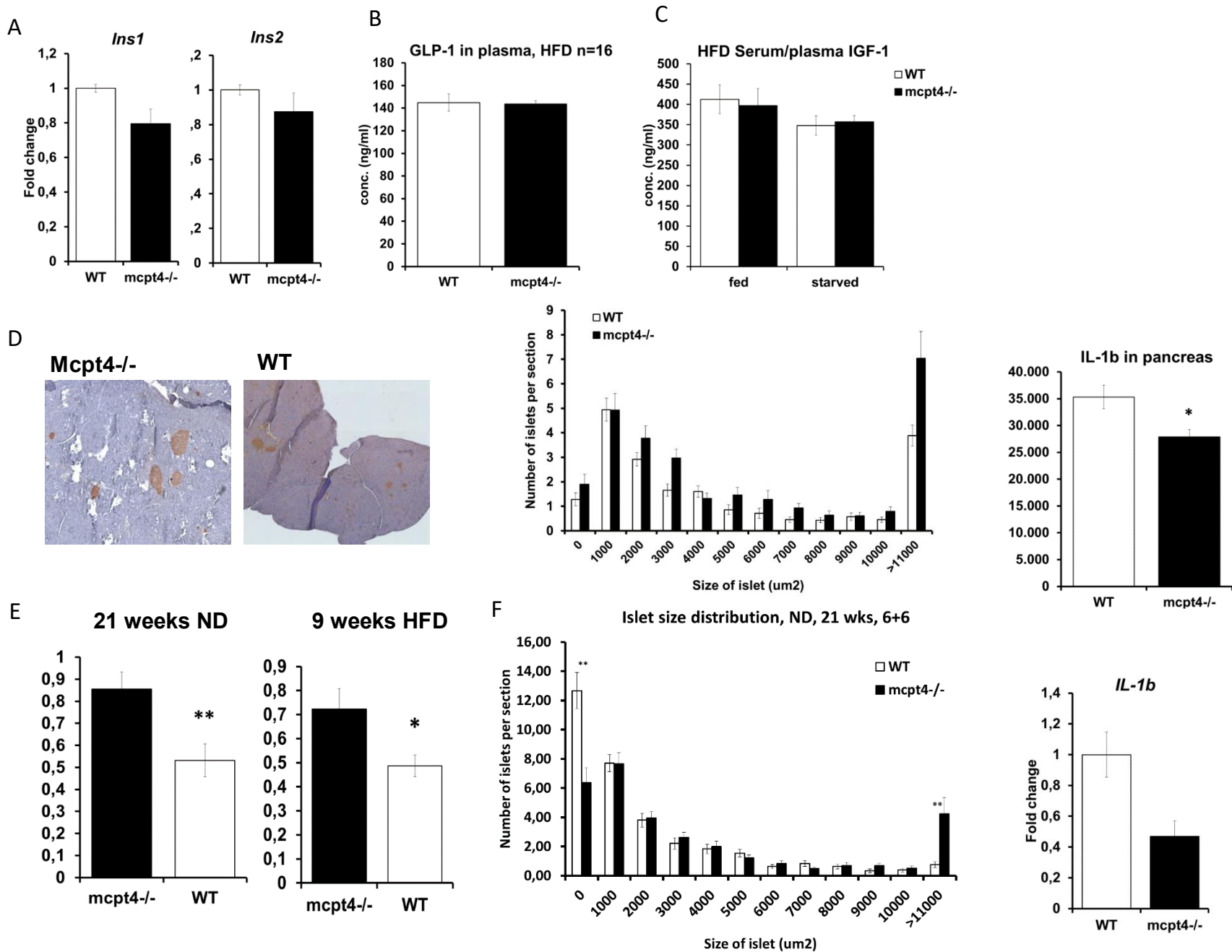
inhibitor chymázy zabrání štěpení



Aha!

- chymáza štěpí Adiponektin
- že by ten fenotyp byl chymázou?
- → Myši deficientní na chymázu
- → Podobný fenotyp jako MC def

Co inzulin?



Výsledky

- chymáza z ŽB negativně ovlivňuje vývoj IR degradací adiponektinu
- MC pomáhají udržovat zánět v pankreatu, který vede k destrukci beta-buněk a ke snížení hladiny inzulinu
- cíle byly naplněny, projekt se buď ukončí nebo posune dál

Obecné principy

1. Neustále konfrontovat výsledky s literaturou
2. Čím začít?
 - ***In vivo*** – porovnání různých myších genotypů v konkrétním modelu – vidím rozdíl, jdu najít mechanismus
 - ***In vitro*** – mám nějakou látku, chci zjistit co dělá → vyzkouším na buňkách, postoupím na organismální úroveň
 - **klinika** – vidím nějakou korelaci (množství ŽB koreluje s intenzitou inzulinové rezistence), zkusím ověřit experimentálně
3. Najít vhodný model

Experimentální model – in vivo

- Metoda, jak navodit stav, podobný nemoci
 - MOG-EAE – model roztroušené sklerózy
 - injekce krystalků močoviny do kloubů – Dna
 - intranasální aplikace LPS – akutní infekce (zánět) plic
 - Indukovaná obezita vysokotučnou dietou – IR
 - Streptozotocin – destrukce beta buněk - diabetes
- Použití geneticky modifikovaných organismů
 - ApoE myši – Ateroskleróza
 - db/db, Ob/ob myši – diabetes
 - imunodeficientní myši - SCID
 - Deficience různých enzymů – různé metabolické choroby (osteoporóza, artritida, rakovina,...)
- Kombinace obou

Experimentální model – *in vitro*

- Pokusy s tkáňovými kulturami
 - imortalizované linie – rakovinné buňky, jiný fenotyp
 - primární buňky – lepší, ale náročnější (*ex vivo*)
- Zkoumání jevu, který se účastní určité patologie
- Aktivace, cytotoxicita, produkce, exprese genů, migrace, chemotaxe, adheze, agregace, signální dráhy
- mechanistické studie – jaký je mechanismus určitého jevu (molekulární interakce, použití inhibitorů, „záchranné“ rescue experimenty) – náročné na správné navržení pokusu

Experimentální model – *in silico*

- *in silico* – v počítači
- modelování
 - interakce proteinů, léků
 - predikce – signální peptid, glykosylace, epitopy, fosforylace, metylace, acetylace, atd.
 - struktura molekul a jejich vazebných míst – Fold-it, Rosetta
- Predikci je třeba ověřit experimentálně

Fold-it

<https://fold.it/>

The screenshot displays the Fold-it game interface. At the top, a status bar shows "Pull Mode" on the left, and "Rank: 4" and "Score: 11459.528" in the center. Below the score, it indicates "Soloist" and "399: Design the Interface 6b". On the right side of the top bar, there are options for "Group Competition" and "Soloist Competition".

The main area features a 3D protein structure rendered in a stick representation, with different parts colored in light grey, orange, blue, and green. The structure is complex and multi-domain.

On the left side, there is a vertical "Cookbook" menu. At the bottom, a navigation bar includes "Actions", "Undo", "Social", "Modes", "Behavior", "View", and "Menu".

On the right side, there is a chat window. It shows a list of chat channels: "Chat - Group" and "Chat - Puzzle", both with "auto show" options. The chat history includes a message from "CFC: aunt, can I not count, or did you have 2 additions on one and 2 on the other?", a response from "auntdeen_irc: angle of shot - hold on, was 3/2", and a reply from "CFC: ok". There is a "Send" button and a microphone icon at the bottom of the chat window.

At the bottom right, there are additional chat options: "Chat - Global" and "Notifications", both with "auto show" options.

Vedení laboratorního deníku

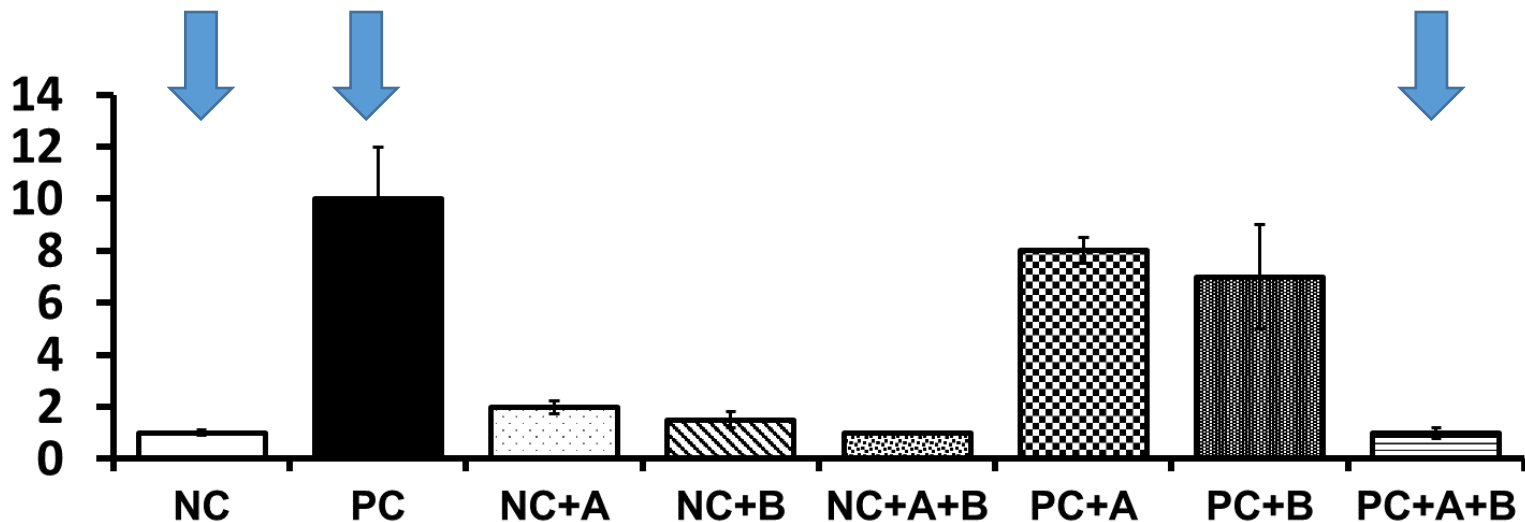
- Obsah, pro každý projekt samostatný deník
- Každý pokus, každá analýza
 - Datum, název, protokol, chemikálie, materiál, koncentrace, časy, změny oproti protokolu, výsledky, obrázky, všechny výjimečnosti, chyby, podivnosti
- **Každá maličkost může být důležitá**
- Za měsíc si nepamatujete nic!
- Majetek ústavu, laboratoře – mohou chodit kontroly
- GLP – Good laboratory practice

Navržení pokusu - optimalizace modelu

- vhodné buňky (zvířata)
- médium, roztoky, chemikálie (**pozor na různé výrobce stejných produktů**)
- doba inkubace, aktivace
- koncentrace látek – aktivátory, inhibitory
- vhodné časy pro analýzu (dostatek analytu ve vzorku)
- Většinou jsou k dispozici protokoly, je však nutné každý protokol ověřit pro každou laboratoř – jiné vybavení, jiné chemikálie, jiné ruce
- Vhodné kontroly

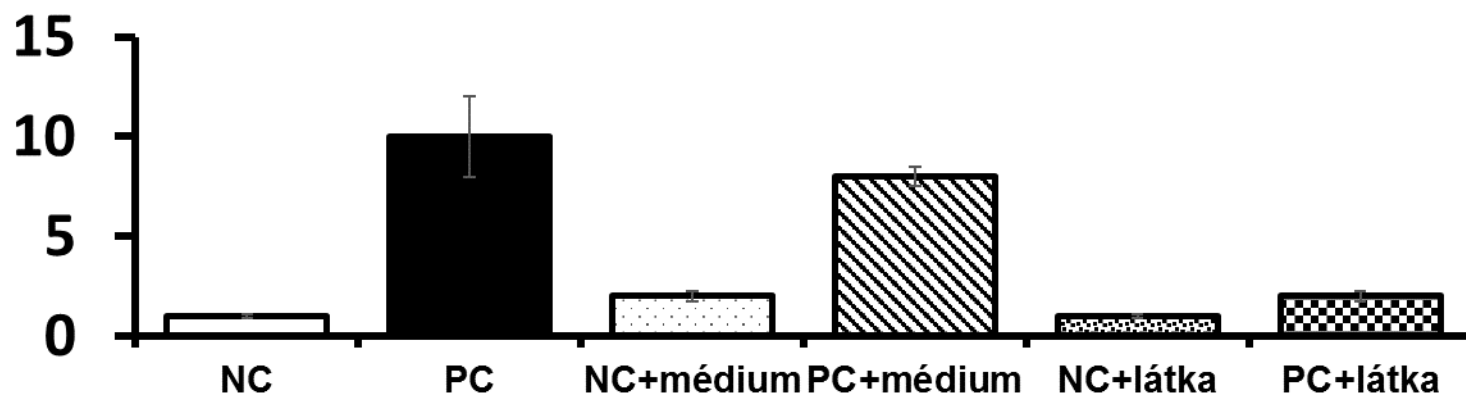
Kontroly

- Negativní kontrola – výchozí, normální stav (neaktivované buňky, normální myši – Wild type)
- Pozitivní kontrola – ověření, že model funguje, vyloučení technických artefaktů
- Ostatní (vnitřní) kontroly
- Příklad 1: Působí látky A a B synergicky?



Příklad 2

- Působení látky na buňky



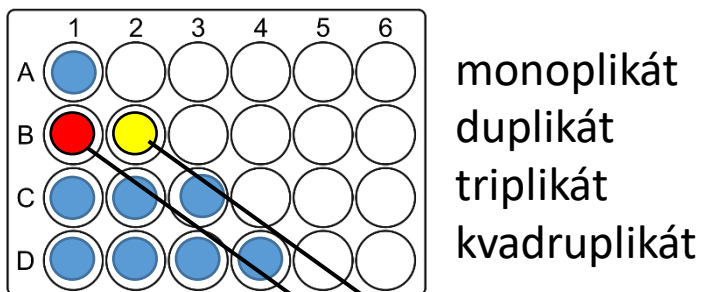
- Správné kontroly jsou základ experimentu!!!

Opakování

- **opakované měření** - není replikát!!!
- **technický replikát** – kontrola chyby pipetování
- **biologický replikát** – jediný údaj pro statistické vyhodnocení
 - v rámci jednoho pokusu
 - nezávislý pokus
- u biologických systémů obvykle 3 nezávislé pokusy, *in vivo* minimálně 2
- Potřeba získat důvěryhodná data

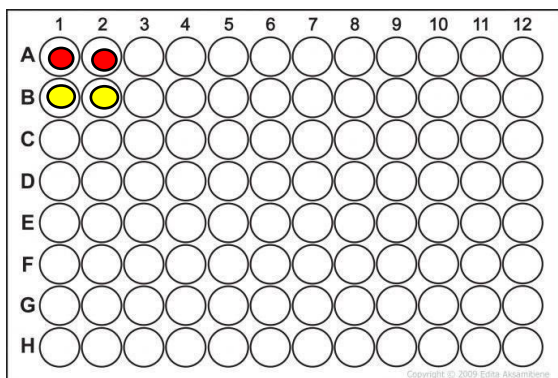
Opakování - replikace

Pokus 1 Biologický replikát v rámci pokusu

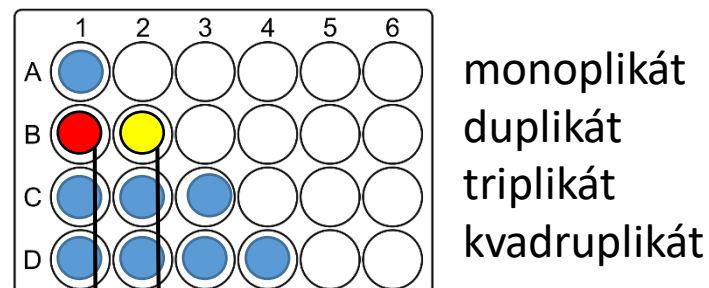


Měření 1

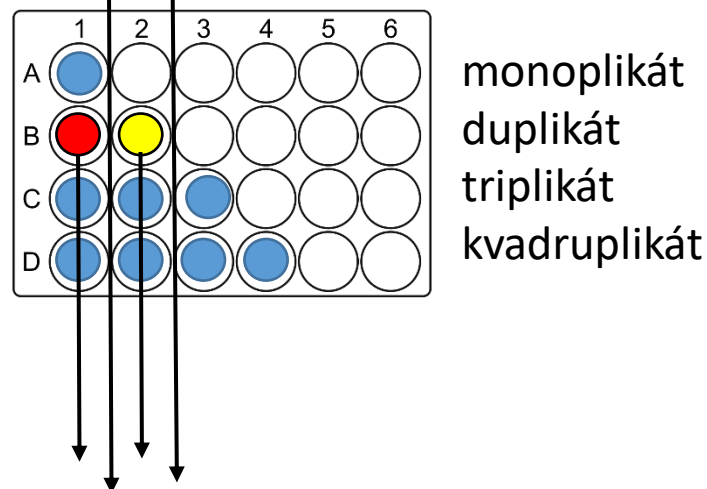
Technický replikát v rámci měření



Pokus 2 Biologický replikát – nezávislý pokus



Pokus 3 Biologický replikát – nezávislý pokus



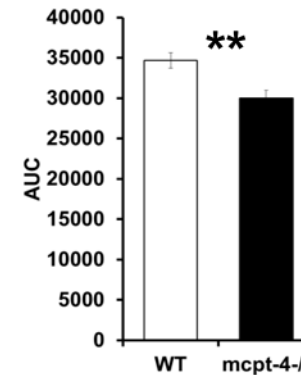
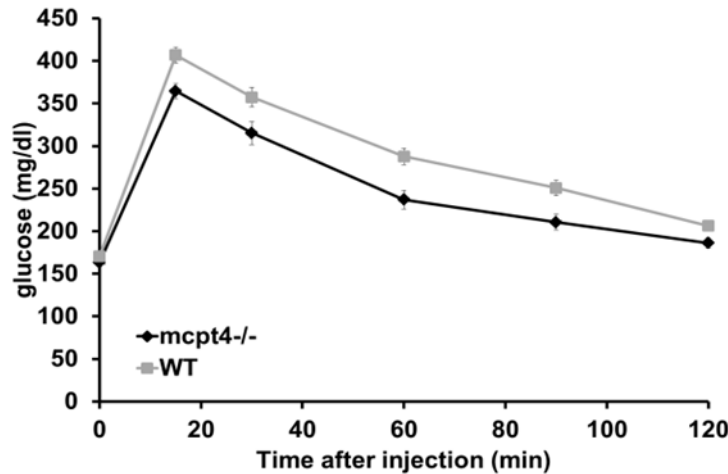
6 biologických replikátů ze 3 nezávislých pokusů celkem 12 měření (pokud každý vzorek má technický duplikát)

Vyhodnocení pokusu – Analýza dat

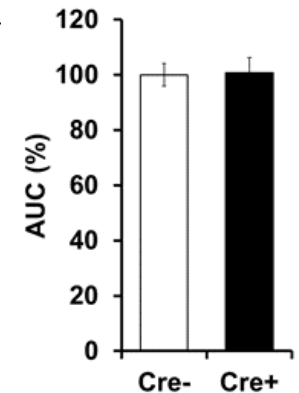
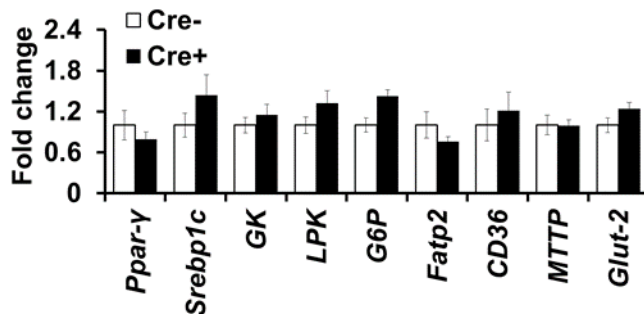
- Správně zacházet s replikáty
- Použít vhodnou statistiku – KME 062
- N (n) – počet vzorků ve skupině (v příkladu n=6, resp. 3)
 - nutné použít minimální n dle robustnosti metody
 - lze určit výpočtem
- **Nulová hypotéza** – neexistuje souvislost, nemá účinek, atd. – pozitivní výsledek = vyvrácení nulové hypotézy
- p – hodnota – nejmenší hladina významnosti, při níž ještě vyvrátíme nulovou hypotézu
 - * -0,05, ** - 0,01, *** -0,001
- SD – standard deviation, směrodatná odchylka
- SEM – standard error of mean, standardní chyba průměru
 - $=SD/\sqrt{n}$

Vyjádření výsledku

- hodnoty, procenta, rozdíl (delta), AUC (area under curve)

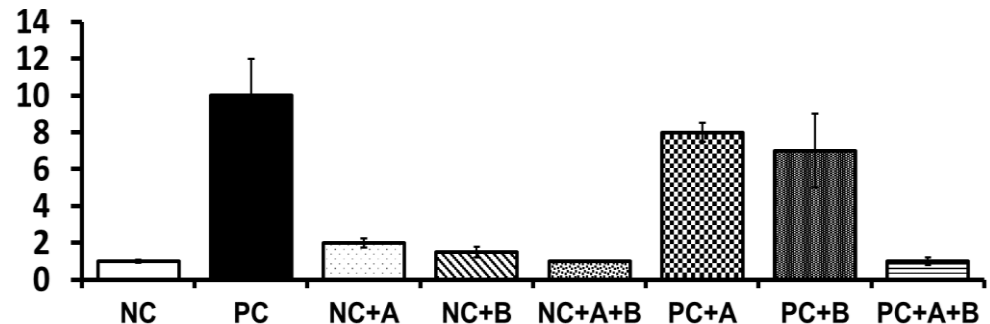
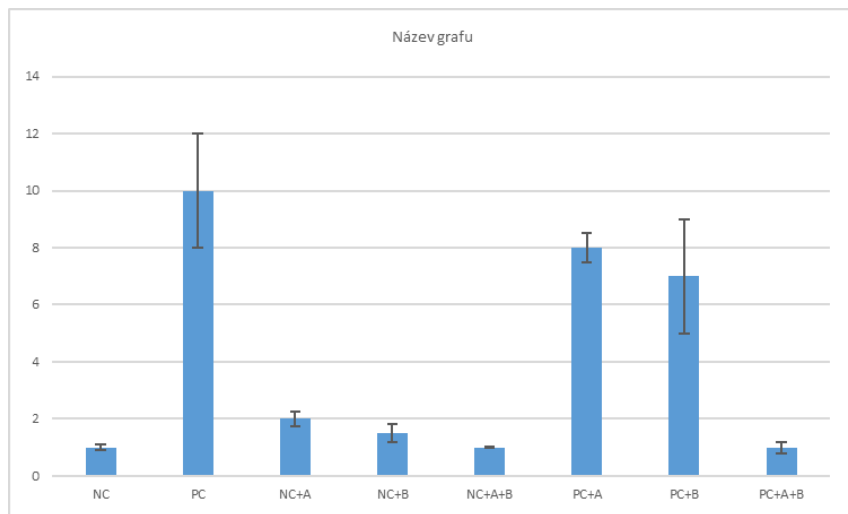


- normalizace – arbitrární určení 100% nebo „1“



Prezentace dat

- Ne všechna data je nutné prezentovat – např. ne všechny pokusy, pouze konečný průměr +/- SEM
- Buď tabulka nebo graf, lepší vždy graf
- vždy uvádět n, p, SD nebo SEM, statistický test (t-test, ANOVA, regrese, atd.), popsat osy
- Dát si záležet na čitelnosti a vzhledu, pokud možno ČB



Pokusy na zvířatech

- regulace zákonem na ochranu zvířat proti týrání
Zákon č. 246/1992 Sb.
- Pokusy může provádět jen certifikovaná osoba –
kurzy
 - manipulace se zvířaty, chování zvířat, anestezie,
usmrcování, etická stránka, alternativní řešení
- Pokusy schvaluje lokální etická komise a MZ
- Nutnost prokázat potřebnost, nemožnost
alternativního řešení, 3R
- 3R – Replacement, Refinement, Reduction

GMO a „biohazard“ agenda

- Povinnost hlásit vlastnictví a manipulaci s geneticky modifikovanými organismy
- evidence všech GMO, ale i plazmidů
- Myši (transgenní, KO), bakterie, viry
- Biohazard – nutnost evidovat nebezpečné patogeny, u nás virus KE, borélie
- Bezpečnostní zóny (Biosafety level) – BSL1-4

Klinický výzkum

- anonymní zpracování vzorků
- nutnost smluvního ošetření pro klinické studie
- ochrana pacienta i instituce
- Analýza klinických dat vyžaduje pokročilé statistické metody – **multifaktoriální analýzy** – je třeba vzít v potaz několik faktorů, případně vyloučit vliv některých (pohlaví, věk)
- Meta-analýzy – využití publikovaných dat v rámci širší studie nebo k vyhodnocování jiných parametrů

Shrnutí kurzu

- Seznámení s biomedicínou, jako vědním oborem
- Probrání základů biologie člověka včetně některých patologií – základ pro další kurzy
- Trendy v současné biomedicině – molekulární biologie, biochemie, imunologie, imunometabolismus, neurobiologie
- práce s vědeckou literaturou
- prezentace výsledků
- Prosím o hodnocení kurzu v SHP – konstruktivní připomínky