

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOGIA UURIMISGRUPP

SPF-hiirte immuunsüsteemi aktiveerimine loomuliku mikrobiotaga hiirte allapanuga

Bakalaureusetöö

12 EAP

Hannes Ruusmaa

Juhendajad: Uku Haljasorg, PhD

Tõnis Org, PhD

TARTU 2025

INFOLEHT

SPF-hiirte immuunsüsteemi aktiveerimine loomuliku mikrobiotaga hiirte allapanuga

SPF- ehk spetsiifiliste patogeenideta hiired on põhiline mudelorganism prekliinilistes ravimikatsetes, aga immuunsüsteemi uurimisel on mudeli piiranguks piiratud mikrobiota ja sellest tulenevalt immuunsüsteemi vähene areng. Üheks lahenduseks väljakujunenud immuunsüsteemi uurimisel on rikastatud mikrobiotaga mudelid, aga rikastamisel peamiselt kasutatav koosmajutusmeetod põhjustab hiirtes suurt suremust. Töö eesmärgiks võeti allapanuga hiirte mikrobiomi rikastamise protokollis sisse töötamine Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudi vivaariumis, et luua ressursse kokkuhoidev meetod SPF-hiirte immuunsüsteemi rikastamiseks, kasutades loomuliku mikrobiotaga hiirte mikrobiotat kandvat allapanu.

Märksõnad: SPF-hiired, T-rakud, koosmajutus, allapanu

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Immune System Enrichment of SPF Mice Using Bedding from Mice with a Natural Microbiota

SPF (Specific Pathogen-Free) mice are a primary model organism used in preclinical drug trials; however, their limited microbiota and consequently underdeveloped immune systems restrict their usefulness in immunological research. One solution to study fully developed immune systems is the use of microbiota-enriched models, but the commonly employed cohousing method for enrichment leads to high mortality among mice. The aim of this study was to establish a bedding-based microbiome enrichment protocol at the Laboratory Animal Facility of the Institute of Biomedicine and Translational Medicine at the University of Tartu. This protocol leverages bedding carrying wild mouse microbiota, thus providing a resource-efficient method for enhancing the immune systems of SPF mice.

Märksõnad: SPF-mice, T-cells, cohousing, bedding

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1. Koduhiire (Mus musculus) kasutamine loomkatsetes	9
1.2. SPF-hiirte roll teaduses	9
1.3. SPF-hiirte puudused.....	10
1.4. RMB-hiirte mudelid.....	12
1.5. T-rakkude populatsioonide jaotus inimeses, LMB-, RMB- ja SPF-hiires.....	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika	16
2.2.1. Katseloomad	16
2.2.2. Voolutsütomeetria	17
2.2.3. Soolestiku hematoksüliin-eosiin-värving	18
2.2.4. Statistika	18
2.3. Tulemused ja arutelu.....	19
2.3.1. Allapanuga rikastamine ei põhjusta SPF-hiirtel kaalulangust ega suurenda suremust	19
2.3.2. 3-nädalane allapanuga rikastamine mõjutab põrna ja ingvinaalseid lümfisõlmi, kuid mitte soolestiku lümfisõlmi	20
2.3.3. Cd4 ja Cd8 T-rakkude üldpopulatsioonides ei esine allapanuga rikastamise järgselt suuri muutusi	22
2.3.4. Allapanuga rikastamise tagajärjel muutub aktiveeritud Cd8 T-rakkude osakaal põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes	23
2.3.5. Allapanuga rikastamine mõjutas abistaja T-rakkude alampopulatsioone	24

2.3.6. Allapanuga rikastamine mõjutab aktiveeritud PD1-positiivsete T-rakkude osakaalu	26
2.3.7. Allapanuga rikastamisel on nõrk mõju koes resideeruvate T-rakkude osakaalule.	28
2.3.8. Allapanuga rikastamine põhjustab muudatusi reguleerivate T-rakkude populatsioonis.....	30
KOKKUVÕTE	32
TÄNUSÕNAD	34
KIRJANDUSE LOETELU.....	35
LIHTLITSENTS.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

ACK – ammoonium-kloriid-kaalium, *ammonium-chloride-potassium*

AP – allapanu, *bedding*

BSA – veise seerumi albumiin, bovine serum albumin

CD – diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*

CMV – tsütomegaloviirus, *cytomegalovirus*

CTLA – tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen, *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen*

E – efektor, *effector*

Em – efektor-mälu, *effector memory*

Fc – kristalliseerunud fragment, *fragment crystallizable*

HAT – hiljuti aktiveeritud T-rakud

HBSS – Hanki balansseeritud soolalahus, *Hank's balanced salt solution*

Ig – immunoglobuliin, *immunoglobulin*

IL – interleukiin, *interleukin*

IL7r – interleukiin 7 retseptor, *interleukin 7 receptor*

KM – koosmajutusmeetod, *cohousing method*

LMB – loomulik mikrobioota

LS – lümfisõlm, *lymph node*

N – naiivne, *naive*

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate buffered saline*

Pd1 – programmeeritud rakusurma valk 1, *programmed cell death protein 1*

RB – jooksutamispuhver, *running buffer*

RMB – rikastatud mikrobioota

SPF – spetsiifiliste patogeenide vaba, *specific pathogen free*

Tem – efektor-mälu T-rakk, *effector memory T-cell*

Th – abistaja T-rakk, helper T-cell

TNF – kasvaja nekroosifaktor, *tumor necrosis factor*

TNFR – kasvaja nekroosifaktori retseptor, *tumor necrosis factor receptor*

Treg – reguleeriv T-rakk, *regulatory T-cell*

TRM – koesresideeruv mälu T-rakk, *tissue resident memory T-cell*

TRM 1 – klassikaline Trm

TRM 2 – mitteklassikaline Trm

SISSEJUHATUS

Laborihiirtel on biomeditsiiniliste alusuuringute läbiviimisel mudelorganismina keskne roll peamiselt seetõttu, et nad on geneetiliselt üsna sarnased inimestega ja neid on mugav kasvatada. Katsetes on kõik hiired samast liinist ehk geneetiliselt identsed ja nad on üles kasvanud patogeenide vaeses keskkonnas. Levinuimaks patogeenivaeses keskkonnas kasvatatud hiiri kutsutakse SPF-hiirteks (*Specific pathogen free – spetsiifiliste patogeenide vabad*) ja neid kontrollitakse pidevalt kahjulike või oportunistlike mikroorganismide suhtes. Nii püütakse tagada, et nende hiirtega tehtud katsed annavad samad tulemused olenemata sellest, millises asutuses neid kasvatatakse. Selline ühtlustamine tagab enamasti küll katsete korratavuse, kuid on immuunsüsteemi vaatenurgast äärmiselt kunstlik. Pidev kokkupuude erinevate patogeenide ja kahjutute mikroorganismidega mõjutab inimeste ja vabalt elavate loomade immuunsüsteemi arengut, üldist toimimist, “mälu” ja vananemist. SPF-hiirte immuunsüsteem aktiveeritakse aga ainult tehtava katse ajaks ning see ei peegelda sageli meie immuunsüsteemi toimimist. Kui SPF-hiired ei anna inimesele üle kantavaid tulemusi katsetes, kus immuunsüsteemi varasem aktivatsioon mängib olulist rolli (nt vaksineerimine ja uute patogeenidega kokku puutumine), siis on nendest tulemustest meile vähe praktilist kasu ravimite väljatöötamisel. Seetõttu on viimastel aastatel hakatud kasutama rikastatud mikrobiootaga hiiri, kelle immuunsüsteem on tänu mitmekülgsale mikrobiootale inimestele sarnasem.

Hiirte immuunsüsteemi rikastamiseks kasutatakse erinevaid meetodeid, millest olulisemad on koosmajutus ja allapanuga rikastamine. Koosmajutusega paigutatakse SPF-hiired samasse keskkonda (tavaliselt puur) koos LMB- (loomulik mikrobioota) hiirtega, võimaldades vahetut kokkupuudet. Allapanuga rikastamise puhul kasutatakse aga ainult LMB-hiirte puurist kogutud allapanu, vältides otsest kontakti loomade endiga. Mõlemal juhul kandub LMB-hiirte mikrobioota edasi SPF-hiirtele (mikrobioota on erinev olenevalt rikastamise meetodist). LMB-hiirte mikrobiootaga rikastatud SPF-hiiri kutsutakse RMB- (rikastatud mikrobiootaga) hiirteks. Pannes SPF-hiired keskkonda, kus leidub patogeene, on SPF-hiired võimelised omandama LMB-hiirte immuunsüsteemiga sarnaseid tunnuseid. Kuid koosmajutuse puhul on selline üleminek SPF-hiirte jaoks kurnav ja kui immunoloogiline surve on liiga suur, siis ka surmav.

Minu töö eesmärk on uurida, kuidas Tallinna loomaaiast pärit hiirte allapanuga rikastamine mõjutab SPF-hiirte T-rakkude populatsioone perifeersetes lümfoid organites. Lisaks analüüsin, kui võrd meie tulemused on kooskõlas varasemate teadustöödega ja kas allapanuga

rikastatud hiiri saab immunoloogiliselt otseselt võrrelda koosmajutatud hiirtega, et neid edaspidi kasutada teadustöös.

Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis ning Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Koduhiire (*Mus musculus*) kasutamine loomkatsetes

Hiiri on teadusliku tööriistana kasutatud juba 20. sajandi algusest ja seda headel põhjustel (Morse, 2007). Katsetes kasutatud hiirte geneetilised erinevused kaotati läbi inbriidingu, et tagada geneetiline standardiseeritus ja suurendada tulemuste reprodutseeritavust (Casellas, 2011). Hiired jagavad inimestega üle 90% geenidest ja kuna meie geenide järjestused on teineteisele piisavalt sarnased, saab ühes organismis avastatud geenide funktsiooni sageli uurida ka teises (Paigen, 1995). Hiirte peal saab uurida eluohtlikke haigusi nagu sepsis või südameinfarkt, mis inimkatsetes oleks ebapraktiline ja ebaetiline. Eluaegsete haiguste uurimisel võib laborihiirtelt saada tulemuse ligikaudu 2 aastaga, samas kui inimestel võtaks see aastakümneid (Masopust *et al.*, 2017). Lisaks on hiired väikesed, vähenõudlikud ja lühikese generatsiooniajaga, mis teeb eluaegsete haiguste uurimise hõlpsamaks.

1.2. SPF-hiirte roll teaduses

1960. aastate alguses alustati SPF-hiirte kasutamist, kuna loomkatsetest taheti eemaldada võimalikult palju katsete tulemusi mõjutavaid faktoreid. Sihiks võeti erinevad patogeenid, kes tavaliselt elavad LMB-hiirte organismis. Algselt töötati välja viis, kuidas luua „mikroobipuudulik“ (*germ-free*) hiiri, kellel ei olnud mikroobe kehas, sealhulgas ka soolestikus (Masopust *et al.*, 2017). Mikroobipuudulikud hiired saavad elada vaid mikroobivabas keskkonnas, vastasel juhul nad haigestuvad või surevad haiguste tagajärjel. Lisaks on nende haldamine kallis, ajamahukas ja nõuab palju spetsiifilist tehnikat (Fontaine *et al.*, 2015). Seetõttu liiguti mikroobipuudulikelt hiirtelt loomadele, kellel on puudu spetsiifilised patogeenid (SPF), näiteks *Orthopoxvirus ectromelia* või *Helicobacter pylori*. Nende hiirte keskkonda kontrollitakse pidevalt võimalike patogeenide suhtes, et haigused segaksid võimalikult vähe katsetest saadavaid tulemusi (Lane-Petter, 1962). Alusbioloogia- ning prekliinilistes uuringutes on SPF-hiired tänaseni domineerivaks loomudeliks (Dobson *et al.*, 2019). IgG (Ig – Immunoglobuliin, *Immunoglobulin*) identifitseerimine, tüümuse funktsioon ja lastehalvatustõve vaktsiin on muuhulgas näited läbimurretest, mis on tehtud tänu SPF-hiirtele (Masopust *et al.*, 2017). SPF-hiirtelt saadud teadmised on vaieldamatult kasulikud. Samas on sellel mudelil ka omad puudused, millest enamikku (erinevused translatsioonil hiirelt inimesele) võib ära põhjendada erinevustega elupikkuses, genoomis või spetsiifiliste organism-patogeen interaktsioonidega. Leidub siiski ka näiteid, kus laborihiirte vähene kontakt patogeenidega on viinud märkimisväärsete erinevusteni uurimistulemustes (Masopust *et al.*, 2017).

1.3. SPF-hiirte puudused

Juba SPF-hiirte kasutamise algusaastatel 1960-ndatel mainiti potentsiaalseid tagajärgi hiirte mikrobioota kaotamises või drastilises vähendamises. Võrreldes mikroobipuudulike, SPF- ja LMB-hiiri nähti, et muutused mikrobiootas mõjutasid muuhulgas hiirte kasvukiirust, vastupanu haigustele ja immuunfunktsioone. Lisaks näidati, et need erinevused kaovad, kui panna mikroobipuudulikud või SPF-hiired LMB-hiirtega ühisesse keskkonda (Dubos *et al.*, 1965). Sama tulemust näidati ka tänapäevasemas katses – Labuda (2022) *et al.* näitasid, et kokkupuude erinevate patogeenidega suurendab SPF-hiirte mälu T-rakkude populatsioone, muutes need sarnasemaks LMB-hiirtele.

SPF-hiirte immuunsüsteemi uurimisel saadud tulemuste transleerimine inimese raviks on problemaatiline mitmest aspektist. Esiteks võib SPF-hiirte piiratud mikrobioota ja alaarenenud immuunsüsteem viia valenegatiivsete tulemusteni ehk olukordadeni, kus tõhusad ravimikandidaadid jäävad avastamata, kuna SPF-hiirte immuunsüsteemil puudub varasem kogemus patogeenide ja kommensaalidega ja see ei aktiveeru sarnasel moel kui inimesel (Masopust *et al.*, 2017). Kui potentsiaalse immunomoduleeriva ravimi toime sõltub varasemast immunoloogilisest kogemusest, siis SPF-hiirtelt saadud tulemused ei pruugi anda alust ravimi toime edasiseks uurimiseks. Inimestel mängib immuunsüsteemi varasem aktivatsioon uue antigeeniga kohtumisel väga suurt rolli (Moseley *et al.*, 2023). Inimeste immuunsüsteem on arenenud mikroobiderikkas maailmas ja ei käituks samamoodi sanitaarses keskkonnas kasvades. CMV ehk tsütomegaloviirus on globaalselt laialt levinud viirus, mis enamikul inimestel ei põhjusta sümptomeid. Samas nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestel, nagu HIV-positiivsetel või vastsündinutel, võib CMV nakkus olla eluohtlik (Gupta ja Shorman, 2025). Lisaks on uuritud, kuidas CMV omab kaudset mõju inimese immuunsüsteemile, näiteks võib CMV nakkus inimesel vaktsiinide toimet nõrgestada (Moseley *et al.*, 2023). See on vaid üks näide sellest, kuidas eelnev immuunkogemus mõjutab hilisemat haiguse kulgu või ravimi toimet organismis.

Teiseks tähendab selline ebaadekvaatne mudel ka katseloomade asjatut kasutamist – viiakse läbi eksperimente, mille tulemused ei osutu hilisemas faasis rakendatavaks, raisates nii aega, ressursse kui ka katseloomade elusid (Graham, 2021; Masopust *et al.*, 2017).

Kolmandaks võib SPF-hiirte ja inimeste immuunsüsteemide erinevus viia valepositiivsete tulemusteni, kus ohutuks ja efektiivseks hinnatud preparaadid põhjustavad inimestel tõsiseid kõrvaltoimeid või eluohtlikke reaktsioone. Sellised ekslikud hinnangud ohustavad otseselt inimesi, kui ravim liigub kliinilisse katsetusse. Selle kohta võib tuua kaks näidet kliinilistest

katsetest, mille aluseks olnud SPF-hiirtel tehtud prekliinilised katsed viisid inimestel raskete kõrvaltoimeteneni tulenevalt prekliinilistes katsetes kasutatud SPF-hiirte vähearenenud immuunsüsteemi eripäradest (Fisher *et al.*, 1996; Suntharalingam *et al.*, 2006).

Esimeses katses üritati kasutada rekombinantset inimese TNF (kasvaja nekroosi faktor, *Tumor necrosis factor*) retseptorit ja IgG1 Fc (kristalliseerunud fragment, *fragment crystallizable*) regiooni valku (TNFR:Fc), et siduda ja neutraliseerida TNF- α . TNF- α on kaasasündinud immuunsüsteemis keskne põletikulist vastust vahendav signaalmolekul (Bradley, 2008). SPF-hiirte peal tehtud katsed olid näidanud, et Tnf- α blokeerimine päästis hiired endotokseemia ja baktereemia põhjustatud surmast (Beutler *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 1989). Inimkatsetes üritati vähendada TNFR:Fc manustamisega suremust septilisesse šokki, kuid vastupidiselt ootustele nähti kõrgemate dooside korral suurenenud suremust (Fisher *et al.*, 1996).

Teises katses püüti CD28-molekuli (CD – diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*) stimuleeriva agonistiga panna paljunema omandatud immuunsüsteemi alla kuuluvate immuunvastust maha suruvate Tregide (regulaatorised T-rakud – *regulatory T cell*) populatsioon (Suntharalingam *et al.*, 2006). Tregide peamiseks ülesanneteks on vältida immuunvastuse teket kehaomaste ning kommensaalsest mikrobiotast ja toidust pärinevate antigeenide vastu (Wiechers *et al.*, 2021). Tregide ebanormaalne talitus on seotud mitmete autoimmuunhaigustega, nagu näiteks artriit (Haribhai *et al.*, 2016). Samas saab Treg potentsiaalselt rakendada ka haiguste raviks, nagu üritati teha Suntharalingam (2006) *et al.* uuringus. Laboriloomadel tehtud katsed Treg aktiveeriva agonistiga andsid lootustandvaid tulemusi – Cd28 agonist suudab laboriloomades aktiveerida Treg, mis kliinilistes katsetes võiks viia mitmete autoimmuunhaiguste, näiteks polüskleroosi, ravini.

Kliiniliste katsete 1. faasis tekkis vabatahtlikel üleüldine T-rakuline aktivatsioon ning sellega kaasneva tsütokiinitormi tõttu rasked pöördumatud tervisekahjustused (Suntharalingam *et al.*, 2006). Üheks põhjuseks peeti hiire ja inimese immuunsüsteemide vahelist erinevust. Nimelt on SPF-hiirtel Cd4-positiivsete efektor-mälurakkude (Cd44⁺Cd62l⁺) osakaal varasema immuunaktivatsiooni puudumise tõttu määratult väiksem kui täiskasvanud inimesel. Lisaks ekspresseerivad hiire ja teise prekliinilise mudelina kasutatud makaagi, CD4-positiivsed efektor-mälurakud CD28-molekuli oluliselt madalamates kogustes (Eastwood *et al.*, 2010).

Tõenäoliselt ei saada kunagi täpselt teada, kui paljud eksperimendid ja potentsiaalsed ravimid kukkusid prekliinilistes katsetes läbi SPF-hiirte immunoloogilise puhtuse tõttu. Lisaks ei ole teada, kui palju ressursse ja hiirte elusid on kulunud ekslike tulemuste saavutamiseks.

Viimaste aastate jooksul on immunoloogia valdkonnas SPF-hiirte immuunsüsteemi puudusi

oluliselt rohkem teadvustama hakatud. Puuduste vähendamiseks on kasutusele võetud SPF-hiirtel põhinevaid mudeleid, kus katseloomade elukeskkonda on mikrobiotaga rikastatud.

1.4. RMB-hiirte mudelid

Katsed, mille läbikukkumise aluseks on olnud immunoloogiliselt vähearenenud hiired, on tõmmanud tähelepanu SPF-hiirte nõrkustele ja kiirendanud alternatiivsete meetodite arengut.

Näiteks töötasid Rosshart (2019) *et al.* välja uue hiiremudeli, mida nimetatakse poolmetsikuteks. Selle mudeli loomisel siirati laborihiire C57 BL/6 embrüod loomuliku mikrobiotaga emasloomadesse. Pärast poegimist moodustasid nad eraldiseisva koloonia, mida hakati kutsuma poolmetsikuteks hiirteks. Tulemuseks olid hiired, kellel oli laborihiire geneetika ja nende mikrobiota sarnanes juba embrüonaalses staadiumis LMB-hiirtele (joonis 1).

Traditsioonilised laborihiired kasvatatakse steriilsetes tingimustes, mis piirab nende kokkupuudet mikroobidega ja viib vähese immuunkogemuseni. Poolmetsikud hiired seevastu omandavad looduslikule lähedase mikrobiota juba looteas ja varases arengus, mis kujundab nende immuunsüsteemi sarnaselt LMB-hiirtele ja inimestele. See muudab poolmetsikud hiired sobivamaks mudeliks haiguste uurimisel, eriti immunoloogilistes uuringutes, kus traditsioonilised laborihiired ei pruugi inimeste immuunreaktsioone adekvaatselt peegeldada (Rosshart *et al.*, 2019).

Poolmetsikuid hiiri kasutati eelnevalt mainitud CD28 agonisti ja TNRF:Fc kliiniliste uuringute aluseks olnud loomkatsete kordamiseks. Eesmärk oli näha kas rikastatud immuunsüsteemiga hiired oleksid jäljendanud edukamalt inimese immuunsüsteemi reaktsiooni. Mõlema katse puhul, kus tavalised laborihiired näitasid ravimitele positiivset reaktsiooni, jäljendasid rikastatud immuunsüsteemiga hiired kliinilistes katsetes nähtud inimeste tulemusi. Cd28 agonistile tekkis poolmetsikutel hiirtel inimestele sarnane põletikuline T-rakkude aktivatsioon ja tsütokiintorm ning TNRF:Fc ei suurendanud poolmetsikute hiirte ellujäämise tõenäosust võrreldes kontrolliga (Rosshart *et al.*, 2019).

Need tulemused näitavad, et SPF-hiired ei suuda adekvaatselt jäljendada immuunsüsteemi, mis on kujunenud mikroobiderohkes keskkonnas koos loodusliku mikrobiota ja patogeenidega. Seetõttu on nende kasutamine immuunsüsteemi moduleerivate ravimikandidaatide prekliinilistes katsetes äärmiselt küsitava väärtusega.

Sarnase tulemuseni jõudsid Lo (2024) *et al.* katsega, kus võrreldi SPF-hiirte ja WildR-hiirte (WildR-hiired luuakse tiinete mikroobipuudulike hiirte innokuleerimisel LMB-hiirtelt eraldatud loodusliku mikrobiotaga, võimaldades varajast immuunsüsteemi aktivatsiooni

tulevases pesakonnas) immuunvastust anti-ctla4 (Ctla – tsütotoksiline T-lümfotsüüdi antigeen, *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen*) antikehadele. Anti-CTLA4 antikehi ja muid immunoloogilisi kontrollpunkt-inhibiitoreid kasutatakse vähiraviks, kuid nendega kaasneb kõrvaltoimeid. Anti-CTLA4 antikehad põhjustavad inimestes soolestiku põletikku ehk koliiti, kuid SPF-hiirtel ei teki koliiti anti-Ctla antikehasid manustades. Koliit on levinud ja tõsine kõrvalmõju CTLA4-spetsiifiliste antikehade manustamisel, mistõttu paljud patsiendid jäta-
vud ravi katki. Katset WildR-hiirtega korrates nähti, kuidas neil kujunes välja koliit. Lahenduseks koliidi tekkele pakkusid Lo (2024) jt anti-Ctla4 nanokehade (*nanobody*) või nanoantikehade kasutamist, millel puudub koliiti põhjustav Fc domeen. Katses näidati, et anti-Ctla4 nanokehad ei põhjustanud koliiti WildR-hiirtes ja säilitasid oma vähivastase toime.

Embrüote transplantatsioon on keeruline ja ajamahukas protsess (Hamilton et al., 2020), seetõttu kasutatakse katseloomade immuunsüsteemi rikastamisel peamiselt erinevaid sünnijärgseid rikastusmeetodeid (joonis 1). Levinum neist on koosmajutus-meetod (KM). Koosmajutuses paigutatakse SPF-hiired samasse puuri hiirtega, kelle elukeskkonda patogeeni-
de suhtes ei kontrollita – näiteks loomapoest või loomaaiast pärinevate loomadega. Nii puutub SPF-hiir kokku suure hulga mikroorganismidega (sh patogeenidega), mis aktiveerivad laborihiire immuunsüsteemi ja muudavad selle sarnasemaks vabas looduses esinevale variandile (Masopust et al., 2017). KMi puuduseks on rikastamise käigus SPF-hiirte tõsine haigestumine ja sellest johtuv ligi 20%-line suremus (Hamilton et al., 2020). Alternatiivselt kasutatakse mikrobiotaga rikastamiseks ka LMB-hiirte allapanu (Compton et al., 2012). Kuna hiired on koprofaagid, siis kandub sellisel moel edasi lisaks keha pinnal olevale mikrobiotale ka osa seedetrakti mikrobiotast. See meetod vähendab patogeeni-
de ülekande mõju, mille tulemusena väheneb suremus ja kaalukaotus, aga ka immuunaktivatsioon ja patogeeni-
de mitmekesisus (Hamilton et al., 2020).

1.5. T-rakkude populatsioonide jaotus inimeses, LMB-, RMB- ja SPF-hiires

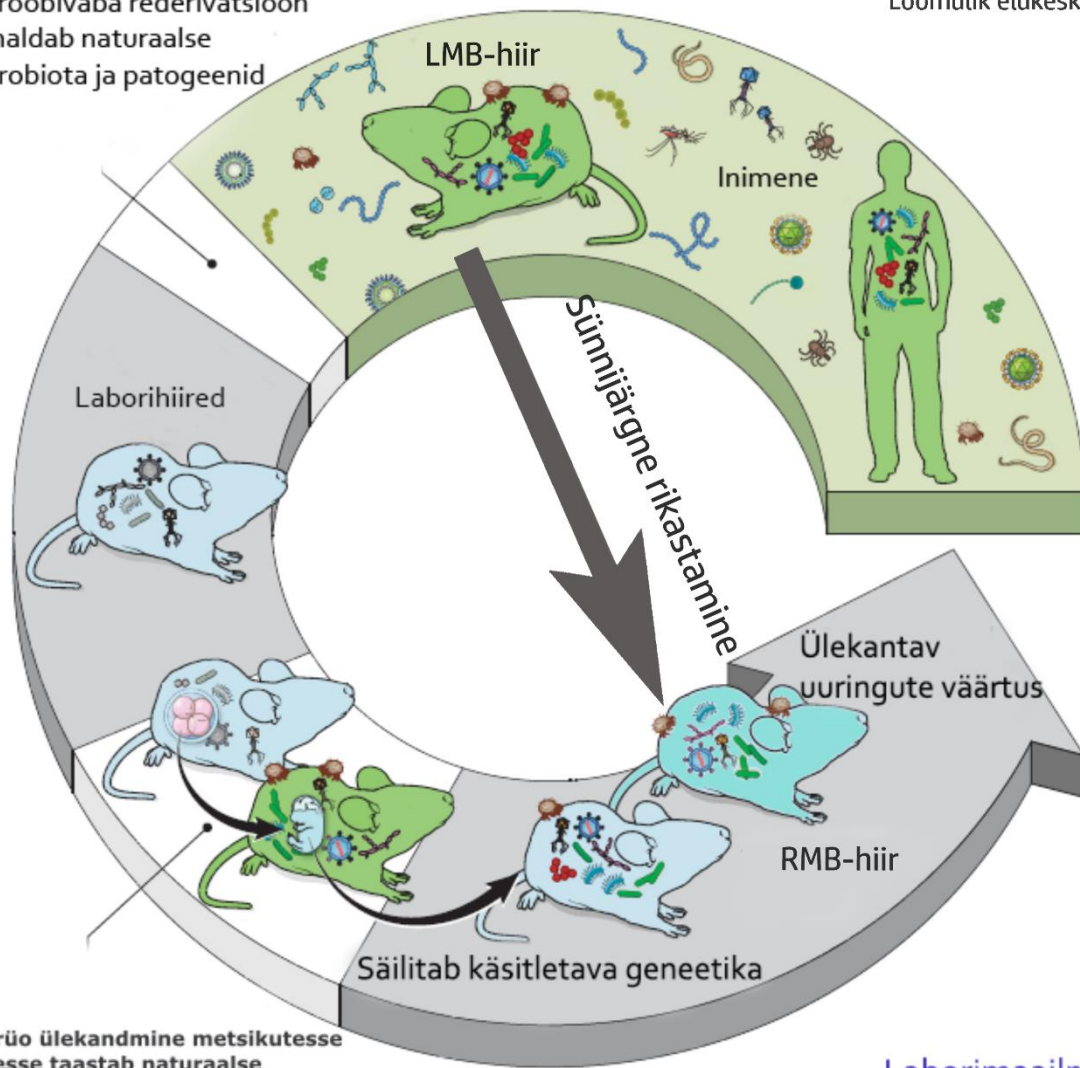
RMB-hiirtes on rakulist immuunsust põhjalikult uuritud, keskendudes muutustele T-rakkude populatsioonides (Labuda et al., 2022; Rosshart et al., 2017). T-rakud koordineerivad omandatud immuunsuse erinevaid aspekte, vastutades peamiselt patogeeni-
de, allergeeni-
de ja kasvaja-
de vastase immuunvastuse eest (Kumar et al., 2018).

Perifeersed T-rakud koosnevad erinevatest alamgruppidest, mida iseloomustavad erinevad pinnamarkerite ekspressiooni kombinatsioonid. Suurim alamgrupp on põrnas ja lümfisõlmedes naiivsed T-rakud (Cd44⁺Cd62L⁺), mis ei ole veel oma T-raku retseptorile spetsiifilist antigeeni kohanud. T-rakuline immuunvastus algab, kui naiivne T-rakk aktiveerub pärast kokkupuudet

antigeeni ja dendriitraku poolt esitatud kostimuleerivate ligandidega (Kumar *et al.*, 2018). Selle tulemuseks on interleukiin-2 tootmine Th (abistaja T-rakud – *helper T-cells*) poolt, proliferatsioon ja diferentseerumine efektor-rakkudeks (CD44⁺CD62⁻) (Alberts *et al.*, 2002). Efektor-T-rakud (CD44⁺CD62⁻) liiguvad kehas laiali põletikukolletesse ja tegelevad patogeeni eemaldamisega, kasutades selleks efektor-tsütokiine ja tsütotoksilisi mediaatoreid. Pärast patogeeni kõrvaldamist enamik efektor-T-rakke (CD44⁺CD62⁻) suunatakse apoptoosi, kuid osa neist diferentseeruvad efektor-mälu-T-rakkudeks (CD44⁺CD62L⁺). Need rakud jäävad organismi pikaks ajaks ja võimaldavad kiiret ja tugevat immuunvastust, kui sama patogeen uuesti ilmub. Nad ringlevad veres, lümfoidkudedes või paiknevad püsivalt kudedes, olles valmis koheselt reageerima (Kumar *et al.*, 2018). Võrreldes SPF-hiirtega on LMB-hiirtes näha drastiliselt suurenenud Cd8⁺ efektor mälu T-raku (CD44⁺CD62L⁺) populatsioone nii lümfoidses koes kui ka koes resideeruvate mälu-T-rakkude ehk T_{RM}ide (*tissue-resident memory T-cells*) hulgas (Beura *et al.*, 2016). T_{RM}-rakud on grupp mälu-T-rakke, mis püsivad ühes koes, ei liigu kehas ringi ja pakuvad kaitset varem kohatud patogeeni vastu (Kumar *et al.*, 2018). Nende määramiseks kasutatakse peamiselt kaht markerit – Cd69 ja Cd103. T_{RM} alampopulatsioonide määramine pole samas aga nii selge ning sõltub koest. Näiteks on T_{RM}ide määramiseks kasutatav Cd69 ka T-rakkude hiljutise aktivatsiooni markeriks (Masopust *et al.*, 2017). LMB-hiirte T-raku populatsioonid on sarnasemad täiskasvanud inimese fenotüübile kui SPF-hiirte omad (Beura *et al.*, 2016). SPF-hiirtel on näha palju suuremal määral naiivseid ja mälu-T-rakke ning vähem diferentseerunud efektor-mälu-T-rakke. Võrdluseks on täiskasvanud inimestel ja LMB-hiirtel vastupidiselt rohkem diferentseerunud efektor-mälu-T-rakke ja vähem CD8 naiivseid T-rakke. Samas näidati, et SPF-hiired omandavad läbi koosmajutuse LMB-hiirtele sarnase immuunsüsteemi fenotüübi (Beura *et al.*, 2016). Sellistes RMB-hiirtes on näha rohkem ringlevaid ja T_{RM} Cd8 T-rakke, aga ka suurendatud diferentseerumist Cd4⁺ T-rakkude alamgruppides (Beura *et al.*, 2016). Ehk LMB-ja RMB-hiirtel ning täiskasvanud inimestel on laialdasi sarnasusi immuunsüsteemis, samas kui SPF-hiired on neist märkimisväärselt erinevad. See seab küsimuse alla seni domineerinud katseloomamudeli usaldusväärsuse. Kui meie peamised tööriistad on liiga „puhtad“, et peegeldada päriselu, võib olla aeg ümber mõtestada, milliseid mudeleid me peame standardiks.

Mikroobivaba rederivatsioon
eemaldab naturaalse
mikrobiota ja patogeeneid

Loomulik elukeskkond



Embrüo ülekandmine metsikutesse
hiirtesse taastab naturaalse
mikrobiomi ja patogeeneid

Laborimaailm

Joonis 1. Inimese immuunfenotüübi mudeldamine baas- ja prekliinilisteks uuringuteks.
Pilt kohandatud artiklist Rosshart *et al* (2019).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Kuigi hetkel kasutatakse SPF-hiiri laialdaselt biomeditsiinilistes ja immunoloogilistes uuringutes mudelitena, siis nende hiirte vähe väljaarenenud immuunsüsteemi peal tehtud katsed võivad anda valesid tulemusi teaduslikes uuringutes. Selle kõrval kasutakse ka LMB- (loomulik mikrobioota) hiirtega koosmajutust, et arendada SPF-hiirte immuunsüsteemi, aga selle meetodiga kaasneb tavaliselt suur suremus. Käesolevas töös keskendutakse SPF-hiirte immuunsüsteemi rikastamise meetodi väljatöötamisele, tuginedes loomkatsete 3 Ri printsiibile. Meetod peaks tekitama püsiva immuunaktiivsiooni, et sellest oleks hilisemates katsetes kasu, samas hoidma hiirte stressi ja suremust võimalikult madalal.

Käesoleva töö konkreetsed eesmärgid on järgmised.

- Uurida, mil määral muudab Tallinna Loomaaiast pärinevate hiirte allapanu SPF-hiirte perifeersete T-rakkude diferentseerumist ja aktiivsiooni.
- Kirjanduse põhjal järeldada, kas sel moel rikastatud hiired sarnanevad pigem SPF-hiirte või koosmajutatud hiirtega.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Katseloomad

Töös kasutati Tartu Ülikooli Siirdemeditsiinikeskuse SPF-vivaariumist pärinevaid nelja nädala vanuseid emaseid Balb/C hiiri. Katses kasutati ainult emaseid hiiri, kuna täiskasvanud isaseid loomi ei saa erinevatest puuridest kokku tõsta. Katsed viidi läbi TÜ Mikrobioloogia Instituudi vivaariumis. Loomad elasid standardsetes loomapuurides temperatuuril 22 ± 1 °C 12t/12t valguse/pimeduse režiimil. Söök ja vesi olid loomadele pidevalt kättesaadavad. LMB-hiired pärinevad Tallinna loomaiast ja neid hoiustakse eraldi puuris. Allapanu lisati SPF-hiirte puuridesse Tallinna loomaiast pärinevatelt LMB-hiirtelt. Pärast katse algust kaaluti hiiri iga nelja päeva tagant. Katse kestis kolm nädalat. Katses kasutatud hiired surmati ketamiini ja ksülasiini üledoosiga (ketamiin 10mg/ml, ksülasiin 0,5mg/ml; lahjendus füsioloogilises lahuses 100 µl/10g kehakaalu kohta). Esimeses katses oli allapanu- ja kontrollgrupis kummaski 4, teises 5 looma. Esimese katse puhul hoidsime loomi rikastatuna 8 nädalat, teisel 3 nädalat. Esimesest katses kasutame ainult soolestiku pilte, kaalud ei ole inimliku vea tõttu kasutatavad. Loomkatsete tegemiseks andis loa Maaeluministeriumi loomkatsete läbiviimise loakomisjon (luba nr 211/225).

2.2.2. Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria jaoks koguti katseloomadelt (n=4 I katses ja n=5 II katses) põrnad ja ingvinaalsed lümfisõlmed. Kudesid hoiti 1X HBSS (Hanki balansseeritud soolalahus - *Hanks' balanced salt solution*) puhvris jää peal. Põrnad purustati kahe alusklaasi vahel ja kudesid töödeldi erütrotsüütide lüüsiks 3 min jooksul 3 ml ACKga (ammoonium-kloriid-kaalium – *ammonium-chloride-potassium*). Seejärel lisati rakkudele 25 ml RB-puhvrit ja sõeluti läbi 40 µm avadega sõela. Lümfisõlmed lõigati skalpelliga tükkideks ja hoiti üherakulise suspensiooni saamiseks ensüümisegus (15 U/mg DNAas I (PanReac AppliChem ITW Reagents), 160U/ml kollagenaas IV (Gibco™) 0,4 U/ml dispaasi (Gibco™) pöörleval alusel 37 °C juures. Suspensioonid võeti üles 50 ml tuubides ja lisati RB-puhvrit (voolutuspuhver – *running buffer*, 10% veise seerumi albumiin, 0,02M EDTA PBSis) ja tsentrifuugiti (kõik tsentrifuugimised 350 g, 7 °C, 7 minutit). Rakud loendati fluorestsentsrakuloenduriga LUNA-FLTM Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems). Igast proovist võeti 5 miljonit raku, mida inkubeeriti esmalt 15 minutit elulemusmarkeriga (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506, Thermo Scientific, lahjendus 1:1000), millele järgnes 15 min inkubatsiooni Cd16/32 antikehaga (Biolegend, lahjendus 1:400, kloon:93). Seejärel inkubeeriti rakke 30 minutit spetsiifiliste antikehadega (tabel 1). Inkubatsiooni järel pesti rakke 3 korda RBga. Esimese katse puhul kasutati BD Fortessa konventsionaalset voolutsütomeetrit, teise katse puhul SONY ID7000 spektraalset voolutsütomeetrit.

Tabel 1. Voolutsütomeetrias kasutatud antikehad.

Antigeen	Fluorofoor	Kloonid	Lahjendus
Cd25	BV421	PC61	1:100
Cd45	SparkViolet-538	30-F11	1:200
Cd4	BV570	RM4-5	1:400
Cd8	BV650	53-6.7	1:400
Cd44	BV711	IM7	1:400
Cd69	FITC	H1.2F3	1:200
Cd103	PE	2E7	1:200
Pd1	PE-Dazzle594	29F.1A12	1:200
Cd3	PerCP-Cy5.5	145-2C11	1:100
Il7r	PE-Cy7	A7R34	1:200
Cd153	APC	RM153	1:100
Cd11b	SparkNIR-685	M1/70	1:800
Cd19	AF700	1D3/CD19	1:100
Cd62l	APC-Fire750	MEL-14	1:200

2.2.3. Soolestiku hematoksüliin-eosiin-värving

Hiirtelt eemaldati soolestik. Soolestiku fikseerimiseks ja läbipesuks kasutati Bouini lahust (äädikhape 230 g/mol, formaldehüüd 30 g/mol, pikriinhape 60 g/mol destilleeritud vees). Sooled lõigati pikkupidi lahti ja seejärel lõigati need kolmeks osaks: peensoole algus, peensoole lõpp ja jämesool. Lõigud rulliti ümber hambaorgi ja fikseeriti 4% formaldehüüdi lahuses. Valmistatud preparaadid saadeti edasi TÜ Kliinikumi Patoloogiateenistusse, kus valmistati koelõigud ja teostati hematoksüliin-eosiin-värving. Koelõike vaadeldi Nikon H550S mikroskoobiga.

2.2.4. Statistika

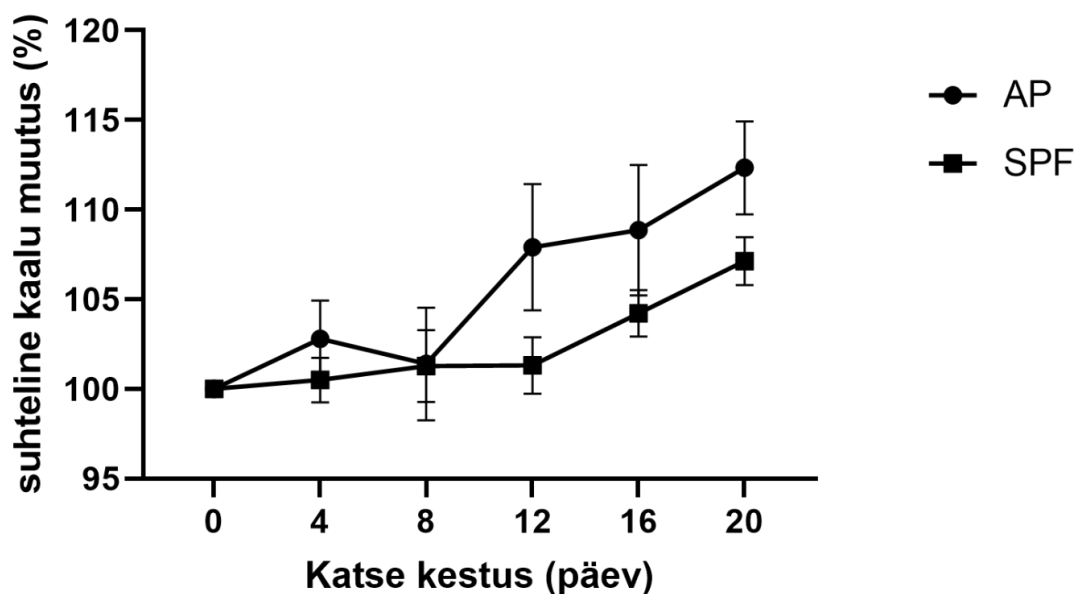
Tulemuste analüüsimiseks ja visualiseerimiseks kasutati SONY ID7000 (Sony) ja FCS Express (De Novo Software) tarkvara, programme Microsoft Excel (Microsoft), GraphPad Prism 8 (GraphPad Software), Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated) ja Inkscape. Statistilisel analüüsil võrreldi omavahel keskväärtuste standardvigu. Statistiliselt olulise erinevuse määramiseks kasutati kahepoolset paaritud t-testi voolutsütomeetria tulemuste ja Mann-Whitney testi mikroskoopia tulemuste jaoks.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Allapanuga rikastamine ei põhjusta SPF-hiirtel kaalulangust ega suurenda suremust

SPF-hiirte mikrobiota rikastamine on translatsiooniliste uuringute jaoks vajalik nende immunoloogilise sobivuse parandamiseks, kuid traditsiooniliselt kasutatav koosmajutamine LMB- (loomulik mikrobiota) hiirtega võib esile kutsuda märkimisväärseid kõrvalmõjusid. Kõige tõsisemateks koosmajutuse probleemideks on kuni 10% ajutine kehakaalu langus ja ligikaudu 20% RMB- (rikastatud mikrobiota) hiirte suremus (Hamilton *et al.*, 2020). Seetõttu on oluline hinnata ohutuma alternatiivse meetodi, näiteks allapanuga rikastamise, mõju loomade tervisele ja immuunfenotüübile. Käesolevas katses kasutati mikrobiota ülekandeks allapanuga rikastamist.

Tulemuste põhjal ei tuvastatud ühelgi loomal tõsiseid haigestumisi ega surma kogu katseperioodi jooksul. Vastupidi – kõik loomad võtsid katse lõpuks kaalus juurde, võrreldes algkaaluga (joonis 2). Hoolimata sellest, et rühmade vahelisi kaaluerinevusi ei kinnitatud statistiliselt, ilmnisid siiski kaks selget trendi. Esiteks tõusis allapanuga rikastatud (AP) hiirte kehakaal veidi kiiremini kui kontrollrühmadel. Teiseks täheldati AP-rühmas ajavahemikus 4. kuni 8. katsepäev kerget kaalulangust, mis võib viidata organismi immuunreaktsioonile rikastatud keskkonnas esinevate mikroobide vastu või kergemale, väliselt mittetuvastatavale haigestumisele. Kokkuvõttes kinnitavad tulemused, et allapanuga rikastamine on ohutu ja vältis koosmajutamise seotud 10% kaalulangust ja 20% suremust, pakkudes leebemat viisi mikrobiota rikastamiseks ilma loomade heaolu kahjustamata.

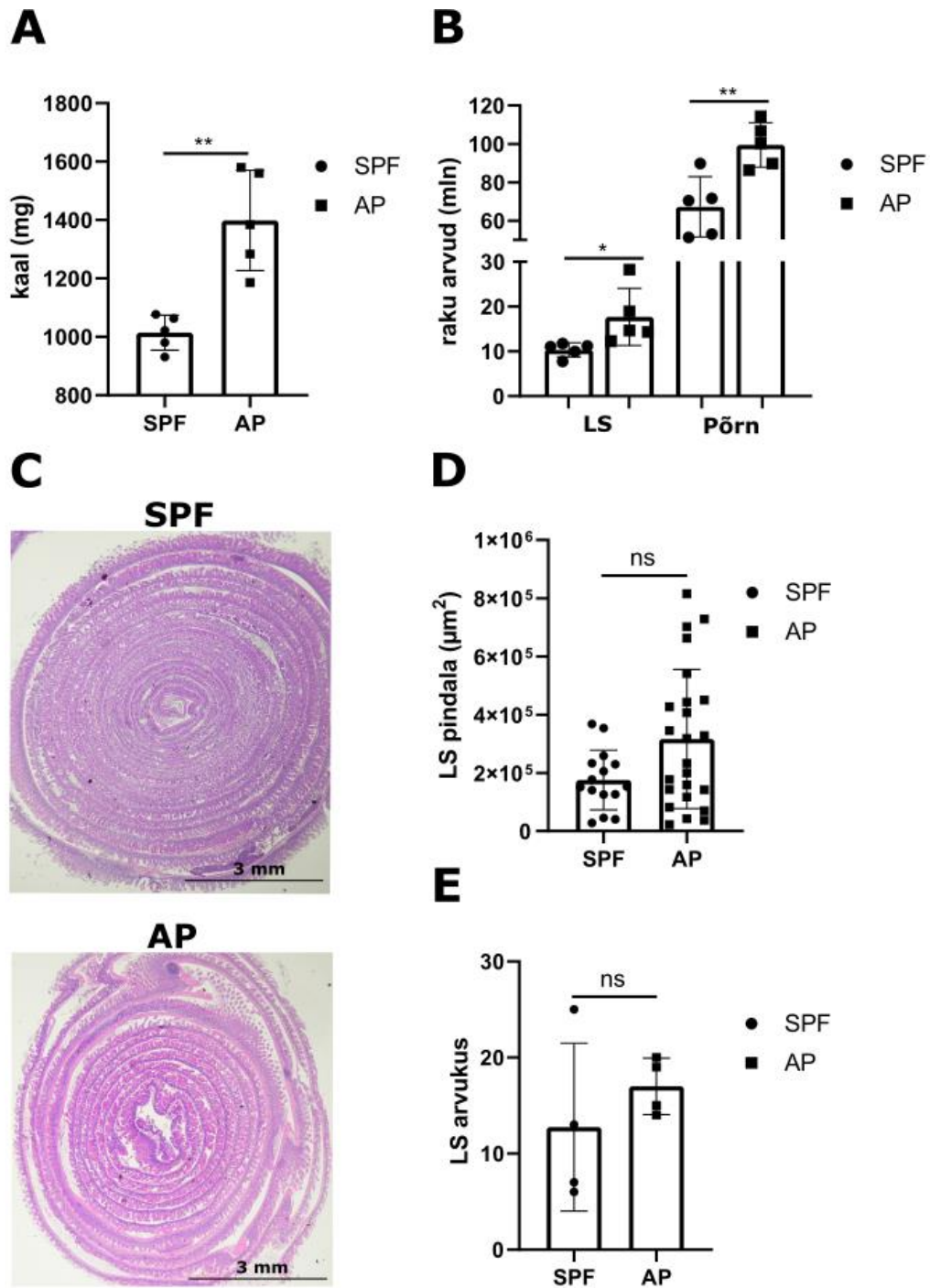


Joonis 2. Allapanu (AP) ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte kaalude muutused 20 päeva jooksul. Hiiri kaaluti iga nelja päeva tagant. X-teljel on katse kestused päevas ja Y-teljel on kaalu suhteline muutus protsentides. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (ns $p > 0.05$). AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*.

2.3.2. 3-nädalane allapanuga rikastamine mõjutab põrna ja ingvinaalseid lümfisõlmi, kuid mitte soolestiku lümfisõlmi

SPF-hiirte immuunsüsteemi aktiveerimise hindamisel on oluline jälgida, kuidas erinevad lümfoidsed organid reageerivad mikrobiotaga rikastamisele. Sellest tulenevalt analüüsiti siin katses hiirte põrna kaalu ning põrna ja ingvinaalsete lümfisõlmede rakkude arvu. Kuna hiired on koprofaagid ja omandavad allapanus olemasolevaid ekskrementide süües osa LMB-hiirte seedetrakti mikrobiotast, on huvitav teada, kas rikastus mõjutab ka soolestiku lümfisõlmede välja kujunemist ja suurust. Põrna ja ingvinaalsete lümfisõlmede rakud loeti üherakulisest suspensioonist, soolestiku lümfisõlmede uurimiseks võrreldi SPF-hiirte hematoküliini ja eosiiniga värvitud peensoole ja jämesoole koelõike pärast 8-nädalast rikastusperioodi AP-hiirte omadega.

Tulemused näitasid, et AP-hiirtel oli võrreldes SPF-hiirtega märgatavalt kõrgem põrna kaal ning suurenenud rakuarvukus nii põrnas kui ka ingvinaalsetes lümfisõlmedes (joonis 3A, 3B). Samas ei ilmnunud soolestiku lümfisõlmede pindala ega esinemissageduse (joonis 3C, 3D, 3E) osas statistiliselt olulisi erinevusi rühmade vahel. Need leiud viitavad sellele, et allapanuga rikastamine stimuleerib süsteemset immuunvastust, mis väljendub põrna ja ingvinaalsete lümfisõlmede rakkude arvu suurenemises, kuid ei pruugi piisavalt mõjutada soolestikuspetsiifiliste lümfisõlmede arengut. Üheks võimalikuks põhjuseks on, et allapanu kaudu üle kantav mikrobiota ei pruugi anda piisavat stimulatsiooni soolekoespetsiifiliste lümfisõlmede arenguks, või võis tulemust mõjutada üksik SPF-hiir, kellel esines tavapäratult suur hulk soole lümfisõlmi. Samuti ei saa välistada, et soolestiku lümfisõlmede arengu hindamiseks oli vaatlusaeg liiga lühike. Seega viitavad tulemused, et kuigi allapanuga rikastamine tekitab selge ja mõõdetava muutuse nii põrnas kui ingvinaalsetes lümfisõlmedes, võib selle mõju spetsiifiliselt soolekoe lümfoidsetele struktuuridele jääda tagasihoidlikuks või avalduda pikema aja jooksul.



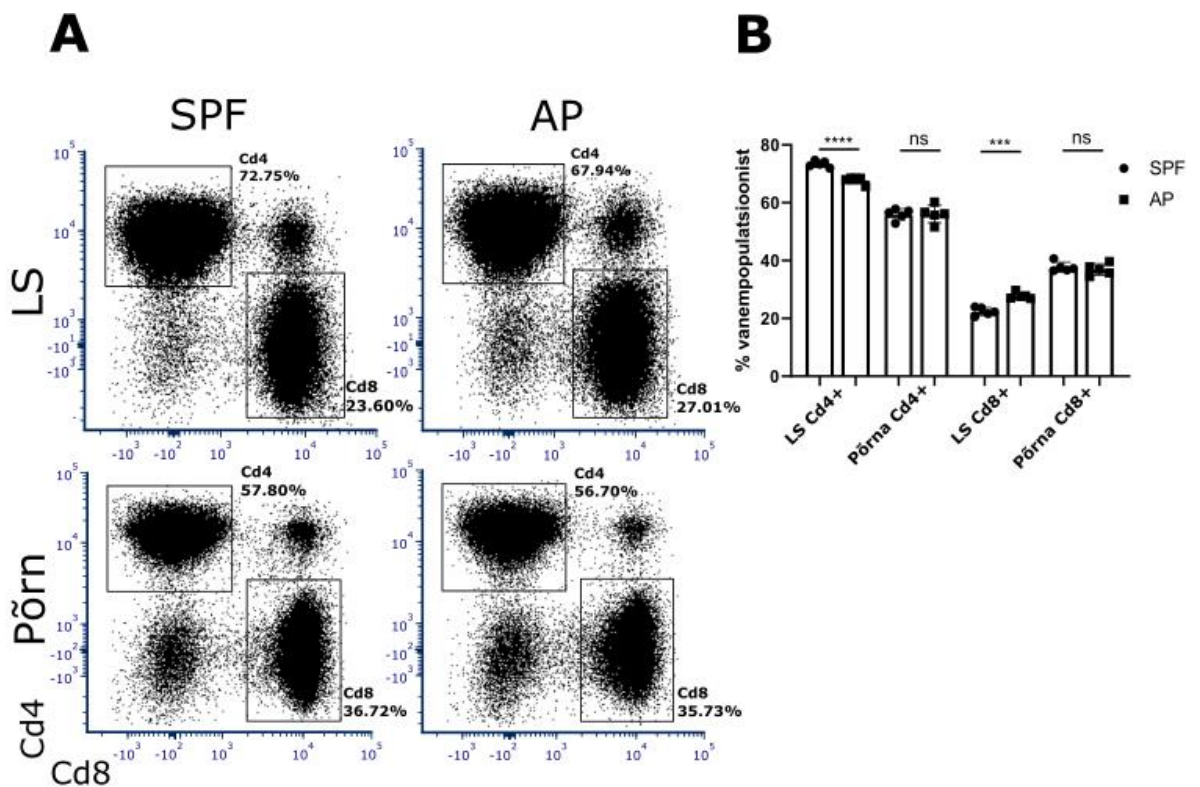
Joonis 3. Pörna kaalud ja pörna ning lümfisõlme (LS) raku arvud. Paneelil A on näha allapanu (AP) ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte pörnade kaalud milligrammides (mg). Paneelil B on näha ingvinaalsete LS ja pörna raku arve, kus võrreldakse SPF- ja AP-hiiri. **Soolestiku lümfisõlmede (LS) pindala ja arvukuse võrdlus spetsiifiliste patogeenide vaeste (SPF) ja allapanu (AP) hiirte vahel.** Mikroskoobiga mõõdeti soolestiku koelõikudel olevate LSde pindalasid ja arvukust. C-paneelil on peensoole koelõigu pildid SPF-ja AP-hiirtest. D-paneelil on lümfisõlmede pindala analüüsi graafik. E-paneelil on lümfisõlmede keskmise arvukuse analüüsi graafik. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati Mann-Whitney testi (ns $p > 0.05$). Graafiku y-teljel on LS pindala ruutmikrometrites (μm^2). LS – lümfisõlm; AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; μm – mikromeeter. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; mg – milligramm; LS – lümfisõlm.

2.3.3. Cd4 ja Cd8 T-rakkude üldpopulatsioonides ei esine allapanuga rikastamise järgselt suuri muutusi

Käesolevas töös annab Cd4 ja Cd8 T-raku populatsioonide analüüs olulist teavet selle kohta, kuidas mikrobioota rikastamine mõjutab SPF-hiire immuunsüsteemi. Katses hinnati Cd4 ja Cd8 T-rakkude osakaalu ingvinaalsetes lümfisõlmedes ja põrnas standardsete voolutsütomeetria meetoditega. Mõõdeti üldiseid Cd4 ja Cd8 T-raku populatsioone, et selgitada, kas mikrobioota rikastamine allapanuga avaldab mõju nende tasemele võrreldes SPF-hiirtega.

Tulemused näitasid, et lümfisõlmedes oli AP-hiirtel võrreldes SPF-hiirtega Cd4 rakke mõnevõrra vähem ja Cd8 rakke rohkem kui SPF-hiirtes (joonis 4A, 4B). Põrnas ei täheldatud Cd4 ega Cd8 T-rakkude tasemel olulisi erinevusi rühmade vahel. Kuigi lümfisõlmedes olid erinevused statistiliselt olulised, olid need absoluutarvudes väikesed. Seetõttu võib järeldada, et allapanuga rikastamise käigus T-rakkude peamiste populatsioonide nišš uuritud perifeersetes immuunorganites ei muutu. Siiski on varasemast teada, et allapanuga rikastamine põhjustab SPF-hiirte immuunsüsteemis nõrgemaid muutusi kui koosmajutamine LMB-hiirtega (Hamilton *et al.*, 2020). Sellest võib järeldada, et täheldatud erinevused T-rakkude osakaalus on kooskõlas oodatava mõõduka mõjuga.



Joonis 4. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd4 ja Cd8 populatsioonide jaotus.

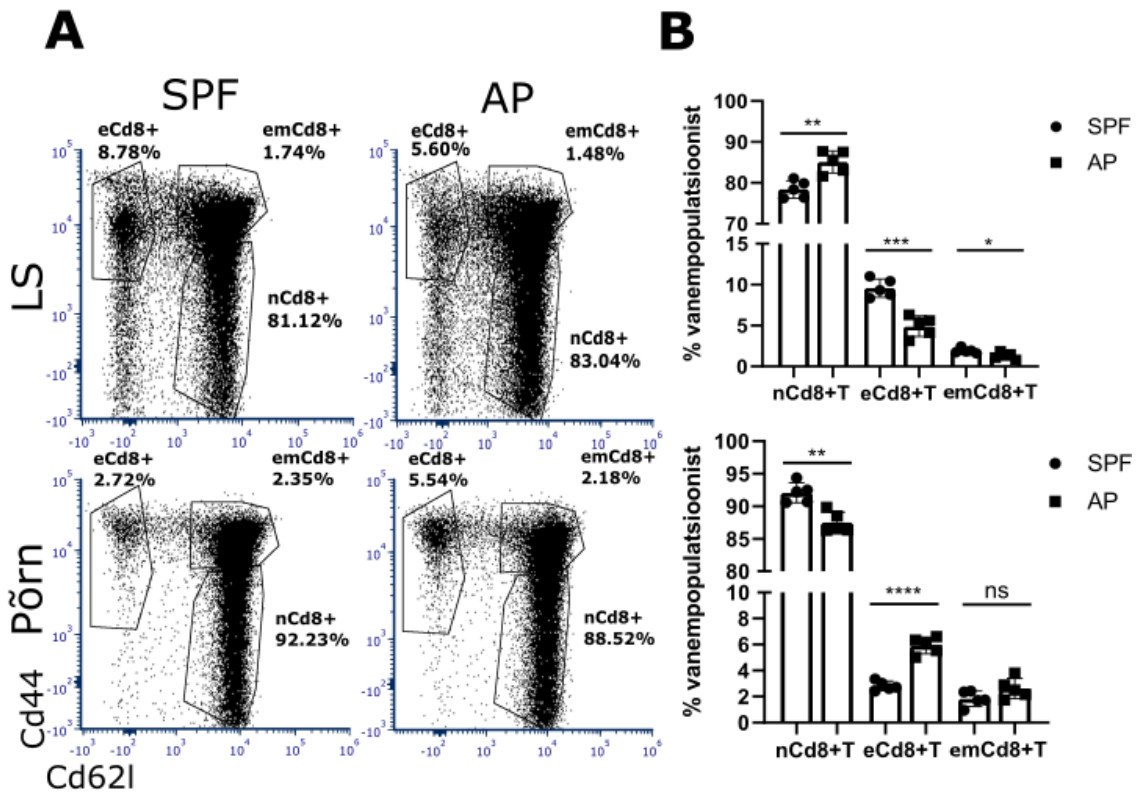
Voolutsütomeetriga loendati Cd4 ja Cd8 populatsioonid allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd4 ja Cd8 markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutatud punktogrammidega, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist. B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafik T-rakkude osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi ($ns > 0.05$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$). Graafikul on välja toodud T-raku vanempopulatsioonist Cd4 ja Cd8 populatsioonid, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*.

2.3.4. Allapanuga rikastamise tagajärjel muutub aktiveeritud Cd8 T-rakkude osakaal põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes

Cd8 T-rakkude üldosakaalu põhjal ei saa hinnata, kas immuunsüsteem on aktiveerunud (kuna muutused võivad toimuda ainult teatud alampopulatsioonides). Alampopulatsioonide analüüs võimaldab eristada, kas naiivsed rakud on diferentseerunud efektor- või mälu-T-rakkudeks, mis on otsene märk immuunaktivatsioonist. Seetõttu on Cd8 alampopulatsioonide jaotus oluline näitaja allapanuga rikastamise mõju hindamisel. Selles katses uuriti, kas LMB-hiirte allapanuga rikastamine mõjutab Cd8 T-rakkude alampopulatsioonide jaotust SPF-hiirtel. Voolutsütomeetria abil määrati Cd8 T-rakkude jaotus põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes markerite Cd44 ja Cd62L ekspressiooni alusel: naiivsed ($Cd44^-Cd62L^+$), efektor ($Cd44^+Cd62L^-$) ja efektor-mälu ($Cd44^+Cd62L^+$).

Põrnas täheldati AP-hiirtel naiivsete Cd8 T-rakkude ($Cd44^-Cd62L^+$) osakaalu vähenemist ning samaaegset efektor-T-rakkude ($Cd44^+Cd62L^-$) suurenemist (joonis 5A, 5B). Efektor-mälu-T-rakkude ($Cd44^+Cd62L^+$) osakaalus olulisi erinevusi ei ilmnenud. Lümfisõlmedes ilmnes aga vastupidine muster: AP-hiirtel oli rohkem naiivseid T-rakke ($Cd44^-Cd62L^+$) ning vähem nii efektor-T-rakke ($Cd44^+Cd62L^-$) kui ka efektor-mälu-T-rakke ($Cd44^+Cd62L^+$). Kirjanduse põhjal on teada, et Cd8 efektor- ja mälu-T-rakkude osakaal suureneb märgatavalt RMB-hiirtel. Näiteks Burger (2023) *et al.* kirjeldasid, kuidas koosmajutatud emastelt SPF-hiirtelt saadud pesakonnas kirjeldati lümfisõlmedes ja põrnas efektor-T-rakkude ($Cd44^+Cd62L^-$) ja efektor-mälu-T-rakkude ($Cd44^+Cd62L^+$) osakaalu tõusu võrreldes SPF-hiirtega. Lisaks näitasid nad sarnaselt selle töö tulemustele lümfisõlmedes ootamatut naiivsete T-rakkude ($Cd44^-Cd62L^+$) osakaalu kasvu. Selline erinevus kirjanduse ja selle töö tulemuste vahel võib tuleneda allapanu nõrgemast mõjust võrreldes muude meetoditega. See võib tähendada, et allapanu immuunaktivatsioon on liiga nõrk, et tekitada pikaajalist ja märgatavat muutust efektor mälu T-rakkudes ($Cd44^+Cd62L^+$). Samas võib efektor mälu T-rakkude ($Cd44^+Cd62L^+$) teke toimuda pikema aja jooksul kui see katse kestis (3 nädalat). Seda järeldust toetab AP-hiirte põrna naiivsete- ja efektor-rakkude osakaalus toimunud muutused. Need viitavad sellele, et AP-hiirte

immuunsüsteem on mingil määral aktiveerunud: naiivsed rakud on diferentseerunud efektor-rakkudeks, kuid ümberkujunemine mälorakkudeks ei ole veel toimunud.

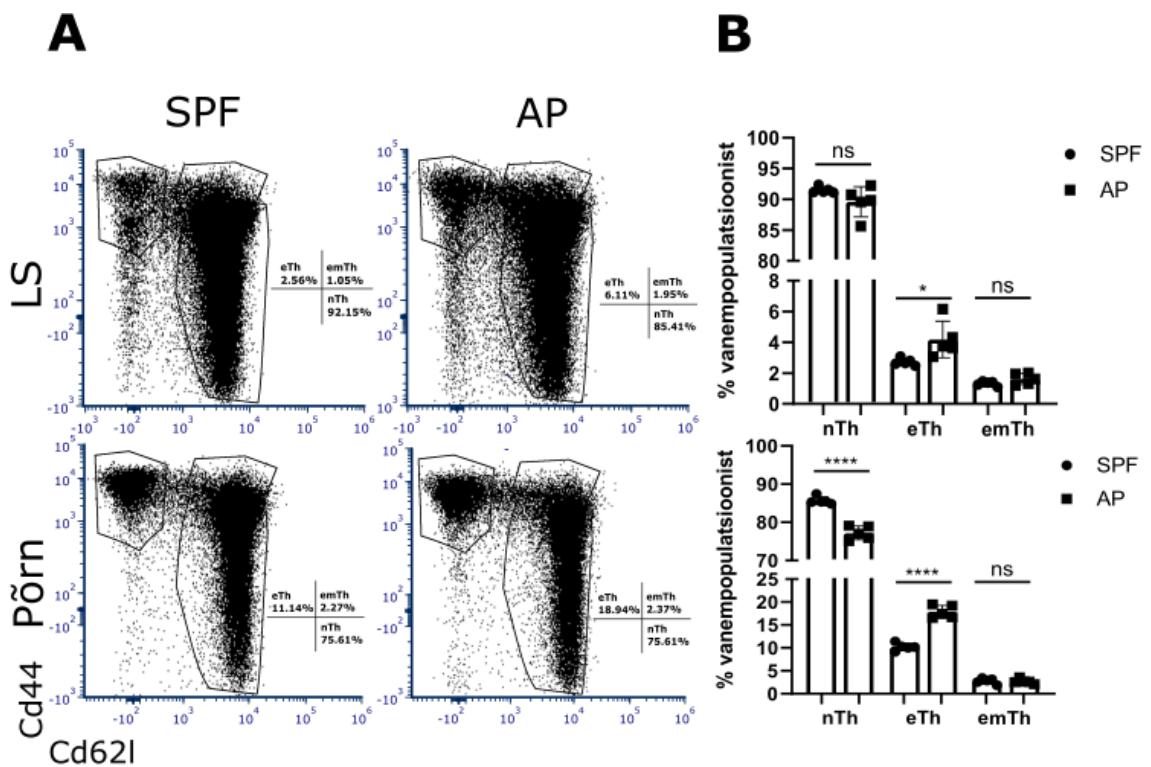


Joonis 5. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd8 alampopulatsioonide jaotus. Voolutsütomeetriga võrreldi Cd8 alampopulatsioone allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd44 ja Cd62l markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutavad punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist (Cd8⁺). B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafikud Cd8 alampopulatsioonide osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns – statistiliselt mitteoluline). Graafikul on välja toodud efektor (eCd8⁺), efektor mälu (emCd8⁺) ja naiivsed (nCd8⁺) Cd8 alampopulatsioonid, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*; rakupopulatsioonides: e – efektor, em – efektor-mälu, n – naiivne.

2.3.5. Allapanuga rikastamine mõjutab abistaja T-rakkude alampopulatsioone

Th- (abistaja T-rakud – *helper T-cells*) rakud aktiveerivad ja suunavad B-rakke ja tsütotoksilisi T-rakke ning mõjutavad kaasasündinud immuunsuse tõhusust (Alberts *et al.*, 2002). Seetõttu on nende alampopulatsioonide jaotus oluline näitaja peremeesorganismi immuunseisundi hindamisel. Selles katses uuriti, kas allapanuga rikastamine põhjustab muutusi Cd4 Th-rakkude alampopulatsioonides, mis viitaks immuunaktivatsioonile. Voolutsütomeetria abil määrati Th-rakkude jaotus põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes markerite Cd44 ja Cd62L ekspressiooni alusel: naiivsed (Cd44⁻Cd62L⁺), efektor (Cd44⁺Cd62L⁻) ja efektor-mälu (Cd44⁺Cd62L⁺).

Põrnas täheldati AP-hiirtel võrreldes SPF-hiirtega efektor-Th-rakkude ($Cd44^+Cd62L^-$) osakaalu selget tõusu ning naiivsete Th-rakkude ($Cd44^-Cd62L^+$) vähenemist (Joonis 6A, 6B). Efektor-mälu-Th-rakkude ($Cd44^+Cd62L^+$) osakaalus olulist erinevust ei ilmnenud. LS rakkudes ei täheldatud statistiliselt olulisi erinevusi Th-alampopulatsioonide jaotuses AP-ja SPF-hiirte vahel. Need tulemused viitavad sellele, et allapanuga rikastamine aktiveerib Cd4 Th-rakke, mille tulemusena toimub naiivsete rakkude diferentseerumine efektor-rakkudeks. Kuid sarnaselt Cd8 efektor-mälu ($Cd44^+Cd62L^+$) populatsioonidele võib Th-rakkude ümberdiferentseerumine olla veel pooleli ning efektor-rakud ei ole jõudnud mälu staadiumisse. Tõsiasi, et muutused ilmnesid selgelt põrnas, aga mitte lümfisõlmedes, võib viidata sellele, et allapanu ei ole sama tõhus meetod, kui on koosmajutus. Sarnast Cd44 Th-rakkude osakaalu erinevust on kirjeldanud ka Labuda (2022) jt, kus võrreldi RMB-hiiri SPF-hiirtega ja täheldati RMB-hiirte põrnas kõrgemal määral Cd44 Th-rakke kui SPF-hiirtes. Nende andmete kooskõla toetab järeldust, et allapanuga rikastamine mõjutab oluliselt SPF-hiirte T-raku profiili ja võib kaasa tuua süsteemse immuunaktivatsiooni.



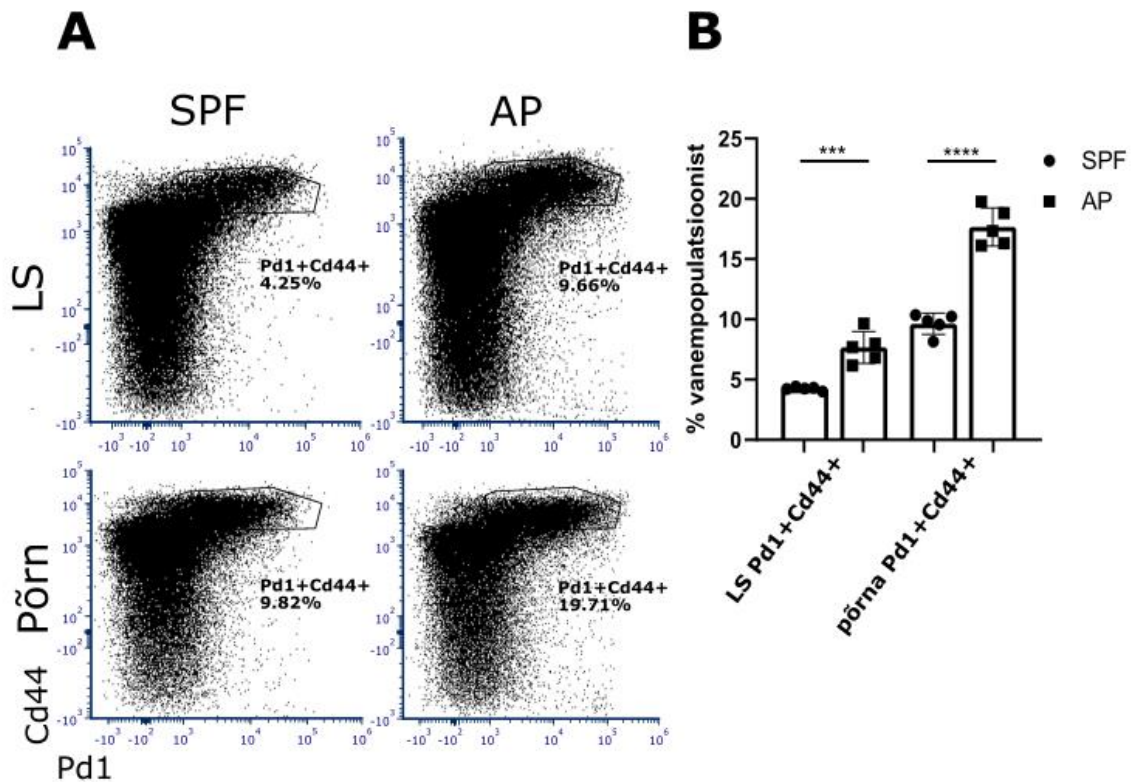
Joonis 6. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd4 T-raku abistaja rakkude (Th) alampopulatsioonide jaotus. Voolutsütomeetriga võrreldi Th alampopulatsioone allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd44 ja Cd62l markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke

kujutavad punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist (Cd4⁺). B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafikud Cd4 alampopulatsioonide osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns – statistiliselt mitteoluline). Graafikul on välja toodud efektor (eTh), efektor mälu (emTh) ja naiivsed (nTh) Th alampopulatsioonid, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*; rakupopulatsioonides: e – efektor, em – efektor-mälu, n – naiivne, Th – abistaja T-rakk.

2.3.6. Allapanuga rikastamine mõjutab aktiveeritud PD1-positiivsete T-rakkude osakaalu

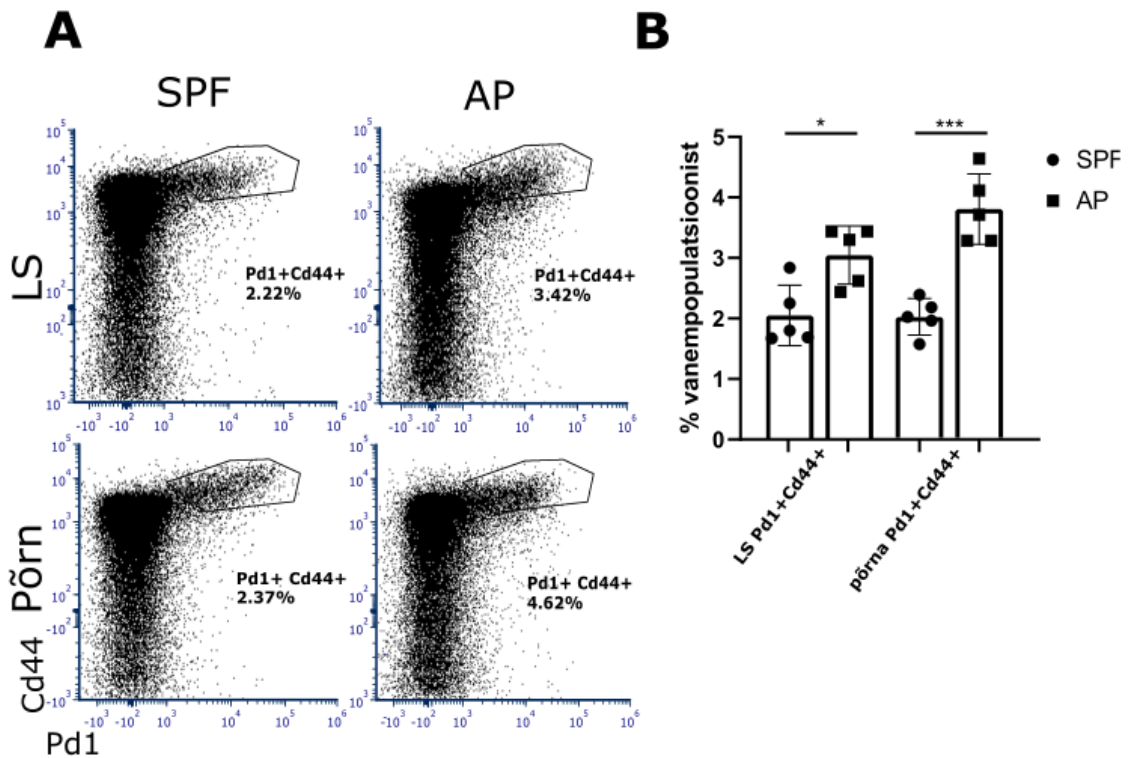
Pd1-positiivsete (Programmeeritud raku surma valk 1 – *Programmed cell death protein 1*) T-rakkude osakaalu hindamine on käesolevas töös oluline, sest see võimaldab hinnata, kas mikrobioota rikastamine mõjutab mitte ainult immuunvastuse aktivatsiooni, vaid ka immuunregulaatorseid mehhanisme (Hamilton *et al.*, 2020). Voolutsütomeetria abil määrati Cd4 ja Cd8 Pd1⁺ T-rakkude jaotus põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes markerite Cd44 ja Pd1 ekspressiooni alusel.

Tulemused näitasid, et AP-hiirtel suurenes Pd1⁺ T-rakkude osakaal kõigis vaadeldud rakupopulatsioonides, sealhulgas tugevaim tõus esines põrna CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakkudes ning ingvinaalsete lümfisõlmede CD4⁺ T-rakkudes (joonised 7A, 7B ja 8A, 8B). Selline muutus erineb Hamilton (2020) *et al.* uuringust, kus mikrobioota rikastamine SPF-hiirtel ei põhjustanud Pd1⁺ T-rakkude proportsiooni suurenemist. Kuigi Pd1 ekspressiooni on varasemalt peetud anergiliste ehk antigeenile mittereageerivate T-rakkude markeriks, viitab ta tegelikult anergiale peamiselt juhul, kui seda ekspresseeritakse koos teiste markeritega, nagu Tim3 (Sakuishi *et al.*, 2010). Käesolevas uuringus teisi anergiale viitavaid molekule ei analüüsitud. Seetõttu võib Pd1⁺ T-rakkude osakaalu tõus siin uuringus viidata pigem üldisele T-rakkude aktivatsioonile, mis on sarnane aktiveerumismarker Cd44-ga (Hong *et al.*, 2013). Siiski ei saa täielikult välistada, et koos aktiveeritud rakkudega on rikastamise järel suurenenud ka tegelike anergiliste rakkude hulk.



Joonis 7. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd4⁺ Cd44⁺ Pd1⁺ alampopulatsiooni jaotus.

Voolutsütomeetriga loendati Cd4 alampopulatsiooni allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd44 ja Pd1 markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutavad punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist. B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafik Cd4 alampopulatsioonide osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (***) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$). Graafikul on välja toodud Cd4 vanempopulatsioonist võetud Pd1 ja Cd44 positiivsete alampopulatsioon, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*.



Joonis 8. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd8 Cd44⁺ Pd1⁺ alampopulatsioonide jaotus.

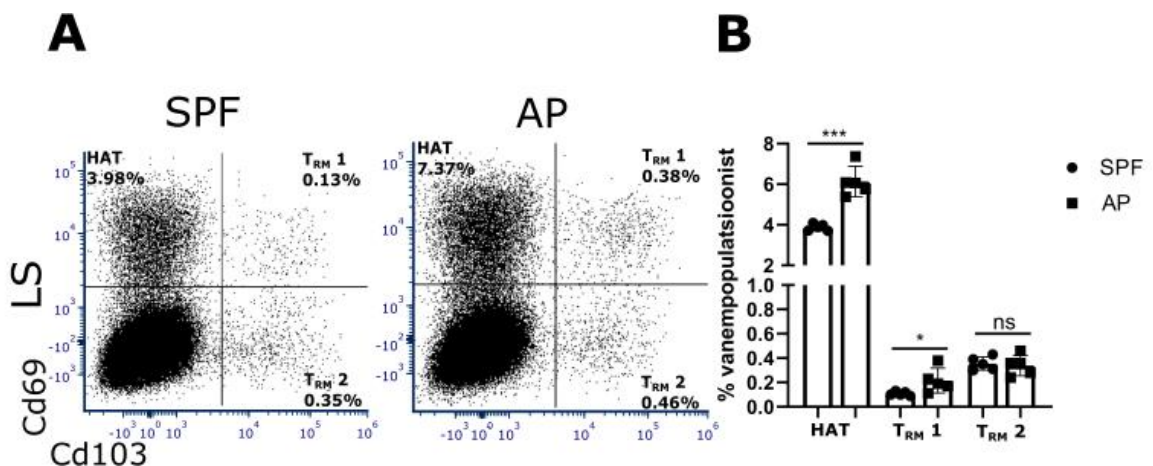
Voolutsütomeetriga loendati Cd8 alampopulatsioonide allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd44 ja Pd1 markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutatud punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist. B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafik Cd8 alampopulatsioonide osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Graafikul on välja toodud Cd8 vanempopulatsioonist võetud Pd1 ja Cd44 positiivsete alampopulatsioon, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*.

2.3.7. Allapanuga rikastamisel on nõrk mõju koes resideerivate T-rakkude osakaalule

T_{RM} id (koes resideerivad mälu T-rakud – *Tissue Resident Memory T cells*) on olulised lokaalse ja pikaajalise immuunkaitse kujunemisel. Need rakud tekivad pärast esmast kokkupuudet antigeeniga, liiguvad mittelümfoidsetesse kudedesse – nagu nahk või limaskestad – ning jäävad sinna paikseks. Seal võimaldavad nad sama patogeeniga uuesti kohtumisel kiiret ja tõhusat reageerimist. T_{RM} -rakkude olemasolu ja osakaal peegeldavad organismi eelnevat antigeenile reageerimise kogemust, mis on ülioluline just loomulikus, mitte-steriilses keskkonnas elavate organismide puhul (Morris *et al.*, 2019). Käesoleva töö raames on T_{RM} -rakkude analüüs oluline, kuna see võimaldab hinnata, kas allapanuga rikastamine suudab SPF-hiirte immuunvastust muuta LMB-hiirtele (ja seeläbi inimestele) sarnasemaks. Naiivsete T-rakkude diferentseerumine T_{RM} -rakkudeks näitab immuunsüsteemi valmisolekut juba kohatud

mikroobile uuesti reageerida, seega on nende olemasolu tugev marker rikastamise edukusest. Katses hinnati SPF- ja allapanuga rikastatud hiirte T_{RM} -alampopulatsioonide osakaalu põrnas ja ingvinaalsetes lümfisõlmedes. Voolutsütomeetria põhjal eristati T_{RM} -alampopulatsioone Cd69 ja Cd103 ekspressiooni alusel: hiljuti aktiveeritud T-rakud (HAT) (Cd69⁺Cd103⁻), klassikalised T_{RM} id (T_{RM} 1) (Cd69⁺Cd103⁺) ja mitteklassikalised T_{RM} id (T_{RM} 2) (Cd69⁻Cd103⁻).

Tulemused näitasid, et AP-hiirtel oli ingvinaalsetes lümfisõlmedes selge tõus HAT-rakkude (Cd69⁺Cd103⁻) osakaalus võrreldes SPF-hiirtega (Joonis 9A, 9B). Samuti suurenes tagasihoidlikult T_{RM} 1 (Cd69⁺Cd103⁺) arvukus. T_{RM} 2 (Cd69⁻Cd103⁻) osas erinevust ei täheldatud. Selline jaotus näitab, et mikroobiota rikastamine allapanuga stimuleerib koe-resideeruvate efektor- ja mälorakkude kuhjumist, mis viitab lokaalse immuunsuse aktiveerumisele. Varasemad uuringud on näidanud, et T_{RM} -rakkude areng ja funktsionaalsus sõltuvad tugevalt keskkonnast. Morris *et al* (2019) rõhutasid, et SPF- ja mikroobivabades tingimustes kasvatatud hiirtel on T_{RM} -rakkude tihedus ja diferentseerumise aste märgatavalt madalam võrreldes looduslikus keskkonnas elavate hiirtega. Need varasemad leiud kinnitavad käesoleva töö tulemusi. AP-hiirte T_{RM} -rakkude osakaalu tõus viitab edukale immuunsüsteemi rikastamisele, kuid ohutuma meetodiga, võrreldes koosmajutamisega. Seega annab T_{RM} 1 proportsiooni kasv olulise argumendi allapanuga rikastamise sobivusest.



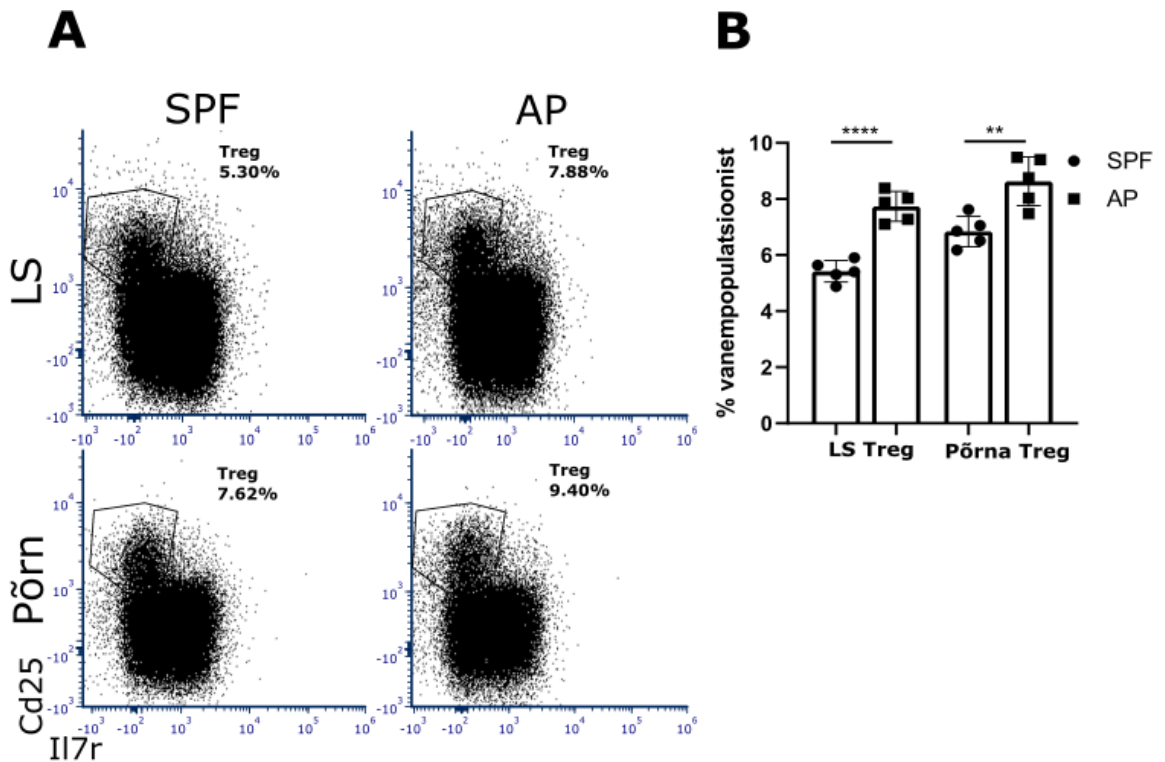
Joonis 9. Lümfisõlme (LS) Cd4 koes resideeruvate T-rakkude (T_{RM}) alampopulatsioonide jaotus. Voolutsütomeetriga võrreldi T_{RM} alampopulatsioone allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna rakke Cd69 ja Cd103 markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutatud punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist (T_{RM}). B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafikud T_{RM} alampopulatsioonide osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns – statistiliselt mitteoluline). Graafikul on välja toodud HAT (hiljuti aktiveeritud T-rakud), T_{RM} 1 (klassikaline T_{RM}) ja T_{RM} 2 (mitteklassikaline T_{RM}) T_{RM} alampopulatsioonid, y-teljel on

uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP-hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*; rakupopulatsioonides: e – efektor, em – efektor-mälu, n – naiivne, T_{RM} – *Tissue resident memory T-cell*.

2.3.8. Allapanuga rikastamine põhjustab muudatusi regulatoorsete T-rakkude populatsioonis

Tregide (regulatoorsed T-rakud – *regulatory T cell*) ülesanne on hoida immuunvastus kontrolli all ja vältida ülemäärast või ebasobilikku põletikulist reaktsiooni. Tregide tasakaal on oluline nii autoimmuunhaiguste ärahoidmiseks kui ka tolerantsuse säilitamiseks kommensaalsete mikroorganismide suhtes. Mitmed uuringud on näidanud, et mikrobiota koostis mõjutab Tregide arengut ja arvukust, eelkõige soolestikus, kus mikroobid omavad olulist rolli immuunvastuse kujundamisel (Geuking *et al.*, 2011; Wiechers *et al.*, 2021). Käesolevas töös hinnati, kas mikrobiota rikastamine LMB-hiirte allapanuga mõjutab SPF-hiirte Tregide osakaalu perifeersetes lümfoïdorganites. Selleks analüüsiti voolutsütomeetria abil Tregide osakaalu ingvinaalsetes lümfisõlmedes ja põrnas pärast 3-nädalast rikastamist. Tregide tuvastamiseks Cd4-positiivsete T-rakkude hulgast kasutati Cd25 ja Il-7r markereid.

Tulemused näitasid mõlemas vaadeldud koes AP-hiirte Tregide osakaalu tõusu (joonis 10A, 10B). Kuna Tregide aktivatsioon viitab organismi vajadusele tasakaalustada mikroobide poolt esile kutsutud immuunvastust, toetab see tulemus varasemate andmete põhjal tehtud oletust, et allapanuga rikastamine suudab käivitada kompleksse ja funktsionaalse immuunvastuse. Samas tuleb märkida, et kuigi mikrobiotaga rikastamise mõju Tregide dünaamikale on tõenäoliselt olemas, on see teaduskirjanduses seni veel vähe uuritud. Seetõttu jääb avatuks küsimus, kui tugev või kestlik on Tregide tõus võrreldes intensiivsemate rikastusmeetoditega.



Joonis 10. Lümfisõlme (LS) ja põrna Cd4 Treg alampopulatsiooni jaotus.

Voolutsütomeetriga loendati Cd4 alampopulatsiooni allapanuga (AP) hiirte ja spetsiifiliste patogeenide puudulike (SPF) hiirte ingvinaalsetest lümfisõlmedest (LS) ja põrna koe rakke Cd25 ja Il7r markerite alusel. A-paneelil on uuritavaid rakke kujutavad punktdiagrammid, kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist. B-paneelil on rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafik Tregi osakaalu kohta lümfisõlmes ja põrnas. Statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutati paaritud t-testi (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). Graafikul on välja toodud Cd4 vanempopulatsioonist Tregi populatsioon, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal LS või põrnas ning x-teljel on võrdlus SPF ja AP hiirte vahel. AP – allapanu; SPF – *specific pathogen free*; Cd – *cluster of differentiation*; Il7r – *Interleukin 7 receptor*.

KOKKUVÕTE

Teadustöodes kasutatud piiratud mikrobiootaga mudelorganismid nagu SPF ja mikroobipuudulikud hiired on olnud asendamatuks tööriistaks teadlaste jaoks. Viimasel aastakümnel on siiski hakatud rohkem tähelepanu pöörama mikrobioota ja immuunsüsteemi normaalse talitluse vahelisele seosele. LMB-hiired, kes omavad loomulikku mikrobiootat, jäljendavad edukamalt inimese immuunsüsteemi ja reaktsioone ravimitele ning haigustele. Varasemad katsed on näidanud inimestes ja LMB-hiirtes sarnaselt kõrgeid tasemeid diferentseerunud mälu T-rakke ja vähendatud Cd8 naiivseid T-rakke. Need sarnasused ei esine puuduliku mikrobiootaga hiirtel ja nende reaktsioonid kindlatele ravimitele ei ole vastanud ootustele. Näiteks võib tuua tõsiste tagajärgedega ebaõnnestunud kliinilise katse, kus inimeste immuunsüsteem reageeris palju jõulisemalt ja eluohtlikumalt ravimile, kui prekliinilistes katsetes kasutatud SPF-hiirte oma. Samas LMB-hiirte mikrobiootaga rikastatud SPF-hiired jäljendasid hiljem tehtud korduskatses edukalt inimese immuunsüsteemi reaktsiooni, tõestades, et naturaalse mikrobiootaga hiired on täpsemad mudelid inimeste uurimiseks. RMB-hiiri toodetakse enamasti kasutades koosmajutuse meetodit, aga see põhjustab suurt suremust SPF-hiirte seas.

Antud lõputöö eesmärgiks oli katsetada, kas allapanu kasutatav meetod suudaks vähendada SPF-hiirte suremust rikastamise protsessis, aga samas tekitada püsiva immuunaktivatsiooni. Töö tulemused kinnitavad eeldust, et allapanu põhjustab madalamat immunoloogilist stressi SPF-hiirtes kui koosmajutuse meetod. Allapanuga rikastamine ei põhjustanud silmnähtavat haigestumust ega suurendanud katsegrupis olevate loomade suremust. Üldiselt oli allapanuga hiirtel näha Cd8 ja Cd4 T-raku efektor populatsioonides tõusu ja naiivsetes langust, erandiks olid Cd8 T-rakud ja lümfisõlme naiivsed Th-rakud. Lisaks on näha nii Th, Cd44⁺Pd1⁺, T_{RM} ja Treg populatsioonides läbivat tõusu, mis viitab asjaolule, et LMB-hiirte allapanuga rikastamine on toimiv viis, kuidas saavutada immuunsüsteemi aktivatsiooni SPF-hiirtes.

Activating the immune system of SPF-mice using bedding of wild mice

Hannes Ruusmaa

SUMMARY

In scientific studies, model organisms with a limited microbiota, such as SPF (Specific Pathogen Free) and germ-free mice, have been indispensable tools for researchers. However, in the past decade, more attention has been paid to the relationship between the microbiota and the normal functioning of the immune system. Wild mice, which possess a natural microbiota, more successfully mimic the human immune system and reactions to drugs and diseases. Previous experiments have shown similarly high levels of differentiated memory T-cells and reduced Cd8 naive T-cells in humans and wild mice. These similarities do not occur in mice with a deficient microbiota, and their reactions to certain drugs have not met expectations. For example, a clinical trial with failed severe consequences when the human immune system responded much more vigorously and dangerously to a drug than the SPF mice used in preclinical trials. However, SPF mice enriched with the microbiota of wild mice later successfully mimicked the human immune system's reaction in a repeat experiment, proving that mice with a natural microbiota are more accurate models for human research. Mice with an enriched immune system are mostly produced using the cohousing method, but this causes high mortality among SPF mice.

The aim of this thesis was to test whether a bedding method could reduce the mortality of SPF mice during the enrichment process while still causing persistent immune activation. The results of the study confirm the assumption that bedding causes lower immunological stress in SPF mice. Enrichment with bedding did not cause visible illness or increase the mortality of the animals in the test group. In general, mice with bedding showed an increase in Cd8 and Cd4 T-cell effector populations and a decrease in naive ones, with the exception of Cd8 T-cells and lymph node naïve Th cells. Additionally, there is a consistent increase seen in Th, Cd44⁺Pd1⁺, TRM, and Treg populations, which proves that bedding taken from wild mice is an effective way to achieve immune system activation in SPF mice.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Uku Haljasorgu kannatlikkuse ja rahuliku olemuse eest. Molekulaarpatoloogia uurimisgruppi võimaluse eest bakalaureuse tasemel teadust teha. Oma ema kõrgtasemliste Wordi tehnikate eest. Oma elukaaslast Katariinat moraalse toe ja akadeemilise eeskuju eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science. Salvestatud <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., ... Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, *532*(7600), 512–516.
<https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Beutler, B., Milsark, I. W., & Cerami, A. C. (1985). Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science (New York, N.Y.)*, *229*(4716), 869–871. <https://doi.org/10.1126/science.3895437>
- Bradley, J. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, *214*(2), 149–160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Burger, S., Stenger, T., Pierson, M., Sridhar, A., Huggins, M. A., Kucaba, T. A., ... Schuldt, N. J. (2023). Natural microbial exposure from the earliest natural timepoint enhances immune development by expanding immune cell progenitors and mature immune cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *210*(11), 1740–1751.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300061>
- Casellas, J. (2011). Inbred mouse strains and genetic stability: A review. *Animal*, *5*(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1017/S1751731110001667>
- Compton, S. R., Paturzo, F. X., Smith, P. C., & Macy, J. D. (2012). Transmission of mouse parvovirus by fomites. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *51*(6), 775–780.
- Cross, A. S., Sadoff, J. C., Kelly, N., Bernton, E., & Gemski, P. (1989). Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor alpha/cachectin and murine interleukin 1 alpha protects mice from lethal bacterial infection. *The Journal of Experimental*

- Medicine*, 169(6), 2021–2027. <https://doi.org/10.1084/jem.169.6.2021>
- Dobson, G. P., Letson, H. L., Biros, E., & Morris, J. (2019). Specific pathogen-free (SPF) animal status as a variable in biomedical research: Have we come full circle? *EBioMedicine*, 41, 42–43. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.038>
- Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R., & Hoet, P. (1965). INDIGENOUS, NORMAL, AND AUTOCHTHONOUS FLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. *The Journal of Experimental Medicine*, 122(1), 67–76. <https://doi.org/10.1084/jem.122.1.67>
- Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., ... Stebbings, R. (2010). Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 512–526. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00922.x>
- Fisher, C. J., Agosti, J. M., Opal, S. M., Lowry, S. F., Balk, R. A., Sadoff, J. C., ... Benjamin, E. (1996). Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 334(26), 1697–1702. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342603>
- Fontaine, C. A., Skorupski, A. M., Vowles, C. J., Anderson, N. E., Poe, S. A., & Eaton, K. A. (2015). How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut Microbes*, 6(4), 225–233. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1054596>
- Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A. E., Ng, D. C. K., Slack, E., Hapfelmeier, S., ... Macpherson, A. J. (2011). Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity*, 34(5), 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
- Graham, A. L. (2021). Naturalizing mouse models for immunology. *Nature Immunology*, 22(2), 111–117. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00857-2>

- Gupta, M., & Shorman, M. (2025). Cytomegalovirus. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Salvestatud <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
- Hamilton, S. E., Badovinac, V. P., Beura, L. K., Pierson, M., Jameson, S. C., Masopust, D., & Griffith, T. S. (2020). New Insights into the Immune System Using Dirty Mice. *The Journal of Immunology*, 205(1), 3–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000171>
- Haribhai, D., Chatila, T. A., & Williams, C. B. (2016). Immunotherapy with iTreg and nTreg Cells in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1422, 197–211. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8_19
- Hong, J. J., Amancha, P. K., Rogers, K., Ansari, A. A., & Villinger, F. (2013). Re-Evaluation of PD-1 Expression by T Cells as a Marker for Immune Exhaustion during SIV Infection. *PLOS ONE*, 8(3), e60186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060186>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Labuda, J. C., Fong, K. D., & McSorley, S. J. (2022). Cohousing with Dirty Mice Increases the Frequency of Memory T Cells and Has Variable Effects on Intracellular Bacterial Infection. *ImmunoHorizons*, 6(2), 184–190. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2100069>
- Lane-Petter, W. (1962). The Provision and Use of Pathogen-Free Laboratory Animals. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 55(4), 253–263. <https://doi.org/10.1177/003591576205500402>
- Lo, B. C., Kryczek, I., Yu, J., Vatan, L., Caruso, R., Matsumoto, M., ... Núñez, G. (2024). Microbiota-dependent activation of CD4⁺ T cells induces CTLA-4 blockade-associated colitis via Fcγ receptors. *Science*, 383(6678), 62–70. <https://doi.org/10.1126/science.adh8342>
- Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using

- Mice To Understand Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 199(2), 383–388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700453>
- Morse, H. C. (2007). Chapter 1 - Building a Better Mouse: One Hundred Years of Genetics and Biology. J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer, & A. L. Smith (Toim), *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (1k 1–11). Burlington: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50013-3>
- Moseley, P., Klenerman, P., & Kadambari, S. (2023). Indirect effects of cytomegalovirus infection: Implications for vaccine development. *Reviews in Medical Virology*, 33(1), e2405. <https://doi.org/10.1002/rmv.2405>
- Paigen, K. (1995). A miracle enough: The power of mice. *Nature Medicine*, 1(3), 215–220. <https://doi.org/10.1038/nm0395-215>
- Rosshart, S. P., Herz, J., Vassallo, B. G., Hunter, A., Wall, M. K., Badger, J. H., ... Rehermann, B. (2019). Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6452), eaaw4361. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4361>
- Rosshart, S. P., Vassallo, B. G., Angeletti, D., Hutchinson, D. S., Morgan, A. P., Takeda, K., ... Rehermann, B. (2017). Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*, 171(5), 1015-1028.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.016>
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2187–2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., & Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28

Monoclonal Antibody TGN1412. *New England Journal of Medicine*, 355(10), 1018–1028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa063842>

Wiechers, C., Zou, M., Galvez, E., Beckstette, M., Ebel, M., Strowig, T., ... Pezoldt, J. (2021). The microbiota is dispensable for the early stages of peripheral regulatory T cell induction within mesenteric lymph nodes. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1211–1221. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00647-2>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Hannes Ruusmaa

(sünnikuupäev 26.03.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “SPF-hiirte immuunsüsteemi aktiveerimine loomuliku mikrobiotaga hiirte allapanuga”, mille juhendaja on Uku Haljasorg, PhD ja kaasjuhendaja Tõnis Org, PhD, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Hannes Ruusmaa

26.05.2025