

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wpływ metabolitów bakteryjnych na przebieg reakcji zapalnej w mysim modelu łuszczycy

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) łuszczycy, mikrobiota jelitowa, metabolity mikrobioty jelitowej, leukocyty

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) A – badania podstawowe

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

## 5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Klasyfikacja celu procedur: badania podstawowe z zakresu immunologii

Cel: W niniejszym projekcie chcielibyśmy zbadać wpływ doustnego traktowania metabolitem bakteryjnym na reakcję zapalną w mysim modelu łuszczycy indukowanym Imikwimodem (Imiquimod 5%; IMQ), a także zdefiniować mechanizm obserwowanej modulacji odpowiedzi immunologicznej.

W tym celu przez okres dwóch tygodni przed indukcją łuszczycy a następnie w trakcie wywoływania choroby, myszy otrzymają metabolit bakteryjny w wodzie do picia lub samą wodę. W dniu zero, zostanie dokonany pomiar grubości małżowiny usznej u wszystkich myszy po czym rozpocznie się proces wywoływania łuszczycy u połowy myszy otrzymujących metabolit bakteryjny w wodzie do picia oraz u połowy zwierząt pojonych samą wodą. W celu wywołania łuszczycy przez pięć kolejnych dni,

wskazane dwie grupy myszy będą traktowane na uszy kremem IMQ (5%). Myszy w grupach kontrolnych (pojęte wodą z metabolitem bakteryjnym lub samą wodą) będą traktowane przez pięć kolejnych dni na uszy kremem na bazie lanoliny. W dniu 6 dokonany będzie pomiar przyrostu grubości małżowiny usznej we wszystkich grupach. Następnie zwierzęta zostaną uśmiercone w celu izolacji tkanek do dalszych badań.

Indukcja łuszczycy wiąże się z niewielkim dyskomfortem i dystresem zwierząt, wynikającym z unieruchomienia w trakcie aplikacji kremu a także pomiarze grubości małżowiny usznej, wykonywanych w anestezji wziewnej (Izofluran 3-4%). Nieznaczny ból może być również związany ze stanem zapalnym powstającym w trakcie indukcji łuszczycy.

Obecnie dostępne badania wskazują, że osoby cierpiące na łuszczycę mają nieprawidłową kompozycję jelitowej mikrobioty. Nie wiadomo jednak, jak poszczególne mikroorganizmy lub produkty ich metabolizmu wpływają na przebieg stanu zapalnego w mysim modelu łuszczycy indukowanym IMQ.

Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę dotyczącą wpływu mikrobioty jelitowej na reakcję zapalną na obwodzie. Pozwolą nam zdefiniować wpływ metabolitów bakteryjnych na intensywność reakcji zapalnej w mysim modelu łuszczycy oraz zdefiniują mechanizmy modulujące aktywność komórek układu immunologicznego.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badania wykonywane będą z wykorzystaniem 540 osobników gatunku Mysz domowa szczep BALB/c.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

### Zastosowanie 3R

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8



### **Replacement (zastąpienie):**

Wykorzystanie zwierząt doświadczalnych jest jedynym możliwym sposobem oceny wpływu metabolitu bakteryjnego, na funkcję komórek układu odpornościowego w mysim modelu łuszczycy indukowanym IMQ. Żaden inny model zwierzęcy nie odwzorowuje dokładniej zmian charakterystycznych dla łuszczycy u człowieka. Modele *in vitro* są również niedoskonałe, gdyż nie odwzorowują złożonych i wzajemnie powiązanych układów immunoregulacyjnych odpowiedzialnych za rozwój choroby. Dodatkowym elementem utrudniającym zastąpienie tych badań, badaniami *in vitro* jest specyfika komórek układu immunologicznego, które różnicują się wieloetapowo w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne oraz tkankowo specyficzne, sprawiające, że tylko modele *in vivo* pozwalają nam w pełni ocenić ich rolę w obserwowanym procesie patologicznym.

Mikrobiota jelitowa jest złożonym, połączonym wzajemnymi zależnościami i do końca niezdefiniowanym układem. Jego dominującą część stanowią mikroorganizmy beztlenowe co sprawia, że określenie ich immunoregulacyjnych właściwości poza układem *in vivo* jest trudne. Powiązanie mikroorganizmów jelitowych siecią zależności sprawia, że wprowadzenie jakiejkolwiek substancji z zewnątrz, może prowadzić do zmiany profilu mikrobioty jelitowej, co będzie miało przełożenie na uzyskane wyniki. Zatem badania nad immunoregulacyjnymi właściwościami mikrobioty jelitowej w układzie *in vivo*, nie mogą być zastąpione w żaden inny sposób.

Procedury stosowane w przedstawionym wniosku są proste do przeprowadzenia i niosą minimalne ryzyko śmiertelności wynikającej z samej procedury. Model łuszczycy jest stosunkowo prosty i dobrze opracowany oraz jest powszechnie stosowany w laboratoriach na całym świecie (Leslie van der Fits, J. Immunol. 2009). Stosowny w proponowanych przez nas badaniach metabolit, znajduje się w jelitach i krwioobiegu, zarówno zwierząt jak i ludzi. Liczne badania wskazują na jego protekcyjne działanie w wielu układach sugerując, że pojenie myszy roztworem zawierającym tę substancję nie będzie niosło ze sobą dystresu.

### **Reduction (ograniczenie):**

Nasze wcześniejsze wieloletnie doświadczenia oceniające stan zapalny w skórze uszu wskazują, że grupa badana powinna zawierać co najmniej 10 osobników (przy wykorzystaniu myszy wilde type).

Zaproponowana liczba myszy w grupie umożliwia wiarygodną analizę statystyczną uzyskanych wyników, polegającą na sprawdzeniu rozkładu wyników w populacji, co determinuje wybór odpowiedniego testu statystycznego. Prawidłowo przeprowadzona analiza statystyczna wyników gwarantuje słuszność i poprawność wyciągniętych wniosków badawczych.

Dodatkowo by upewnić się, że uzyskane wyniki są powtarzalne oraz sprostać wymaganiom czasopism naukowych, przeprowadzone doświadczenia muszą zostać powtórzone 3-krotnie.

Po zakończeniu doświadczeń od myszy będzie pobierany materiał biologiczny (m.in. tkanki) do dalszej analizy metodami *in vitro*. Wielokierunkowe (*in vivo* oraz *in vitro*) podejście do badań pozwala na uzyskanie maksymalnej ilości danych z każdego zwierzęcia.

#### **Refinement (udoskonalenie):**

Prowadzona hodowla w warunkach sterylnych w indywidualnie wentylowanych klatkach umożliwia ograniczenie wystąpienia i rozprzestrzeniania zakażeń, które mogą negatywnie wpływać na dobrostan zwierząt. Uzyskane w ten sposób wyniki szczególnie w kontekście badań nad mikrobiotą jelitową, charakteryzują się dużą wiarygodnością oraz wartością poznawczą.

W celu zminimalizowania dyskomfortu zwierząt, związanego z chwilowym unieruchomieniem zwierzęcia w trakcie przeprowadzania niektórych czynności w procedurach, w momencie przytrzymywania go w dłoni, od chwili odstawienia młodych od matki wprowadzona jest rutynowa procedura „handlingu”.

W celu ograniczenia dyskomfortu zwierząt, w trakcie wykonywania czynności, w których zwierzę narażone jest na dłuższe unieruchomienie mogące powodować dystres, stosowane jest znieczulenie wziewne – Izofluran w dawce 3-4%. Wdychanie par Izofluranu powoduje zapadnięcie zwierzęcia w głęboki sen. Dodatkowo stosowane znieczulenie umożliwia przeprowadzenie procedur w sposób jak najbardziej precyzyjny.

Na podstawie wcześniej przeprowadzonych doświadczeń skróciliśmy czas potrzebny do stwierdzenia wpływu mikrobioty jelitowej na reakcję immunologiczną na obwodzie z 3 do 2 tygodni, tym samym udoskonaliliśmy metodę.

W celu wykluczenia negatywnego wpływu badanej substancji na myszy, w trakcie doświadczeń będziemy oceniać przyrost masy ciała oraz w ilości przyjmowanego pożywienia i wypijanych płynów pomiędzy grupami (woda vs. woda z badaną substancją). Dodatkowo będziemy obserwować zachowanie zwierząt.

Opieka nad zwierzętami w procedurach, jak i same procedury badawcze będą wykonywane przez wyspecjalizowany personel posiadający udokumentowane kwalifikacje.

Stan zdrowia zwierząt będzie codziennie monitorowany pod kątem oceny rzeczywistej dotkliwości procedur. Wszelkie objawy dystresu będą konsultowane z Zespołem ds. Dobrostanu Zwierząt.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.