

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Analiza zależności pomiędzy rozwojem choroby Gravesa-Basedowa a zmianami w obrębie mikrobiomu i produkowanych przez niego metabolitów**

2. Czas trwania projektu: **2 lata**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **choroba Gravesa-Basedowa, orbitopatia tarczycowa, metabolom, mikrobiom**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **B**

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.

Choroba Gravesa-Basedowa (GD) to choroba autoimmunologiczna prowadząca do nadczynności tarczycy, której często towarzyszy stan zapalny tkanek oczodołu objawiający się wytrzeszczem oczu (orbitopatią). Zmiany oczne są przyczyną dyskomfortu, a nawet utraty wzroku u chorych. Medycyna wciąż nie dysponuje terapiami, które ograniczałyby rozwój choroby bez zakłócania równowagi całego organizmu. Wczesne wykrywanie choroby jest również mało efektywne. Wyniki z badań nad innymi chorobami autoimmunologicznymi pozwalają przypuszczać, że rozwojowi GD towarzyszy istotna zmiana w składzie mikroorganizmów jelitowych (mikrobiomu). Jednak niezbadany jest związek pomiędzy rozwojem choroby a aktywnością metaboliczną mikroorganizmów. Zakładamy, że rozwój choroby może skutkować nie tylko zmianami w proporcjach samych mikroorganizmów tworzących mikrobiom, ale powodować istotne zaburzenia w ich aktywności metabolicznej. Objawiać się to może poprzez zaburzenia syntezy i wydzielania określonych związków lub pojawianie się

nowych klas metabolitów, które zwrotnie mogą wpływać na rozwój autogresji i towarzyszących jej objawów, np. stanów zapalnych.

Celem projektu jest analiza składu metabolitów (metabolomu) produkownego przez mikrobiom w warunkach zaindukowanej GD i poszukiwanie zależności pomiędzy zaawansowaniem procesu chorobowego a zmianami w składzie mikroorganizmów i produkowanych przez nie związków. W badaniach zostanie użyty mysz model GD. Wyniki analizy składu mikrobiomu i metabolomu u zwierząt kontrolnych (brak procesu chorobowego) będą punktem odniesienia i pozwolą na analizę porównawczą z wynikami otrzymanymi dla grupy badanej (aktywny proces chorobowy). Dotychczas takie badania nie były prowadzone.

Potencjalne zyski z tego badania, to opracowanie (i) nowych metod wczesnego wykrywania GD opartych o identyfikację określonych mikroorganizmów/metabolitów oraz (ii) terapii, opartych na modulacji mikroflory jelitowej i produkowanego przez nie metabolomu (np. poprzez suplementację określonych grup bakterii, czy podawanie określonych związków produkowanych przez bakterie).

Przewidywane szkody u zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniu są ograniczone do serii czterech iniekcji połączonych z miejscowym działaniem prądu o niskiej częstotliwości (czynności w znieczuleniu). Procedura zakończy się uśmierceniem zwierząt i pobraniem tkanek do badań. Jak dotąd nie opisano przypadków przedwczesnej śmierci zwierząt, czy oznak cierpienia wynikających z zastosowanej procedury i rozwijającej się choroby. Pojawiająca się u zwierząt orbitopatia może przejawiać się obrzękiem tkanek miękkich, jednak nie prowadzi do utraty wzroku. Stan zdrowia zwierząt będzie stale monitorowany przez wykwalifikowany personel. Osobniki wykazujące objawy cierpienia zostaną natychmiast bezboleśnie uśmiercone.

Charakter badania: translacyjny; kategoria: „Badania translacyjne lub stosowane-zaburzenia układu odpornościowego u człowieka”.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*) szczepu BALB/c, 20 samic

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Opracowując projekt przeanalizowaliśmy piśmiennictwo dotyczące planowanego eksperymentu w bazach: Pubmed oraz Google Scholar. Jako słowa kluczowe zastosowaliśmy: “Graves’ disease, thyroid eye disease, gut microbiome, gut metabolome, fecal metabolome”. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa stwierdzamy, że w literaturze światowej brak jest badań, które opisywałyby zmiany w składzie mikroorganizmów jelitowych (mikrobiomu) i ich metabolitów (metabolomu) towarzyszących rozwojowi choroby Gravesa-Basedowa (GD) z

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

użyciem modelu mysiego tej choroby.

Zgodnie z zasadą „Reducement” zredukowaliśmy liczbę myszy w badaniu do 20, czyli u 10 zwierząt będzie wywoływana choroba, natomiast u pozostałych 10 osobników proces chorobowy nie będzie inicjowany i grupa ta stanowić będzie grupę kontrolną, względem której porównamy otrzymane analizy mikrobiomu i metabolomu. Tak niska liczebność grup osobników możliwa jest dzięki wykorzystaniu modelu choroby Gravesa-Basedowa opracowanego w Wielkiej Brytanii, który gwarantuje wysoką wydajność i powtarzalność procesu immunizacji. Badania prowadzone będą na osobnikach płci żeńskiej, ponieważ choroby autoimmunologiczne tarczycy częściej występują u kobiet oraz wykazano, że wydajność immunizacji prowadząca do rozwoju choroby w grupie mysich samic jest na poziomie >80%, co oznacza, że na 10 immunizowanych osobników w co najmniej 8 przypadkach dojdzie do wywołania GD. W innych dostępnych modelach, obserwuje się niepełny rozwój objawów GD i niższą wydajność immunizacji. Obniżenie liczby osobników w badanych grupach (poniżej liczby 10 w grupie) może skutkować brakiem możliwości wykonania analizy statystycznej. Żaden ośrodek na świecie nie dysponuje gotowym zebraniem już materiałem badawczym, którego moglibyśmy użyć w proponowanym projekcie.

Zgodnie z zasadą „Replacement”, poszukiwaliśmy metod pozwalających uniknąć wykorzystania zwierząt w planowanych badaniach. Stwierdziliśmy, że odtworzenie modelu ludzkiej nadczynności tarczycy z orbitopatią, w której patologiczne procesy dotyczą jednocześnie różnych tkanek (tarczycy i tkanki okołococznej) jest możliwe tylko u zwierząt doświadczalnych (w przypadku tego projektu – myszy szczepu BALB/c). Proponowany w projekcie model gwarantuje uzyskanie wszystkich typowych dla rozwoju GD objawów patologicznych obserwowanych u pacjentów. Żaden ośrodek na świecie nie dysponuje gotowym zebraniem już materiałem badawczym, czyli mysim kałem zbieranym w punktach czasowych, którego moglibyśmy użyć w proponowanym projekcie. Nie ma również możliwości przeprowadzenia planowanego doświadczenia poza granicami Polski. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, żaden inny ośrodek obecnie nie prowadzi badań o charakterze podstawowym z użyciem modelu GD, w trakcie których moglibyśmy pobrać badań do naszych analiz.

Zgodnie z zasadą „Refinement”, aby zapewnić dobrostan i zmniejszyć ewentualne cierpienie, zapewnimy myszom:

- przebywanie w trakcie doświadczenia po 4-5 osobników w klatce ze wzbogaconym środowiskiem;
- regularny handling, czyli zwierzęta przeznaczone do doświadczenia będą (i) codziennie delikatnie wyjmowane z klatek i kładzione na ubraniu osoby, która później będzie przeprowadzała doświadczenie, jak również (ii) krótko trzymane w uchwycie pozwalającym ogolić sierść w miejscu przyszłej iniekcji i działania prądu o niskiej częstotliwości (w wyniku działania impulsu prądu elektrycznego w błonie komórkowej powstają przejściowo nanopory, przez które przedostają się do wnętrza komórek wstrzykiwane domięśniowo substancje). Zwierzęta będą też przyzwyczajane do szumu golarki.
- wykonywanie poszczególnych procedur zawsze przez osobę wcześniej uczestniczącą w handlingu;
- stałą kontrolę stanu zwierząt (obserwacja zachowania i objawów fizjologicznych) przez wykwalifikowany

personel;

-ograniczony czas trwania wszystkich czynności doświadczalnych do niezbędnego minimum.

Czas życia zwierząt z indukowaną nadczynnością tarczycy zostanie skrócony względem planowanego, jeżeli zaobserwujemy u nich cierpienie zbliżające się do niedopuszczalnego poziomu. Co istotne, wcześniejsze badania wykazały jednoznacznie, że indukowanie choroby Gravesa-Basedowa i towarzyszącej orbitopatii u myszy szczepu BALB/c nie powoduje przedwczesnej śmierci zwierząt, czy wyraźnych oznak cierpienia wynikających z rozwijającej się choroby. Stan zapalny w tkankach okołooocznych będzie prowadził do wytrzeszczu oczu o różnym nasileniu, jednak proces ten nie doprowadzi to do utraty wzroku u zwierząt.

Osoby uczestniczące w doświadczeniu stale podnoszą swoje kompetencje w ramach samokształcenia, uczestnictwa w konferencjach PollASA i projektach naukowych związanych z chorobami autoimmunologicznymi.

Przewidujemy, że planowane przez nas doświadczenia przyniosą istotne korzyści dla medycyny, poprzez zrozumienie roli mikrobiomu jelitowego i ich metabolitów w rozwoju nadczynności tarczycy GD i w dalszej perspektywie mogą pomóc w opracowaniu nowych metod diagnostycznych oraz terapii dla pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.