

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Wpływ zahamowania pompy protonowej na odpowiedź immunologiczną w modelu nadwrażliwości kontaktowej (CHS) u myszy”

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) nadwrażliwość kontaktowa, mikrobiota, flora jelitowa, inhibitor pompy protonowej

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

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.

Zostały przeszukane bazy danych w zasadach 3R

Klasyfikacja celu procedur: badania podstawowe z zakresu immunologii

Cel: W niniejszym projekcie pragniemy zaproponować przeprowadzenie badań które mają na celu określenie wpływu dysbiozy mikrobioty jelit indukowanej za pomocą powszechnie stosowanych w terapii choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, inhibitorów pompy protonowej na reakcję zapalną w mysim modelu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, to jest reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CHS), a także zainicjować badania mające na celu zdefiniowanie mechanizmu obserwowanej immunoregulacji.

Naturalna flora bakteryjna jelit reguluje odpowiedź immunologiczną w jelicie i na obwodzie. Badania prowadzone w Katedrze wykazały, że modyfikacja składu jelitowej mikrobioty, poprzez dwutygodniową doustną aplikację antybiotyku o szerokim spektrum działania, hamuje odpowiedź immunologiczną na obwodzie w mysim modelu CHS.

W chwili obecnej brak jest informacji na temat wpływu dysbiozy indukowanej stosowaniem inhibitorów pompy protonowej na rozwój i przebieg reakcji CHS, dlatego też celowe wydaje się być podjęcie badań zmierzających do określenia wpływu dysbiozy inicjowanej IPP na funkcjonowanie odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez komórki.

W naszych badaniach posłużymy się powszechnie stosowanym modelem reakcji CHS u myszy (model aktywnego uczulenia). W celu zbadania wpływu IPP na reakcję CHS, przez okres dwóch tygodni przed aktywnym uczuleniem haptenem TNP-Cl, a następnie przez cztery kolejne dni, aż do pobrania materiału lub wywołania reakcji CHS będziemy podawać myszą C57BL/6J roztwór IPP poprzez iniekcję dootrzewnowo.

Podanie IPP oraz indukcja CHS wiąże się z niewielkim dyskomfortem i dystresem zwierząt, wynikającym z unieruchomienia w trakcie dootrzewnowego podania IPP, immunizacji a także pomiarze grubości małżowiny usznej, wykonywanych w anestezji wziewnej (Izofluran 3-4%). Nieznaczny ból może być również związany z stanem zapalnym powstającym w trakcie indukcji reakcji CHS.

Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę na temat wpływu inhibitorów pompy protonowej na odpowiedź immunologiczną mediowaną przez komórki. Uzyskane wyniki będą miały odniesienie do CHS która jest mysim modelem alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Co więcej, z racji tego, że reakcja CHS jest reakcją prototypową dla reakcji mediowanych przez limfocyty T uzyskane wyniki będzie można analizować pod kątem zaangażowania w rozwój i przebieg chorób o podłożu autoimmunologicznym.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badania wykonywane będą z wykorzystaniem 360 osobników gatunku Mysz domowa szczep C57BL/6 J.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zastosowanie 3R

Replacement (zastąpienie):

Wykorzystanie zwierząt doświadczalnych jest jedynym możliwym sposobem oceny wpływu zmian mikrobioty jamy ustnej wywołanych aplikacją Eludrilu na błony śluzowe jamy ustnej i zębów na funkcjonowanie odpowiedzi immunologicznej w mysim modelu CHS. Do tej pory nie opracowano metody zastępczej dla zwierzęcego modelu reakcji CHS. 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 co sprawia, że tylko modele *in vivo* pozwalają nam w pełni ocenić ich rolę w obserwowanym procesie patologicznym.

W naszych doświadczeniach chcemy również, ocenić rolę mikrobioty jamy ustnej zmienionej Eludrilem. Mikrobiota jamy ustnej jest do końca niezdefiniowanym, złożonym i połączonym wzajemnymi zależnościami układem, którego istotną część stanowią mikroorganizmy które nie zostały do tej pory sklasyfikowane. Uniemożliwia to zatem, jakiegokolwiek badanie immunoregulacyjnych właściwości mikrobioty jamy ustnej poza układami *in vivo*.

Procedury stosowane w przedstawionym wniosku są proste do przeprowadzenia i niosą minimalne ryzyko śmiertelności wynikającej z samej procedury. Model CHS jest stosunkowo prosty i dobrze opracowany oraz jest powszechnie stosowany w laboratoriach na całym świecie (Rose et al. Exp. Dermatol 2012; Zemelka-Wiącek et al. J Immunol Methods, 2013)

Reduction (ograniczenie):

Nasze wcześniejsze wieloletnie doświadczenia, w model nadwrażliwości kontaktowej, wskazują, że grupa badana powinna zawierać co najmniej 10 osobników (przy wykorzystaniu myszy *wilde type*).

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

Zaproponowana liczba mysz 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 odtwarzalne 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 indywidulanie 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.

W trakcie prowadzonych przez nas doświadczeń, będziemy ważyć myszy, w celu stwierdzenia ewentualnych różnic w przyroście masy ciała oraz w ilości przyjmowanego pożywienia i wypijanych płynów pomiędzy grupami, co mogłoby świadczyć o dystresie. Dodatkowo będziemy analizować

zmiany w zachowaniu 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 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.