

## NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

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

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) antybiotyki, łuszczycyca, mikrobiota jelitowa, 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.

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 częściowej eliminacji naturalnej mikrobioty jelitowej przy pomocy antybiotyku na reakcję zapalną w mysim modelu łuszczycy indukowanym Imikwimodem (IMQ, Imiquimod 5%), a także zdefiniowanie mechanizmu obserwowanej immunoregulacji.

W tym celu przez okres dwóch tygodni przed indukcją łuszczycy, a następnie w trakcie indukcji choroby aż do testu, myszy otrzymają antybiotyk o szerokim spektrum działania 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 antybiotyki o szerokim spektrum działania 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 (pojone wodą z antybiotykiem o szerokim spektrum działania 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 z stanem zapalnym powstającym w trakcie indukcji łuszczycy.

W chwili obecnej doniesienia na temat wpływu częściowej eliminacji mikrobioty bakteryjnej jelit na reakcję zapalną w mysim modelu łuszczycy są nieliczne, a mechanizmy immunoregulacyjne będące wynikiem modyfikacji naturalnej mikrobioty jelit są słabo zdefiniowane.

Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę dotyczącą wpływu mikrobioty jelitowej na reakcję zapalną na obwodzie. Pozwolą nam zdefiniować wpływ częściowej eliminacji mikrobioty bakteryjnej jelit na intensywność reakcji zapalnej w modelu łuszczycy oraz scharakteryzują mechanizmy poprzez, które mikrobiota jelitowa moduluje aktywność komórek układu immunologicznego.

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

Badania wykonywane będą z wykorzystaniem 1230 osobników gatunku Mysz domowa szczep Balb/c.



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

### Zastosowanie 3R

#### Replacement (zastąpienie):

Wykorzystanie zwierząt doświadczalnych jest jedynym możliwym sposobem oceny wpływu zmian mikrobioty jelitowej wywołanych aplikacją antybiotyku o szerokim spektrum działania, na reakcję zapalną w mysim modelu łuszczycy indukowanym IMQ. Do tej pory nie stworzono innego modelu zwierzęcego, który dokładniej imitowałby zmiany obserwowane u chorego na łuszczycę. Modele *in vitro* są również niedoskonałe gdyż nie odwzorowują złożonych i wzajemnie powiązanych układów immunoregulacyjnych odpowiedzialnych za rozwój choroby. Tylko w modelu *in vivo* jesteśmy w stanie ocenić rolę poszczególnych frakcji leukocytów w obserwowanym procesie patologicznym. W naszych doświadczeniach chcemy ocenić wpływ częściowej deplecji naturalnej mikrobioty jelit na przebieg łuszczycy. Mikrobiota jelitowa jest do końca niezdefiniowanym, złożonym i połączonym wzajemnymi zależnościami układem, którego większą część stanowią mikroorganizmy beztlenowe. Uniemożliwia to zatem, prowadzenie jakiegokolwiek badań nad immunoregulacyjnymi właściwościami mikrobioty jelitowej poza układami *in vivo*.

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).

#### 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.

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

Dodatkowo by upewnić się, że uzyskane wyniki są 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 florą 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 czas podawania antybiotyku przed immunizacją został skrócony z 3 do 2 tygodni, tym samym udoskonaliliśmy metodę i ograniczyliśmy czas ekspozycji na potencjalne negatywne działanie antybiotyku na organizm myszy.

W trakcie prowadzonych wcześniej doświadczeń z podawaniem antybiotyku w wodzie do picia nie zaobserwowaliśmy różnic w przyroście masy ciała oraz w ilości przyjmowanego pożywienia i wypijanych płynów pomiędzy grupami (woda vs. woda z antybiotykiem). Dodatkowo nie zaobserwowaliśmy zmian w zachowaniu zwierząt. Na podstawie powyższych obserwacji możemy

wnioskować, iż antybiotyk podawany w wodzie do picia nie wpływa na pogorszenie dobrostanu zwierząt biorących udział w doświadczeniu.

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.