

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Schopnost probiotik normalizovat pozměněné funkce neutrofilů způsobené podáním antibiotik na myším experimentálním modelu

Doba trvání projektu pokusů v měsících

24

Klíčová slova

slizniční imunita

gut-brain-axis (dráha střevo - mozek)

zánětlivá onemocnění

antibiotika

probiotika

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

0

Translační a aplikovaný výzkum: Gastrointestinální poruchy včetně jater u lidí [PT26]

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je charakterizace vlivu dysbiózy (poruchy v zastoupení mikroorganismů a jejich funkčních vlastnostech) indukované podáním antibiotik na vzájemnou interakci mezi mikrobiotou (někdy označovanou starším termínem mikroflóra) a imunitním systémem hostitele se speciálním zaměřením na proporční a funkční charakteristiky klíčových populací buněk přispívajících k udržení rovnovážných interakcí ve střevě (neutrofilů, regulačních buněk a přirozených lymfoidních buněk typu III).

Bude testován vliv různých probiotik na interakci v s mikrobiotou a obnovu mikrobiálního složení po podání antibiotik. Rovněž bude sledovat vliv podávání probiotik na obnovu homeostatických interakcí mezi mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. Dysbióza může rovněž ovlivnit i samotné chování přes tzv. dráhu střevo - mozek. Pro pochopení vlivu dysbiózy a schopnosti probiotik obnovit mikrobiální složení a funkce mikrobioty budou na myším modelu studovány změny v chování pomocí tzv. behaviorálních testů.

Plánujeme charakterizovat vliv antibiotik na změnu funkčních vlastností neutrofilů (fagocytóza, migrace, tvorba neutrofilních pastí). Vliv probiotik na obnovu proporčního zastoupení a funkčních vlastností neutrofilů bude charakterizován pomocí průtokové cytometrie a mikroskopie.

Potenciální přínosy projektu pokusů

V současné chvíli není jasné, jak podání antibiotik ovlivní vzájemné rovnovážné vztahy (homeostatické intrakce) mezi mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. Budeme charakterizovat možný prospěšný vliv probiotik na indukci obnovy homeostatických interakcí mezi mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. Časné postnatální období je klíčové pro vznik stabilní mikrobioty a nastavení vzájemných rovnovážných interakcí mezi imunitním systémem hostitele a vznikající mikrobiotou. Právě podávání vhodných probiotických kmenů může podpořit jak vznik stabilní mikrobioty tak vzájemných rovnovážných interakcí mezi imunitním systémem hostitele a mikrobiotou.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Myši inbredního kmene BALB/c a C57BL/6 jsou vhodným modelem pro studium vlivu antibiotik na změnu homeostatických interakcí mezi imunitním systémem a mikrobiotou. Myšim budou podávány antibiotika pro indukci dysbiózy a změnu v imunitních reakcích.

Následně budou některým myšim podána probiotika pro obnovu mikrobiálního složení a homeostatických interakcí. V letech 2021 - 2023 použijeme maximálně 1200 ks zvířat všech kmenů. Tento počet je na úrovni minimálního počtu umožňující získat statisticky relevantní výsledky.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Orgány pro následné analýzy budou odebrány ze zdravých zvířat po eutanázii, tj. zvíře nenabude vědomí. Neočekáváme žádné závažné negativní účinky na zvířata. Indukovaná dysbióza ovlivní homeostatické imunitní reakce. Nicméně neplánujeme nechat rozvinout závažná onemocnění u myší způsobená indukční dysbiózou.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	60	140	800	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat		
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty

Po provedení pokusu budou zvířata usmrcena (předávkování anestetiky, oxid uhličitý, cervikální dislokace) a odevzdána do kafilerního boxu 1. LF UK pro odvoz asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Alternativní metody nám neumožňují sledovat tak komplexní fyziologické, imunologické a metabolické děje, jakými je interakce mikrobiomu s imunitním systémem a vliv této interakce na prostředí zánětlivého infiltrátu, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy.

Omezení používání zvířat

V rámci celého projektu použijeme maximálně 1200 ks myší. Zvířata budou používána v minimálních počtech, které umožní statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami. Pokud to bude možné, tak budou sdíleny vzorky získané v experimentech. Spojení studia různých forem zánětu řešené v rámci projektu umožní nejen neobvyklé synergie, ale i redukci počtu zvířat. Plánování paralelních experimentů, jak je popsáno výše, dále umožní redukci zvířat. Analýzou většího počtu parametrů najednou (použití moderních, citlivých metod) docílíme další redukce potřebného počtu zvířat. Vlastní zkušenosti s podobným typem experimentů a údaje v literatuře nám umožnily naplánovat minimální počet zvířat, která potřebujeme k dosažení signifikantních výsledků.

Šetrné zacházení se zvířaty

Veškerá manipulace se zvířaty bude co nejohleduplnější a co nejméně narušující přirozené potřeby zvířat. Podávání probiotik a antibiotik nevyžaduje anestezii.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Myši inbredního kmene BALB/c a C57BL/6 jsou vhodným modelem pro studium komplexních interakcí mezi mikrobitou a imunitním systémem hostitele. V rámci experimentu budou využity jak dospělé myši (6-8 týdnů) tak novorozené myši, neboť expozice probiotickým mikrobům časně po narození je nezbytná pro studium vlivu mikrobů na vyvíjející se imunitní systém a citlivost k zánětlivým chorobám v dospělosti, což také napovídají naše předchozí zkušenosti s těmito modely. A právě podání antibiotik v časném postnatálním období může zásadním způsobem ovlivni vývoj homeostatických imunitních reakcí s potenciálním rozvojem imunopatologických reakcí vedoucích ke vzniku onemocnění s imunitní podstatou. V ostatních modelech nemocí budou použity dospělá zvířata (6-8 týdnů).