

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Ocena potencjału wirulentnego glonów *Prototheca* spp., oportunistycznych patogenów ludzi i zwierząt - badania *in vivo*”

2. Czas trwania projektu: **1 rok i 8 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): ***Prototheca*, prototekoza, chorobotwórczość, zakażenie, model myszy**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **A (PB11)**

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.

Do rodzaju *Prototheca* (Trebouxiophyceae) należą jednokomórkowe, pozbawione chlorofilu, heterotroficzne glony, zdolne do wywoływania zakażeń u człowieka i zwierząt. Większość aspektów epidemiologicznych i biologicznych prototekoz pozostaje niejasna. Wśród niewiadomych są wrota zakażenia, ilość komórek mikroorganizmu wystarczająca do wywołania zakażenia bezobjawowego lub zainicjowania procesu chorobowego, dynamika liczebności drobnoustroju w przebiegu zakażenia (choroby) oraz znaczenie odporności gospodarza dla założenia i przebiegu zakażenia (choroby) glonami *Prototheca*.

Celem naukowym projektu jest określenie zdolności wybranych gatunków *Prototheca* do wywoływania zakażenia (choroby) u myszy laboratoryjnych, zarówno immunokompetentnych (tj.

posiadających w pełni funkcjonalny i dojrzały układ immunologiczny), jak i wykazujących cechy immunosupresji (tj. mających upośledzony układ immunologiczny). Kluczowe będzie tutaj ustalenie, które spośród badanych gatunków *Prototheca* niosą potencjał chorobotwórczy oraz jaki wpływ na wywołanie i przebieg zakażenia (choroby) mają droga zakażenia (metoda wszczepienia drobnoustroju), ilość drobnoustroju (dawka infekcyjna) i odporność gospodarza.

Projekt zakłada przeprowadzenie serii doświadczeń, według jednej, ustalonej sekwencji obejmującej: szczepienie (inokulację) myszy szczepem określonego gatunku *Prototheca*, w określonej ilości (dawce) i określoną drogą (i), regularną obserwację kliniczną przez określony czas (ii), uśmiercenie zwierząt (iii) w celu analizy histopatologicznej i mikrobiologicznej.

Do badań wykorzystane zostaną myszy 2 szczepów: immunokompetentne C57BL/6 i atymiczne (pozbawione grasicy, nie wytwarzające limfocytów T, o obniżonej odporności) C57BL/6 nude.

W czasie wstrzykiwania glonów podskórną, dootrzewnowo lub dosutkowo zwierzęta mogą odczuwać krótkotrwały, umiarkowany ból. U myszy zakażonych patogennymi gatunkami *Prototheca* (w szczególności zwierząt o obniżonej odporności) mogą ponadto rozwinąć się lokalne lub uogólnione stany zapalne. W zaplanowanym doświadczeniu zwierzęta zostaną uśmiercone w celu pobrania organów do analizy.

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

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
<b>Mysz domowa</b>	<b>osobniki dorosłe, 10 tyg.</b>	<b>324</b>

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PUBMED i Google Scholar. Wykorzystano słowa kluczowe: *Prototheca* / pathogenicity / virulence / animal model / infection / invasiveness (pol. *Prototheca* / patogenność / wirulencja / model zwierzęcy / infekcja / inwazyjność).

Na podstawie istniejącej literatury, stwierdzono, że dane dotyczące eksperymentalnej prototekozy pochodzą z trzech prac, z których dwie wykonano w latach 80. ub. w. We wszystkich trzech pracach używano różnych gatunków *Prototheca*, różnych strategii metodycznych, a w końcu różnych modeli zwierzęcych (myszy, szczury, króliki, świnki morskie). Ogólnie, wszystkie trzy prace wykazują pewne niedostatki metodologiczne i trudno jakkolwiek z nich traktować jako rzetelne i pogłębione studium dotyczące modelu *in vivo* prototekozy.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że w kontekście przeglądu literatury, przedłożony projekt można uznać za pionierski, gdyż zakłada opracowanie mysiego modelu prototekozy, w sposób kompleksowy, posługując się różnymi wariantami doświadczałnymi i przy uwzględnieniu najwyższych

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

standardów metodologicznych (w zakresie doboru wariantów doświadczalnych, użytych metod analitycznych, układu kontrolnego, grup zwierząt, itp.). Brak jest natomiast danych mówiących o tym, jaki wpływ na wywołanie zakażenia i rozwój choroby mają droga podania czynnika zakaźnego, czy liczba jego komórek (dawka infekcyjna). Nie istnieje również żaden konkretny model zwierzęcej protokozy.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na poszerzenie istniejącej wiedzy w kierunku określenia zdolności wybranych gatunków glonów *Prototheca* do wywoływania zakażenia (choroby) u myszy laboratoryjnych, zarówno immunokompetentnych, jak i wykazujących cechy immunosupresji. Kluczowe będzie tutaj ustalenie, które spośród badanych gatunków *Prototheca* niosą potencjał chorobotwórczy oraz jaki wpływ na wywołanie i przebieg zakażenia (choroby) mają droga zakażenia (metoda wszczepienia drobnoustroju), ilość drobnoustroju (dawka infekcyjna) i odporność gospodarza. W tym kontekście, przedłożony projekt można uznać za pionierski, gdyż zakłada opracowanie mysiego modelu protokozy, w sposób kompleksowy, posługując się różnymi wariantami doświadczalnymi i przy uwzględnieniu najwyższych standardów metodologicznych (w zakresie doboru wariantów doświadczalnych, użytych metod analitycznych, układu kontrolnego, grup zwierząt, itp.).

W doświadczeniu uwzględniona zostanie zasada zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (*ang.* 3R – replacement, reduction, refinement).

#### *Zasada zastąpienia*

Jak podkreślono w uzasadnieniu wykorzystania zwierząt w doświadczeniu, dla zbadania procesów zachodzących w trakcie zakażenia na poziomie ustrojowym, tj. w kontekście całokształtu oddziaływań międzykomórkowych, złożoności reakcji metabolicznych i immunologicznych, modelu zwierzęcego nie da się wyeliminować. W przypadku stosowania modelu zwierzęcego, możliwe jest śledzenie przebiegu zakażenia, procesu chorobowego i cyklu rozwojowego patogenu w sposób pełny, maksymalnie zobiektywizowany, bo przy uwzględnieniu wszystkich uwarunkowań biologicznych organizmu (w tym procesów w nim zachodzących, a w szczególności odpowiedzi odpornościowej). Tylko doświadczenia *in vivo* pozwalają wiarygodnie ocenić potencjał zakaźny i chorobotwórczy badanego drobnoustroju, ustalić jaki wpływ na wywołanie zakażenia i rozwój choroby mają droga podania czynnika zakaźnego, czy status immunologiczny zwierzęcia. Ogromną zaletą prowadzenia doświadczeń na zwierzętach, także w kontekście badań nad mechanizmami patogenyzy chorób zakaźnych, jest możliwość pobierania rozległego materiału tkankowego i kierowanie go do dalszych analiz (histopatologicznych, mikrobiologicznych).

#### *Zasada ograniczenia*

**Próba została tak dobrana, by uzyskać wyniki o zadowalającej mocy statystycznej przy włączeniu możliwie najmniejszej liczby zwierząt.** Zaplanowany eksperyment ma charakter niemal całkowicie pionierski, gdyż brak wyników podobnych badań w dostępnym piśmiennictwie. Brak danych, które mogłyby stanowić próbę odniesienia dla naszych doświadczeń, uniemożliwia rzetelne oszacowanie wielkości próby. Dostępne algorytmy obliczeniowe nie uwzględniają badań naszego typu. Wobec braku jakichkolwiek przesłankowych danych koniecznych do wprowadzenia w takich algorytmach (w tym m.in. dot. obrazu odchylenia standardowego i wielkości efektu immunologicznego), ich użycie nie ma sensu.

Przy ostatecznym wyborze wielkości grup kierowaliśmy się danymi pochodzącymi z innych prac dotyczących mysiego modelu infekcyjnego. W pracach tych, wielkość grup wynosi 6 (por. m.in. Hoppe i wsp. Characterization of a murine model of melioidosis: comparison of different strains of mice. *Infect Immun.*, 1999, 67:2891–900; MacCallum. Mouse model of invasive fungal infection. *Methods Mol Biol.*, 2013, 1031:145-53).

Podobnie, w nielicznych, przyczynkowych pracach dotyczących badań protokozy na myszach, grupy badanych zwierząt liczyły 5-6 osobników (por. Chang i wsp., Treatment with gentamicin on a murine model of protothecal mastitis. *Mycopathologia*, 2013, 175:241-48; Horiuchi i wsp., Epithelioid cell granulomas experimentally induced by *Prototheca* in the skin of mice: a light microscopic study. *Hiroshima J Med Sci.*, 1995, 44:21-7; de Camargo i wsp., Experimental protothecosis in laboratory animals. *Sabouraudia*, 1980, 18:237-40).

W końcu, kierując się zasadą 3R, podjęto założenie, aby liczba zwierząt włączonych do badania była jak najmniejsza. Grupy 6-osobnikowe to najmniejsze grupy zwierząt, które umożliwiają porównania w ujęciu statystycznym. Minimalna liczebność grup została więc ustalona na 6 osobników. W zaplanowanym eksperymencie ograniczono również liczbę wariantów eksperymentalnych. Testowane będą 4 spośród 14 opisanych obecnie gatunków (w tym 3 z 5 znanych gatunków patogennych i jeden kontrolny gatunek niepatogenny). Podobnie, do dwóch ograniczono liczbę testowanych dawek infekcyjnych.

#### *Zasada udoskonalenia*

Doświadczenie zostało tak zaplanowane, by zapewnić zwierzętom możliwie największy komfort oraz, na ile to możliwe, zminimalizować doznania potencjalnie nieprzyjemne. Dla osiągnięcia tego celu warunki hodowli zostaną dostosowane do potrzeb zwierząt. Opiekę nad zwierzętami będzie sprawował doświadczony personel. Stan zwierząt będzie regularnie monitorowany przez lekarza weterynarii. Zwierzęta przed wstrzyknięciem glonów będą przebywały w stałych warunkach, by umożliwić aklimatyzację. Starano się, aby zaproponowane procedury były możliwie najmniej dotkliwe dla zwierząt, minimalizując lub znosząc całkowicie ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu zwierzęcia (zastosowane będą środki farmakologiczne takie jak: leki przeciwbólowe, anestetyki). Jako metodę uśmiercania zwierząt wybrano, kierując się „zasadą udoskonalenia”, dyslokację rdzenia kręgowego. Również mając na względzie „zasadę udoskonalenia” w trakcie pracy ze zwierzętami, przewidziano warunki utrzymywania zwierząt w doświadczeniu jako spełniające najwyższe normy jakościowe – sanitarne i weterynaryjne. Zastosowane będą klatki z regulowaną dobą świetlną (12 godzin światła i 12 godzin ciemności), temperaturą 20-24 st. C oraz wilgotnością 55% (+/-10%). Zwierzęta będą utrzymywane w indywidualnie wentylowanych klatkach specjalistycznych. Zastosowane będą klatki typu 3H o powierzchni 904 cm<sup>2</sup> (dla każdej, 6-osobnikowej grupy myszy), które będą indywidualnie wentylowane. We wszystkich klatkach znajdą się wzbogacenia środowiska w postaci plastikowych czerwonych transparentnych domków, a także włókno drewniane, bawełniane wałeczki i papierowe rurki do budowania gniazd i zabawy dla zwierząt laboratoryjnych.

Projekt objęty oceną retrospektywną na podstawie art. 53, ust. 3 ustawy.