

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Antypasożytniczy wpływ glukuronozydów *Calendula officinalis* na przebieg inwazji *Babesia microti* u myszy szczepu BALB/c**

2. Czas trwania projektu: 36 miesięcy (1.06.2019-31.05.2022)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): *Babesia microti*, *Calendula officinalis*, parazytemia

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.

Babeszjoza, wywoływana przez *B. microti*, jest chorobą odkleszczową, szczególnie niebezpieczną dla osób z obniżoną odpornością. U osób immunokompetentnych babeszjoza ma zazwyczaj przebieg mało specyficzny lub bezobjawowy, ale przewlekły. W leczeniu objawowej babeszjozy stosuje się atowakwon, azytromycynę, klindamycynę i chininę. Asymptomatyczne zarażenia *B. microti* są szczególnie niebezpieczne w krwiodawstwie i transplantologii, gdzie istotne zagrożenie stanowią bezobjawowi dawcy. Według Food and Drug Administration (FDA) zarażenia *B. microti* są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów związanych z transfuzją krwi lub preparatów krwiopochodnych wraz z czynnikami zakaźnymi.

Nagietek lekarski (*Calendula officinalis*) to gatunek rośliny jednorocznej, należący do rodziny astrowatych (Asteraceae). Występuje on powszechnie w wielu krajach na świecie i znany jest ze swoich właściwości leczniczych. O leczniczych właściwościach nagietka w głównej mierze decydują saponiny znajdujące się w kwiatach i korzeniach tej rośliny. Wyniki ostatnich badań wskazują, że saponiny działają przeciwpasożytniczo na niektóre nicienie. Ich działanie stwierdzono również w przypadku pierwotniaków takich jak *Plasmodium* czy

Leishmania. Dotychczas prowadzone badania *in vitro* potwierdziły, że saponiny triterpenowe izolowane z nagietka lekarskiego działają negatywnie na strukturę błony komórkowej *B. microti*.

Jako model laboratoryjny w badaniach przebiegu zarażenia *B. microti* wykorzystuje się samice myszy szczepu BALB/c, który zaliczany jest do średnio opornego. Szczyt parazytemii przypada na między 8 a 10 dniem, wtedy też zwierzęta są osowiałe, obserwuje się ich zmniejszoną aktywność oraz krwimocz wynikający z rozpadu zarażonych erytrocytów. Po tym czasie zaczyna dochodzić do stopniowego samowyleczenia. Po kilku dniach zwierzęta odzyskują dobre samopoczucie, po około miesiącu parazytemia spada do ok. 1% zarażonych erytrocytów - zwierzęta przechodzą w fazę chroniczną zarażenia i uznaje się je za bezobjawowych nosicieli. Nasze wcześniejsze badania molekularne potwierdziły u myszy BALB/c długotrwałą, bezobjawową fazę chroniczną zarażenia *B. microti* (do 180 dpz), która jest także charakterystyczna dla zarażeń u ludzi.

Celem proponowanych badań jest wykazanie antypasożytniczej aktywności glukuronozydów poprzez ocenę osłabienia inwazyjności *B. microti* u myszy. Planujemy wykazać czy różny czas (12, 24, 36, 48 godz.) ekspozycji *in vitro* zarażonych *B. microti* erytrocytów myszy na glukuronozyd *C. officinalis* wpłynie na (1) poziom parazytemii oraz (2) na długość bezobjawowej fazy chronicznej zarażenia *B. microti*. Pobrana krew od 7 zarażonych myszy zostanie rozcieńczona w roztworze konserwującym CPDA-1 zgodnym z Farmakopeą Europejską. Krew będzie inkubowana z glukuronozydami przez: 12, 24, 26 i 48 godz. w temperaturze 4 °C (warunki takie jak przy przechowywaniu preparatów krwi i KKCz, uniknięcie hemolizy). W celu określenia *in vivo* wpływu glukuronozydów na zarażenie *B. microti* u myszy BALB/c oznaczona zostanie parazytemia na podstawie obserwacji mikroskopowych rozmazów z kropli krwi ogonowej każdej myszy z poszczególnych grup badawczych (4 grupy po 7 os.) i kontrolnych (4 grupy po 7 os.) początkowo co 2 dni (0-20 dpz), następnie co 5 dni (21-30 dpz) i co 10 dni (31-60 dpz). W celu określenia *in vivo* wpływu glukuronozydów na długość bezobjawowej fazy chronicznej zarażenia u myszy w zależności od czasu inkubacji IRBC wykonany będzie PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla fragmentu 18S rRNA *B. microti*. DNA izolowany będzie z kropli krwi ogonowej zwierząt z każdej badanej grupy (A-D i Ak-Dk) w 10, 20, 30, 60, 120, 180 i 240 dpz. Specyficzność reakcji zostanie potwierdzona sekwencjonowaniem wybranych amplikonów.

Nasze wcześniejsze badania *in vitro* jednoznacznie wskazują, że glukuronozydy z nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis*) dzięki swoim właściwościom permabilizującym powodują zmniejszenie odsetka zarażonych pasożytem erytrocytów w hodowlach komórkowych. Spodziewamy się zatem, że w wyniku działania glukuranozydów znacząco obniży się parazytemia w przebiegu zarażenia *B. microti* u myszy BALB/c, a spadek ten będzie skorelowany z czasem inkubacji zarażonych erytrocytów z glukuranozydami. Dodatkowo w wyniku działania glukuranozydów skróceniu ulegnie bezobjawowa faza chroniczna u myszy BALB/c, a czas jej trwania będzie zależny od czasu inkubacji zarażonych erytrocytów z glukuranozydami. Proponowane badania są pierwszymi w zakresie wykorzystania saponin triterpenowych jako substancji alternatywnych dla obecnie stosowanych leków w walce z *B.a microti*, jak również w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w badaniach dotyczących bezpieczeństwa w krwiodawstwie.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do badań zostanie wykorzystane 63 samice myszy szczepu BALB/c w wieku 6-12 tygodni.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Celem proponowanych badań jest wykazanie antypasożytniczej aktywności glukuronozydów poprzez ocenę osłabienia inwazyjności *B. microti* u myszy. Planujemy wykazać czy różny czas (12, 24, 36, 48 godz.) ekspozycji *in vitro* zarażonych *B. microti* erytrocytów myszy na glukuronozyd *C. officinalis* wpłynie na (1) poziom parazytemii oraz (2) na długość bezobjawowej fazy chronicznej zarażenia *B. microti*. Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam czy tego typu badania nie były dotychczas prowadzone. W tym celu sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED, Google Scholar i Science Direct. Wykorzystałam słowa kluczowe: Babesia/ Babesia microti/ saponin/ Calendula officinalis/ BALB/c. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że brak jest danych literaturowych dotyczących antypasożytniczej aktywności glukuronozydów w przebiegu zarażenia *B. microti* u myszy BALB/c. Wskazuje to jednoznacznie, że proponowany projekt ma charakter nowatorski, a tego typu badania nie były dotychczas prowadzone. Zastąpienie: Ze względu na specyfikę *Babesia microti* niemożliwe jest odpowiedź na postawione pytania badawcze bez wykorzystania modelu zwierzęcego. Badany pasożyt lokalizuje się w erytrocytach gatunków żywicielskich (gryzonie, człowiek) tym samym zawężając nasze możliwości do myszy szczepu BALB/c, u których przebieg inwazji *B. microti* jest dobrze poznany, a zwierzęta dobrze znoszą zarażenie. Charakter projektu nie pozwala na wykorzystanie zwierząt niższego rzędu.

Ograniczenie: W badaniu wykorzystamy najmniejszą liczbę zwierząt gwarantującą uzyskanie wiarygodnych wyników. Liczba osobników w grupach została wyliczona przy użyciu kalkulatora statystycznego: <http://www.biomath.info/power/prt.htm>.

Udoskonalenie: Myszy będą utrzymywane w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć ból, cierpienie i stres zwierząt. Wszystkie procedury zostaną przeprowadzone przez kompetentny personel z doświadczeniem w pracy ze zwierzętami. Proponowane badania są pierwszymi w zakresie wykorzystania saponin triterpenowych jako substancji alternatywnych dla obecnie stosowanych leków w walce z *Babesia microti*, jak również w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w badaniach dotyczących bezpieczeństwa w krwiodawstwie.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną² ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

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

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