

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Utrzymanie hodowli modelowego gatunku tasiemca *Hymenolepis diminuta* oraz jego wykorzystanie w badaniach molekularnych interakcji pasożyt-żywiciel**

2. Czas trwania projektu 01.10.2016 - 01.10.2021 (**60 miesięcy**)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) ***Hymenolepis diminuta*, gatunek modelowy, proteomika, genomika**

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

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.

Hymenolepis diminuta jest najważniejszym gatunkiem modelowym wykorzystywanym w badaniach nad tasiemczycami, w tym w celu poszukiwaniu nowych leków, metod diagnostycznych, badaniach procesów biochemicznych, odpowiedzi immunologicznej i pozostałych współoddziaływań w układzie pasożyt-żywiciel. W cyklu życiowym *H. diminuta* występuje dwóch bardzo różnych żywicieli, żywicielem pośrednim jest owad (*Tenebrio*, *Tribolium*), a ostatecznym ssak (szczur, człowiek). Żywiciele zarażają się poprzez połknięcie onkosfery (owad) lub cysticerkoidu (ssak), które różnią się przystosowaniami do zarażenia. Cysticerkoid jest stadium decydującymi o sukcesie inwazyjnym w żywicielu ostatecznym, u którego następuje różnicowanie do stadium dojrzałego. Dorosłe tasiemce wykształciły wiele adaptacji przystosowujących je do przetrwania w środowisku żywiciela, co zapewniło im sukces ewolucyjny. Zidentyfikowanie białek zaangażowanych w adaptacje do nieprzyjaznego środowiska jakie panuje w układzie żywiciela jest kluczowe dla zrozumienia biologii pasożyta, powiązań w układzie pasożyt-żywiciel, adaptacji do trybu życia, zachowania równowagi oraz odporności na czynniki enzymatyczne i immunologiczne. Informacje o proteomie, sekretomie i genomie są niezbędne do zrozumienia przetrwania pasożyta oraz rzucają nowe światło na temat biologii inwazji i rozwoju, szczególnie na poziomie molekularnym.

Celem badań jest przede wszystkim utrzymanie unikalnej hodowli modelowego gatunku tasiemca *Hymenolepis diminuta*. Dzięki utrzymaniu tej hodowli możliwe będzie określenie kluczowych dla

pasożyta białek i genów oraz wyselekcjonowanie tych o właściwościach immunomodulujących, a mogących w przyszłości być zastosowane w immunomodulacji chorób autoimmunologicznych człowieka. Aby osiągnąć wyznaczony cel zostaną zastosowane metody proteomiki żelowej połączonej ze spektrometrią mas oraz sekwencjonowania nowej generacji. Przykładowo, zastosowanie techniki 2DE Western Blot pozwala ustalić, które ze zidentyfikowanych białek są odpowiedzialne za stymulację układu immunologicznego oraz czy białka te są obecne w organizmach dorosłych tasiemców *H. diminuta* czy też w wydzielanych przez nich produktach ekskrecyjno-sekrecyjnych. Umożliwia to wybranie białek kandydatów mogących mieć zastosowanie w medycynie (diagnostyka, terapia, immunomodulacja). Liczne badania wskazują, że białka i inne produkty „wytwarzane” przez pasożyty, w tym tasiemce, mogą wpływać pozytywnie na zarażonych nimi żywicieli. Z naszych obserwacji wynika (dane niepublikowane), że zwierzęta (szczury) zarażone pasożytami znacznie rzadziej mają problemy ze zdrowiem i żyją dłużej niż te, u których tasiemce nie występują. Rzuca to całkiem nowe światło na to jak powinniśmy definiować niektóre gatunki pasożytów. W prowadzonych w ramach utrzymywania hodowli badaniach, staramy się wyjaśniać mechanizmy oddziaływania tasiemców na żywiciela. Być może nie są one wcale naszymi wrogami, a wręcz przeciwnie są naszymi sprzymierzeńcami.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Szczury Lewis (samce)

Liczba: 60

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zastąpienie: Ze względu na cel badawczy nie można zastąpić modelu zwierzęcego metodami in vitro.

Wykorzystanie modelu zwierzęcego (szczurzego) jest jedynym sposobem na uzyskanie form dorosłych tasiemca *Hymenolepis diminuta* i przeprowadzenie niezbędnych badań. W cyklu rozwojowym *Hymenolepis diminuta* występuje forma dorosła pasożytująca w jelicie gryzoni (lub człowieka). Nie ma możliwości zamknięcia cyklu rozwojowego pasożyta w warunkach in vitro.

Ograniczenie: Do osiągnięcia celu badawczego liczba zwierząt została ograniczona do minimum, które pozwala na uzyskanie rzetelnych wyników i uzyskania wystarczającej ilości materiału do analiz. Liczba zwierząt wynika z wcześniej prowadzonych doświadczeń, niskiej dawki zarażenia (brak objawów klinicznych u zwierzęcia), danych literaturowych oraz podstawowych analiz statystycznych. 60 szczurów/2 szczepy pasożyta = 30; 30/5 lat = 6. Należy brać pod uwagę zejście zwierząt z innych przyczyn oraz niepowodzenie w zarażeniu pasożytem. Zatem niezbędna do badań liczba zwierząt jest ograniczona do możliwego minimum.

X – minimalna liczba zwierząt niezbędnych do utrzymania dwóch szczepów tasiemca *Hymenolepis diminuta* przez okres 5 lat

$$X = X_1 + X_2$$

X_1 – liczba szczurów niezbędnych do utrzymania szczepu ludzkiego

H_1 (Prawdopodobieństwo sukcesu zarażenia szczura szczepem ludzkim) = (1 (szczur) x 0,5 (prawdopodobieństwo zjedzenia stadiów inwazyjnych podanych z pokarmem)) x 0,75 (prawdopodobieństwo sukcesu inwazji przy podaniu dawki 5 stadiów inwazyjnych) = 0,375 szczura

Aby uzyskać minimalne prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu należy w.w. wartość pomnożyć o wskaźnik 2,670 (szczura) gdyż:

$$0,375 \times 2,670 = 1/1 \text{ prawdopodobieństwa osiągnięcia sukcesu zdarzenia } H_1$$

Ponieważ nie ma możliwości zarażenia 2,670 szczura wartość tę należy zaokrąglić do liczby 3

Dla utrzymania hodowli w każdym roku niezbędne jest zatem zarażenie co najmniej 3 szczurów dla osiągnięcia sukcesu zdarzenia H_1

Ponieważ złożony wniosek dotyczy okresu 5 lat to:

$$X_1 = H_1 \times 5$$

czyli

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

$X1 = 3 \times 5 = 15$ szczurów nie biorąc pod uwagę nieprzewidzianych okoliczności typu zwiększona śmiertelność zwierząt z powodu choroby.

$X2$ – liczba szczurów niezbędnych do utrzymania szczepu wsobnego

$H2$ (Prawdopodobieństwo sukcesu zarażenia szczura szczepem ludzkim) = $(1 \text{ (szczur)} \times 0,5 \text{ (prawdopodobieństwo zjedzenia stadium inwazyjnego podanego z pokarmem)}) \times 0,25 \text{ (prawdopodobieństwo sukcesu inwazji przy podaniu dawki 1 stadium inwazyjnego)} = 0,125$ szczura

Aby uzyskać minimalne prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu należy w.w. wartość pomnożyć o wskaźnik 8,00 szczura

$0,125 \times 8 = 1/1$ prawdopodobieństwa osiągnięcia sukcesu zdarzenia $H1$

Dla utrzymania hodowli w każdym roku niezbędne jest zatem zarażenie co najmniej 8 szczurów dla osiągnięcia sukcesu zdarzenia $H2$

Ponieważ złożony wniosek dotyczy okresu 5 lat to:

$X2 = H2 \times 5$

czyli

$X2 = 8 \times 5 = 40$ szczurów nie biorąc pod uwagę nieprzewidzianych okoliczności typu zwiększona śmiertelność zwierząt z powodu choroby.

Zatem całkowita liczba zwierząt niezbędnych do utrzymania obu szczepów tasiemca przez okres 5 lat wynosi $X = X1 + X2$

czyli

$X = 15 + 40 = 55$

Biorąc pod uwagę możliwość zaistnienia nieprzewidywalnych i niemożliwych do ujęcia statystycznego okoliczności (zwiększona śmiertelność z powodu choroby, mniejsze współczynniki sukcesu zarażenia i inwazji) liczbę tę należy uzupełnić o 5 dodatkowych sztuk zwierząt, które zostaną zarażone wyłącznie w

razie zaistnienia ww. zdarzeń losowych. Ostateczna liczba zwierząt wynosi $55+5 = 60$

Udoskonalenie: wszystkie procedury eksperymentalne są tak zaplanowane, aby zminimalizować niepotrzebny ból, cierpienie, dystres u zwierząt a także aby powodować śmierć jak najmniejszej liczby zwierząt.