

**NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ**

**Název projektu pokusů**

Testování virulenčních faktorů *Leishmania mexicana* v myších BALB/c a křečičích čínských (*Cricetulus griseus*).

Doba trvání projektu pokusů

dr 12/2021

Klíčová slova - maximálně 5

*Leishmania*, *Phlebotomus*, virulenční faktor, chitináza, kataláza

**Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka**

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | základní výzkum  |
| <input type="checkbox"/>            | translační nebo aplikovaný výzkum  |
| <input type="checkbox"/>            | vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků |
| <input type="checkbox"/>            | ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat                        |
| <input type="checkbox"/>            | zachování druhů  |
| <input type="checkbox"/>            | vyšší vzdělávání nebo odborná příprava   |
| <input type="checkbox"/>            | trestní řízení a jiné soudní řízení  |

**Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)**

Leishmanie (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) jsou paraziti přenášení krevsajícím hmyzem - flebotomy (Diptera: Psychodidae), jejichž definitivními hostiteli jsou savci včetně člověka. Lidská onemocnění (leishmaniózy) způsobuje zhruba 20 druhů leishmanií. Projevy leishmaniózy jsou různorodé - od lehčích kožních forem (CL) přes poměrně závažné mukokutánní formy (MCL) až po viscerální onemocnění (VL), které je bez léčby často smrtelné. Výsledná forma onemocnění je dána především druhem a virulencí parazita, i když důležitou roli hraje i genetické pozadí a imunitní systém hostitele. Ve spolupráci s českými i zahraničními kolegy chceme testovat virulenční faktory *Leishmania mexicana*. Pomocí CRISPR/Cas9 metody byly ve spolupracujících laboratořích vytvořeny mutantní linie leishmanií s delecí genů pro chitinázu a katalázu. Roli těchto enzymů pro vývoj leishmanií v hostiteli bychom chtěli testovat na dvou modelech - myších BALB/c a křečičích čínských (*Cricetulus griseus*). Zatímco inbrední myši BALB/c jsou využívány jako klasické modelové zvíře s vysokou vnímavostí vůči leishmaniím působícím CL, křečiči zase představují model přirozené imunitní odpovědi pravděpodobného rezervoárového hostitele. Oba modely mají tedy jinou výpovědní hodnotu a jsou vzájemně nezastupitelné. Způsob inokulace bude odpovídat přirozenému průběhu infekce hostitele - použijeme intradermální inokulaci infekčních stádií leishmanií izolovaných z nakažených flebotomů. V průběhu pokusu budeme hodnotit vnější příznaky onemocnění a distribuci a počet parazitů v těle hostitelů.

**Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)**

Objasněním role chitinázy a katalázy leishmanií pro jejich vývoj v přenašečích a virulenci v hostitelích chceme přispět k poznání fungování závažného lidského patogena. Studie bude součástí diplomové práce a plánovaného mezinárodního projektu.

**Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá**

Plánujeme použít myši kmene BALB/c, tedy nejčastěji používané modelové zvíře vnímavé k CL a křečičky čínské (*Cricetulus griseus*) jako model přirozené imunitní odpovědi rezervoárového hostitele. Pokud se rozdíly mezi virulencí jednotlivých linií leishmanií neprojeví již u vnímavých imunodeficientních myší, testování na modelu přirozeného hostitele (křečiči čínští) nebude realizováno. Množství zvířat omezíme na nezbytné minimum, předpokládáme použití maximálně 100 jedinců každého druhu (od stáří cca 9 týdnů).

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu? **MÍRA ZÁVAŽNOSTI - STŘEDNÍ**

Závažnost projevů leishmaniózy závisí jak na druhu a virulenci parazita, tak na imunitní odpovědi hostitele. V pokusech s druhem *L. mexicana* lze očekávat u obou modelových druhů hlodavců středně závažné projevy (vyvinutí kožních lézí) u virulentních linií leishmanií a mírné projevy (žádné známky onemocnění či jen mírný otok uší) u avirulentních či málo virulentních linií. Zvířata nebudou v pokusu ponechána tak dlouho, aby se u nich leishmanióza rozvinula do patogenních projevů zatěžujících zvířata nad nezbytnou míru (déle než 10 týdnů). Pokus bude ukončen usmrcením zvířat a odběrem tkání na detekci parazitů, zvířata budou šetrně usmrcena v celkové anestezii cervikální dislokací (zlomením vazy).

**Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)**

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Sledování virulence parazita v hostiteli nelze nahradit jinou alternativní technikou bez použití zvířat. Interakce mezi parazitem a hostitelem jsou ovlivněny mnoha vzájemně provázanými a často druhově specifickými faktory na úrovni celých organismů. Tyto komplexní děje nelze simulovat pokusy *in vitro* nebo počítačovou simulací při vyloučení laboratorních zvířat.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Počet použitých zvířat bude minimalizován na množství, které bude ještě možno smysluplně vyhodnotit, tj. bude použito 5 jedinců pro každé ze dvou opakování experimentu s desíti liniemi leishmanií, tedy celkem 100 BALB/c myší a případně 100 křečičků.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat, a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Zvířata budou kromě úkonů nezbytných k pokusu ponechána v klidu, bude o ně pečováno dle platných zoohygienických předpisů a jejich biologických potřeb. Během inokulace leishmanií budou zvířata uvedena do celkové anestezie, přičemž po dobu anestezie bude zajištěn jejich tepelný komfort a vlhčení očí. Se zvířaty budou manipulovat pouze certifikované osoby a usmrcení zvířat bude provedeno maximálně šetrně, předávkováním anestezií a následným stržením vazů.