

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wyprowadzenie linii myszy eksprymujących rekombinazę CRE pod promotorem genu *Spi-c*

2. Czas trwania projektu: 2 lata ()

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): anemia, erytofagocytoza, makrofagi czerwonej miazgi, recykling żelaza, niedobór żelaza

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

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.

Anemia to stan, w którym liczba czerwonych krwinek lub ilość zawartej w nich hemoglobiny jest niewystarczająca. Jednym z powodów anemii jest niedobór żelaza. Mimo, że anemia stanowi globalny problem zdrowotny, wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu niedoboru żelaza na funkcję wyspecjalizowanych komórek organizmu.

W proponowanym projekcie skupiamy się na badaniu komórek zwanych RPMs – makrofagów obecnych w czerwonej miazdze śledziony. Komórki te wychwytyują i trawią starzejące się erytrocyty (czerwone krwinki), a następnie uwalniają żelazo niezbędne do produkcji nowych krwinek. RPMs utrzymują zatem równowagę krwi i zapewniają prawidłowy obrót ('recykling') żelaza w organizmie. Wykorzystując mysz model dietetycznego niedoboru żelaza, odkryliśmy, że makrofagi RPM ubogie w żelazo zwiększają zdolność do wychwytu erytrocytów i ich lizy. Zaobserwowaliśmy, że temu

„funkcjonalnemu przyspieszeniu” towarzyszy zwiększona masa i aktywność mitochondriów, czyli „elektrowni” komórkowych. Takie zwiększenie aktywności metabolicznej w ubogich w żelazo makrofagach RPM jest unikalne w porównaniu z innymi typami komórek, które zazwyczaj spowalniają swój metabolizm, gdy poziom żelaza spada. Naszym celem jest identyfikacja fizjologicznej roli tego „programu adaptacyjnego” makrofagów RPM: w jaki sposób jego zahamowanie w warunkach niskiej dostępności żelaza wpłynie na funkcje tych komórek i całego organizmu.

Aby osiągnąć ten cel proponujemy utworzenie nowego mysiego modelu. W przedstawionym projekcie prosimy o zgodę na wyprowadzenie linii myszy, u których synteza rekombinazy CRE będzie zachodzić specyficznie w makrofagach RPM (będzie sprzężona z ekspresją białka SPI-C). Rekombinaza CRE „wycina” fragmenty DNA pomiędzy sekwencjami LoxP. Wyprowadzona linia będzie służyła docelowo do krzyżowania z innymi liniami myszy, mającymi wprowadzone miejsca LoxP w sekwencje genów, które mogą być potrzebne makrofagom RPM do adaptacji do niskiej podaży żelaza. Pozwoli to na usunięcie tych genów wyłącznie w komórkach RPM na przyszłych etapach projektu i zbadanie jak zmieni to odpowiedź organizmu nie niedobór żelaza. Przewidujemy, że myszy Spi-c-CRE nie będą przejawiały szkodliwego fenotypu, a będą stanowić unikatowy na światową skalę model, służący do badania ciągle niepoznanej dobrze biologii makrofagów RPM, komórek kluczowych dla naszej fizjologii.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną zygoty myszy, izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie i uśmiercanych. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Oba zastrzyki będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, zatem źródłem bólu będzie jedynie ukłucie igłą. Szkodą ostateczną dla zwierząt jest uśmiercenie myszy dawczyń. W celu uzyskania zwierząt transgenicznych zarodki będą transplantowane do jajowodów samic biorczyń, pokrytych niepłodnymi samcami. Przeszczepianie zarodków u samic oraz wazektomia samców będzie wykonywana w znieczuleniu ogólnym, a ból pooperacyjny będzie uśmierzany środkami przeciwbólowymi. Ilość powikłań pooperacyjnych jest znikoma.

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

Myszy:

- samice C57BL6/J/cmdb – 16 osobników
- samice F1(C57BL6/JRj x CBA/J) – 7 osobników
- samce F1(C57BL6/JRj x CBA/J) – 5 osobników

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

**Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:**

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

**Wykorzystałam/em słowa kluczowe:** *erythrophagocytosis, red pulp macrophages, iron recycling, iron deficiency.*

**Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** Deficyt żelaza jest wiodącym globalnym niedoborem żywieniowym, który może spowalniać rozwój umysłowy, obniżać wydajność pracy i zwiększać zachorowalność u osób starszych. Nadal bardzo słabo poznane są mechanizmy, które pozwalają wyspecjalizowanym komórkom w organizmie adaptować się do niskiej dostępności żelaza. Makrofagi czerwonej miazgi (RPMs) znajdujące się w śledzionie są odpowiedzialne za usuwanie starzejących się lub zestresowanych czerwonych krwinek z krwioobiegu w procesie zwanym erytrofagocytozą.

**B. Brak jest danych dotyczących:** Badania nad wpływem niedoboru żelaza w organizmie na zdolność makrofagów RPM do wychwytu i lizy erytrocytów nie zostały opisane. Nie jest również dostępny ani opublikowany żaden model myszy, gdzie synteza rekombinazy CRE zachodzi specyficznie w komórkach RPM.

**Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

**Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:** Wyprowadzenie linii mysiej Spic-CRE pozwoli na przeprowadzenie szeregu eksperymentów mających na celu zrozumienie jak funkcjonalne i metaboliczne zmiany, które odkryliśmy w makrofagach RPM w warunkach niedoboru żelaza przyczyniają się do adaptacji organizmu do niskiej podaży żelaza. Nasze badania pozwolą również na jednoznaczną identyfikację kluczowych genów, regulujących ich zdolności do wychwytu i lizy erytrocytów w zależności od dostępności żelaza w organizmie.

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** Model Spi-c-CRE będzie unikatowy na skalę światową i może być w przyszłości wykorzystany w dalszych projektach w naszym zespole jak również udostępniony innym badaczom w ramach współpracy naukowej. Przykładowo, odkrycie mechanizmów regulujących funkcje makrofagów RPM związane z wychwytem i lizą erytrocytów, jak również tempo ich metabolizmu, pozwoli nam lepiej zrozumieć ich funkcjonalną deregulację, którą zaobserwowaliśmy podczas starzenia organizmu.

**Zastąpienie:** Na wcześniejszych etapach projektu wykonaliśmy liczne analizy *in vitro* na modelu pierwotnych makrofagów. Co ciekawe, sam niedobór żelaza w komórkach hodowanych *in vitro* nie reguluje tempa usuwania i lizy erytrocytów tak jak to widzimy to w modelu *in vivo*. W tym kontekście,

---

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

badanie molekularnych podstaw adaptacji makrofagów RPM do warunków deficytu żelaza wymaga użycia myszy.

**Ograniczenie:** Wedle naszej wiedzy jesteśmy pierwszym i jedynym zespołem w Polsce wyprowadzającym myszy transgeniczne metodą CRISPR-Cas9. Metoda ta pozwala na znaczne zmniejszenie liczby wykorzystanych zwierząt, w stosunku to klasycznej inżynierii genetycznej opierającej się o embrionalne komórki macierzyste. Dzięki zastosowaniu tej metody modyfikacje genetyczne wprowadzane są ze znacznie większą częstością oraz dodatkowo pozwala ona na pominięcie etapu tworzenia chimer. Zastosowanie innowacyjnej mieszaniny do iniekcji zwiększa częstość wprowadzanych modyfikacji, a tym samym zmniejsza liczbę myszy niezbędnych do wyprowadzenia linii transgenicznej.

**Udoskonalenie:** Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. Myszy będą utrzymywane w systemie IVC (klatki indywidualnie wentylowane) co zwiększa ich dobrobyt. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy ☐

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.