

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Badanie efektu biologicznego wolnej hemoglobiny na komórki wątroby i rozwój stanu zapalnego.**

2. Czas trwania projektu: **4 Lata**

3. Słowa kluczowe: **hemoglobina, hemoliza, haptoglobina, komórki śródbłónka zatok wątroby (ang. LSEC)**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy): **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.

W poprzednich badaniach wykazaliśmy, że uwolniona z czerwonych krwinek hemoglobina jest pobierana przez wyspecjalizowaną populację komórek naczyń wątroby (ang. LSEC). Proces ten jest bardzo szybki, niezależny od makrofagów wątrobowych i zachodzi równolegle do usuwania uszkodzonych erytrocytów przez makrofagi wątrobowe. Postawiliśmy zatem hipotezę, że komórki LSEC są kluczowe w obronie organizmu przed wolną hemoglobina w warunkach stresu hemolitycznego, któremu towarzyszy spadek ilości makrofagów w organizmie. W niniejszym wniosku planujemy zbadać, jakie efekty biologiczne w mikrośrodku wątroby i na poziomie organizmu ma wolna hemoglobina, która pojawia się w krążeniu w warunkach stresu hemolitycznego. Zbadamy między innymi: w jaki sposób zawarte w Hb żelazo ulega dystrybucji w mikrośrodku wątroby w jakim stopniu pobieranie Hb jest niezależne od haptoglobiny. Zbadamy między innymi: Jak zawarte w Hb żelazo ulega dystrybucji w mikrośrodku wątroby

oraz w jakim stopniu pobieranie Hb jest niezależne od haptoglobiny. Jest to ważny problem medyczny mogący zachodzić w przypadku patofizjologii i stresu hemolitycznego u pacjentów. Ponadto wolna hemoglobina jest obecna w starszych preparatach krwi wykorzystywanej do transfuzji.

Dyskomfort u myszy będzie powodowany jedynie zastrzykiem dożylnym. Podawane substancje włącznie z hemoglobiną nie mają wpływu na dyskomfort. Ponadto myszy zostaną uśmiercone na koniec eksperymentu, jednak sama czynność zostanie przeprowadzona z minimalizacją związanego z nią dyskomfortu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

388 myszy domowych

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, rzetelnie sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science (JCR). Użyto następujących słów kluczowych: hemoglobina, hemoliza, haptoglobina, komórki śródbłonna zatok wątroby (ang. LSEC). Na podstawie wiedzy zawartej w literaturze, w tym: w najnowszych artykułach przeglądowych i doświadczalnych dotyczących funkcji komórek LSEC: Petrillo et al., 2020, Pandey et al., 2020, Hammoutene and Rautou, 2019, de Haan et al., 2020, Oie et al., 2020, Ruart et al., 2019, a także w kluczowych artykułach przeglądowych i pracach doświadczalnych dotyczących hemolizy, wolnej hemoglobiny i haptoglobiny: Van Avondt et al., 2019, Kato et al., 2017, Schaer et al., 2014, Merle et al., 2018, Sakamoto et al., 2017, Theurl et al., 2016

i bazując na doświadczeniu naszym i naszych współpracowników z opisanego obszaru badań, stwierdzam, co następuje:

Rola komórek LSEC w pobieraniu wolnej Hb podczas hemolizy nie została opisana i stanowi nasze oryginalne odkrycie. Nie są też znane efekty tego procesu na funkcjonowanie komórek LSEC, na procesy związane z utrzymywaniem równowagi żelaza (zarówno na poziomie mikrośrodowiska wątroby i całego organizmu), a także na indukcję stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w wątrobie i innych organach.

Zasada zastąpienia

Na wcześniejszych etapach projektu wykonano badania *in vitro* z wykorzystaniem hodowli pierwotnych komórek LSEC. Badania te, między innymi, umożliwiły nam zidentyfikowanie 3

potencjalnych receptorów wolnej Hb na powierzchni komórek LSEC. Model *in vitro* może być również wykorzystywany na dalszych etapach projektu do badania szczegółowych mechanizmów wewnątrzkomórkowych, które uczestniczą w pobieraniu Hb. Aby jednak zrozumieć, jak wychwyt wolnej Hb przez komórki LSEC wpływa na gospodarkę żelaza w mikrośrodku wątroby i organizmie, i właściwości komórek LSEC i w jakim stopniu uruchamia procesy prozapalne w organizmie, konieczne jest wykorzystanie modelu *in vivo*. Jest to również podyktowane faktem, że mikrośrodko wątroby charakteryzuje się złożonymi mechanizmami komunikacji międzykomórkowej, która tylko w żywym organizmie może być w pełni uwzględniona w badanych przez nas procesach. Nie istnieją alternatywne modele niezawierające pozwalające badać fizjologię wątroby, i innych organów w odpowiedzi na pobieranie wolnej hemoglobiny przez komórki LSEC.

Zasada ograniczenia

Planowane badania uwzględniają ich wykonanie na najniższej możliwej liczbie zwierząt w poszczególnych grupach. Przewidziana ilość zwierząt jest niezbędna do przeprowadzenia prawidłowej analizy statystycznej otrzymanych wyników. Będziemy również dokładać wszelkich starań, aby z każdej poświęconej myszy uzyskać maksymalną ilość informacji.

Zasada udoskonalenia

Aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt, wszystkie procedury zostały maksymalnie uproszczone i sprowadzone do 1 lub 2 zastrzyków. Dawka Hb, którą planujemy podawać myszom odpowiada ilości tego białka w ok. 100 µl krwi (stanowiących mniej niż 10% krwi u młodej myszy). Według danych literaturowych, spadek ilości Hb w mysich modelach hemolizy (przekracza tą wartość Theurl et al., 2016; Zhang et al., 2018), więc na podstawie naszych wcześniejszych eksperymentów i danych z literatury, spodziewamy się, że dawka ta jest dobrze tolerowana (mysie modele hemolizy są żywotne i szeroko wykorzystywane w badaniach). Eksperymenty przeprowadzane będą przez doświadczonych pracowników posiadających odpowiednie kwalifikacje i wiedzę ze szczególnym nastawieniem na zminimalizowanie dyskomfortu u zwierząt. Objętości podawanych iniekcji mieszczą się w granicach rekomendowanych i dopuszczonych wg. prawa. Zwierzęta będą miały stały dostęp do pożywienia i wody. Warunki bytowania zwierząt zostaną urozmaicone przez umożliwienie myszom znalezienia schronienia w plastikowym domku (typu iglo) lub tekturowych rurkach.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ NIE