

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Badanie zdolności makrofagów czerwonej miazgi (RPM) do recyklingu żelaza u myszy z mutacją genu *Tmprss6*.

2.Czas trwania projektu 3,5 roku

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): makrofagi miazgi czerwonej, niedobór żelaza, *Tmprss6*, hepcydyna

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.

Makrofagi obecne w miazdze czerwonej śledziona (red pulp macrophages: RPMs) są odpowiedzialne za wychwytywanie starzejących się erytrocytów, na drodze procesu zwanego erytrofagocytozą. Komórki te są wyspecjalizowane w trawieniu erytrocytów, rozkładzie hemoglobiny i uwalnianiu żelaza niezbędnego do produkcji nowych krwinek. RPMs utrzymują zatem homeostazę krwi i zapewniają prawidłowy obrót (recykling) żelaza w organizmie. Mechanizmy, które wpływałyby na intensywność procesu erytrofagocytozy są nadal słabo poznane. Nasze wyniki *in vitro* pokazują, że zawartość żelaza w makrofagach może modulować intensywność procesu recyklingu żelaza z erytrocytów. *In vivo*, pokazaliśmy, że komórki RPM wyizolowane z myszy karmionych nisko-żelazową dietą (w porównaniu z dietą standardową), wydajniej wychwytyują i trawią zestresowane erytrocyty. Nasze dalsze badania

sugerują, że u myszy karmionych nisko-żelazową dietą to niski poziom hormonu hepcydyny może modulować zdolność komórek RPM do recyklingu żelaza. Myszy z delecją genu *Tmprss6* (*Tmprss6* KO) charakteryzują się niskim poziomem żelaza we krwi i umiarkowaną anemią, ale w przeciwieństwie do myszy z dietetycznym niedoborem żelaza, mają podwyższony poziom hepcydyny i normalny poziom żelaza w śledzionie. Celem niniejszego wniosku będzie określenie, czy myszy *Tmprss6* KO wykazują zmiany w wydajności erytrofagocytozy i trawienia erytrocytów. Wyniki otrzymane w naszym projekcie pomogą określić, jak jeden z podstawowych procesów fizjologicznych, jakim jest recykling żelaza, jest modulowany w warunkach niedoboru żelaza. Znalezienie tych mechanizmów pomoże nam lepiej zrozumieć i przeciwdziałać deficytowi żelaza, który stanowi jeden z najpowszechniejszych globalnych problemów zdrowotnych. Zaproponowane procedury nie wywołają nagłych lub długotrwałych, niekorzystnych zmian fizjologicznych u myszy i nie spowodują bólu ani innego cierpienia poza faktem wykonania iniekcji.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

60 samic, Mysz domowa (*Mus musculus*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, rzetelnie sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science (JCR)

Użyłam następujących słów kluczowych: erythrophagocytosis, red pulp macrophages, iron recycling, iron accumulation, iron deficiency, *Tmprss6*, hepcidin. Na podstawie przeszukiwania literatury, w tym: - w najnowszych artykułach przeglądowych dotyczących gospodarki żelazowej i makrofagów (Winn et al., 2020)(Sukhbaatar and Weichhart, 2018), - w aktualnych artykułach przeglądowych dotyczących roli makrofagów w procesie erytrofagocytozy (Klei et al., 2017), - w najnowszych artykułach badawczych, dotyczących mechanizmów molekularnych erytrofagocytozy (Pek et al., 2019)(Bennett et al., 2019), - w najnowszych pracach, opartych na wykorzystaniu modelu *Tmprss6* KO (Xavier-Ferruccio et al., 2019)

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

(Altamura et al., 2019)(Stagg et al., 2019) i bazując na wieloletnim doświadczeniu z mojego obszaru badań, stwierdzam, co następuje:

adania nad wpływem poziomu żelaza w organizmie czy w śledzienie na zdolność makrofagów RPM do erytrofagocytozy nie zostały opublikowane. Podobnie, nie został opisany żaden fenotyp myszy z delecją genu *Tmprss6* związany z modulacją efektywność procesu erytrofagocytozy. Opublikowany został artykuł (Bennett i wsp.) pokazujący zwiększenie intensywności erytrofagocytozy w warunkach infekcji, co w żaden sposób nie podważa oryginalności naszych badań, ale stanowi bardzo ciekawy punkt odniesienia dla naszych aktualnych i przyszłych wyników. Nowatorskość naszego projektu została również potwierdzona przez konsultację naszych wstępnych obserwacji z innymi uznanymi ekspertami pracującymi nad homeostazą żelaza. Jedną z naszych hipotez zakłada, że poziom hepcydyny może mieć udział w regulacji intensywności erytrofagocytozy. W tym kontekście, udowodnienie, że kluczowy hormon regulujący uwalnianie żelaza z makrofagów RPM, może również kontrolować tempo wychwytu starzejących się erytrocytów, i inne funkcje makrofagów, związane z uwalnianiem żelaza z erytrocytów, może być przełomowym odkryciem w obszarze naszych badań.

Zasada zastąpienia

Na wcześniejszych etapach projektu wykonaliśmy liczne analizy *in vitro* na modelu makrofagów BMDM, sugerujące, że istotnie zawartość (nadmiar) żelaza w makrofagach może wpływać na ich zdolność do erytrofagocytozy i recyklingu żelaza. Co ciekawe, sam niedobór żelaza w tych komórkach nie reguluje powyższych procesów w podobnym stopniu jak widzimy to w modelu *in vivo*, u myszy karmionych paszą ze śladową zawartością żelaza. W tym kontekście, badanie wpływu niedoboru żelaza i poziomu hormonu hepcydyny na zdolność komórek RPM do recyklingu żelaza wymaga użycia myszy. W tej części naszego projektu mamy szansę wykazać, że nadmiar hepcydyny, charakterystyczny dla myszy *Tmprss6*, może modulować intensywność erytrofagocytozy, czas życia krążących erytrocytów czy inne aktywności komórek RPM, niezależnie od niskiego poziomu żelaza w organizmie.

Zasada ograniczenia

Planowane badania uwzględniają ich wykonanie na najniższej możliwej liczbie zwierząt w poszczególnych grupach. Opracowując plan badawczy użyliśmy programu Power and Sample Size Calculator oraz wiedzy z artykułów naukowych, aby jak najdokładniej oszacować liczebności grup doświadczalnych.

Zasada udoskonalenia Proponowane doświadczenia zostały dobrze przemyślane i opracowane bazując na wiedzy oraz doświadczeniu naszego zespołu, zdobytych podczas realizacji projektu (wnioski: WAW/015/2019 oraz WAW2/150/2019). Nasze plany badawcze i założenia naukowe zostały rzetelnie skonsultowane z naszymi współpracownikami, czołowymi naukowcami w obszarze naszych badań. Procedury w przedstawionym projekcie zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Wybrany model Tmprss6 KO jest niezbędny do lepszego zrozumienia regulacji procesu erytrofagocytozy, co stanowi zupełnie nowy kierunek badań w naszej tematyce. Model ten charakteryzuje się stosunkowo łagodnym fenotypem, który nie powoduje cierpienia i nie wpływa na dobrostan zwierząt.

Eksperymenty przeprowadzone zostaną na myszach możliwie najmłodszych. Z naszego doświadczenia wiemy, że krótkotrwała transfuzja zestresowanych, ale nie dotkliwie uszkodzonych erytrocytów, jest przez myszy bardzo dobrze tolerowana. Nawet przy zastosowaniu 4-krotnie wyższej dawki zestresowanych erytrocytów, niż ta którą planujemy użyć, w badaniach opisanych w literaturze, nie zaobserwowano szkodliwych efektów dla zwierząt (Theurl et al., 2016). Udoskonalamy procedurę poprzez zmniejszenie dawki podawanych erytrocytów, wystarczającej do uzyskania potrzebnych wyników. Podobnie, nowoczesna metoda określania średniego czasu życia erytrocytów za pomocą biotynylacji jest nieszkodliwa oraz nieinwazyjna i stanowi obecnie najlepszy standard doświadczalny w badaniach dotyczących kondycji erytrocytów (Kim et al., 2014; Parrow et al., 2019; Zhang et al., 2018). Inne metody zaproponowane we wniosku zostały tak opracowane, aby nie wymagały dodatkowych czynności (pomiaru przeprowadzane są na komórkach RPM ex vivo). Zaproponowane procedury nie wywołują nagłych lub długotrwałych, niekorzystnych zmian fizjologicznych w organizmie myszy i nie spowodują bólu ani innego cierpienia poza faktem wykonania iniekcji.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

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