

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie wpływu przeładowania żelazem makrofagów czerwonej miazgi (RPMs) na równowagę białkową i powiązane z nią procesy komórkowe

2. Czas trwania projektu 20.06.19 (lub później, po uzyskaniu zgody LKE) – 20.06.21

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): proteostasis, red pulp macrophages, iron accumulation, aging

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

4. 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.

Cel: Badania podstawowe; Sercowo-naczyniowy układ krążenia krwi i limfy

Makrofagi obecne w miazdze czerwonej śledziony (red pulp macrophages: RPMs) są odpowiedzialne za usuwanie starzejących się erytrocytów z krwioobiegu. Komórki te są wyspecjalizowane w rozkładzie hemoglobiny i uwalnianiu żelaza niezbędnego do produkcji nowych krwinek. RPMs odrywają zatem kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy krwi i zapewnianiu prawidłowego obrotu żelaza w organizmie. Co ciekawe, fizjologiczne starzenie połączone jest z akumulacją żelaza w śledzionie, najprawdopodobniej w komórkach RPM. Celem naszego projektu jest zbadanie czy proces starzenia indukuje stres oksydacyjny w tych komórkach, i czy prowadzi to do upośledzenia ich funkcji. Dokładniej, chcemy określić wpływ starzenia na homeostazę białek w RPMs, mierząc poziom agregacji białek, glutationu, aktywność lizosomalną i proteasomalną, tempo autofagii, jak i aktywność mitochondriów. Planujemy również przeprowadzić sekwencjonowanie RNA na przesortowanych RPMs oraz pomiar zawartości żelaza za pomocą spektroskopii ICP-MS. Nasze wstępne wyniki wskazują na zaburzenia równowagi białkowej w RPMs u myszy starszych (10-11-miesięcznych) w porównaniu z młodymi (8-12-tygodniowymi). Eksperymenty opisane w niniejszym wniosku pozwolą nam określić, czy zmiany te są

spowodowane wyłącznie podwyższonym poziomem żelaza w RPMs, czy także związane są z procesem starzenia się tych komórek. Początkowo przeprowadzimy optymalizację dawki iniekcji dootrzewnowej żelaza skompleksowanego z dekstranem (aby otrzymać zbliżoną akumulację żelaza w śledzienie jak u myszy starszych; Procedura I) i punktu czasowego pomiarów (Procedura II). W Procedurze III wykorzystamy zoptymalizowane warunki eksperymentalne do właściwych eksperymentów, gdzie wszystkie wymienione wyżej aktywności zostaną zmierzone. Nasza praca pozwoli nam zidentyfikować kluczowe czynniki wpływające na upośledzenie funkcji RPMs u myszy starszych, i co za tym idzie na jakość krążących erytrocytów i na ogólnoustrojową gospodarkę żelaza.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

96 samic, Mysz domowa (*Mus musculus*); szczep C57BL/6

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: *proteostasis*, *red pulp macrophages (RPMs)*, *iron accumulation*, *aging*. Na podstawie przeszukiwania literatury i bazując na wieloletnim doświadczeniu z mojego pola badań, stwierdzam, że badania nad wpływem starzenia i nadmiaru żelaza na równowagę białkową makrofagów RPM i funkcje/aktywności komórkowe z nią związane nie zostały opublikowane i mają zatem charakter nowatorski.

Zasada zastąpienia

Na wcześniejszych etapach projektu wykonaliśmy (i nadal wykonujemy) analizy z użyciem myszy starszych (Ryc. 1) jak i doświadczenia *in vitro* na modelu makrofagów BMDM (Ryc. 2). Badania te sugerują, że nadmiar żelaza, towarzyszący fizjologicznemu starzeniu się śledziony, jak i niezależnie sam proces starzenia wpływają na czynności komórek związane z równowagą białek. Zaproponowane w tym wniosku badania umożliwią nam ostatecznie określenie, które ze zmian w kontekście starzenia zależą stricte od akumulacji żelaza. Spodziewamy się, że rzuci to nowe światło na czynniki wpływające na zmiany w funkcjonalności komórek RPM postępujące z wiekiem. Odkrycie takich mechanizmów będzie mieć przełożenie na jakość krążących erytrocytów i na zdolność organizmu do odzysku żelaza dla produkcji nowych erytrocytów w szpiku kostnym. W tym kontekście, weryfikacja naszych obserwacji w modelu *in vivo* jest konieczna i może prowadzić do zaproponowania podejść o znaczeniu terapeutycznym (np. chelacji żelaza lub zastosowania anty-oksydantów), skierowanych na zahamowaniu niekorzystnych dla jakości tych komórek zmian.

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

Zasada ograniczenia

Planowane badania uwzględniają ich wykonanie na najniższej możliwej liczbie zwierząt w poszczególnych grupach. Ze względu na ich pilotażowy charakter, w Procedurze I i II naszym celem nie jest uzyskanie statystycznie istotnych wyników. W Procedurze III, posługując się obliczeniami za pomocą programu Power and Sample Size Program i szacując spodziewane zmiany w planowanych pomiarach z przypuszczalnym odchyleniem standardowym, obliczono, że istotność statystyczna na poziomie $\alpha = 0,05$ może być osiągnięta przy ilości zwierząt wynoszącą 7 na każdą z planowanych grup eksperymentalnych. W przypadku przygotowania próbek na sekwencjonowanie RNA i na analizy poziomu żelaza w RPMs, bazując na doświadczeniu współpracujących laboratoriów oszacowaliśmy ilość myszy na 4 na grupę.

Zasada udoskonalenia

Procedury w przedstawionym projekcie zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Ponadto, proponowane doświadczenia zostały dobrze przemyślane i opracowane bazując na doświadczeniu naszego zespołu (Ryc. 1). Podczas hodowli zapewnione będzie urozmaicenie warunków bytowania.

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.