

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Makrofagi rezydujące w tkance w procesach przebudowy i regeneracji mięśnia sercowego. Rola oksygenazy hemowej-1.

2. Czas trwania projektu: 24 miesiące

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): oksygenaza hemowa-1, zawał serca, makrofagi tkankowe

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.

W rozwiniętych krajach główną przyczyną śmierci są choroby układu krążenia, z wiodącą pozycją choroby niedokrwiennej serca (coronary artery disease, CAD). Istotnym elementem sprzyjającym rozwojowi CAD są nasilone procesy zapalne, ze szczególną rolą monocytów i makrofagów. W planowanym doświadczeniu pragniemy zbadać rolę sercowych makrofagów rezydujących w tkance (tissue-resident macrophages, TRM) w procesach rozwoju i wygaszania odpowiedzi zapalnej po uszkodzeniu serca oraz określić ich znaczenie w procesach przebudowy i regeneracji mięśnia sercowego ze szczególnym uwzględnieniem roli oksygenazy hemowej-1 (HO-1), enzymu, który – między innymi – pełni istotną rolę w funkcjonowaniu makrofagów, a jego zwiększona ekspresja została zauważona podczas polaryzacji tych komórek do przeciwzapalnego, naprawczego fenotypu (M2) z jednoczesnym zahamowaniem polaryzacji do fenotypu prozapalnego (M1). Celem planowanych doświadczeń jest określenie roli makrofagów sercowych w zawale serca z uwzględnieniem roli HO-1. Sądzymy, że wyniki uzyskane w badaniach proponowanych w tym projekcie, pozwolą lepiej zrozumieć funkcje populacji sercowych makrofagów tkankowych w procesach następujących po uszkodzeniu serca: rozwinięciu i wygaszaniu odpowiedzi zapalnej, w przebudowie i regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego. Poszerzanie wiedzy na temat patologii zawału serca

jest nieodzowne dla opracowania nowych metod prewencji chorób serca, a także regulowania odpowiedzi zapalnej w leczeniu pacjentów cierpiących na choroby serca.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Myszy C57BL/6×FVB, 208 osobników.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Replacement (zastąpienie): projekt koncentruje się na komórkach – makrofagach – obecnych w tkance mięśnia sercowego. Wymaga to przeprowadzenia badań na zwierzętach, gdyż jedynie korzystanie z modeli *in vivo* umożliwi zbadanie rzeczywistej funkcji i właściwości tych komórek *in situ*. Wykonanie tego typu doświadczeń jest niemożliwe w układzie *in vitro*, ponieważ izolowane komórki, szczególnie komórki o wyjątkowo „plastycznym” fenotypie, takie jak makrofagi mogą tracić istotne cechy w trakcie propagacji *in vitro*. Co więcej, pragniemy skupić się nie tylko na makrofagach, ale także ich interakcjach z innymi komórkami obecnymi w mięśniu sercowym, takimi jak komórki śródbłonna czy kardiomiocyty. Planujemy wykorzystać model zawału serca indukowanego przez chirurgiczne podwiązanie tętnicy wieńcowej. Jest to uznany i powszechnie stosowany model choroby niedokrwiennej i zawału serca. Procedura jest stosunkowo skomplikowana i obciąża organizm, co niesie ryzyko pewnej śmiertelności będącej wynikiem samej procedury (średnio 0-20% zwierząt). Jednak zabieg zakończony powodzeniem powiązany z odpowiednim zastosowaniem leków przeciwbólowych umożliwia zwierzętom normalnie funkcjonowanie. Badanie funkcji serca z wykorzystaniem ultrasonografu to bezinwazyjna i bezbolesna metoda diagnostyczna. Dożylnie podanie prawidłowo przygotowanych liposomów zawierających kłodronian powoduje usunięcie makrofagów z tkanek zwierzęcia i nie stwarza bezpośredniego zagrożenia dla życia zwierząt. Jest to dobrze opracowana metoda stosowana od wielu lat w laboratoriach (Epelman et al. Immunity, 2014). Zastosowanie inhibitora CCR2 nie wpływa na dobrostan zwierząt (Lavine et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2014). Dodatkowo w badaniu wykorzystane zostaną myszy transgeniczne z wyciszoną ekspresją HO-1, co zastąpi farmakologiczną inhibicję HO-1, która ma ograniczoną skuteczność, wiąże się z wprowadzeniem dodatkowych procedur w doświadczeniu (m.in. kilkukrotnym nastrzykiwaniem zwierząt). Materiał pobierany od zwierząt (serca, śledziony oraz krew obwodowa) będzie wykorzystany do szeregu analiz (cytometria przepływowa i oznaczenie liczebności i fenotypu poszczególnych subpopulacji komórek prozapalnych, analizy histologiczne i immunohistochemicznej pozwalającej określić rozmiar blizny zawałowej, gęstość naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym, wielkość przekroju naczyń, ilość komórek apoptotycznych w mięśniu sercowym, przerost włókien mięśniowych, czy lokalizację makrofagów w okolicach blizny zawałowej. Tkanki będą również udostępniane innym badaczom.

Reduction (ograniczenie): liczba zwierząt została ograniczona do minimalnej liczby potrzebnej do uzyskania statystycznie istotnych wyników; gdzie jest to możliwe grupy są ze sobą łączone, co zwiększa ich liczebność; zaplanowano analizy na kilku poziomach – na poziomie organizmu, tkanek oraz na poziomie molekularnym. Kompleksowe podejście do badań

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

pozwała na maksymalizację danych uzyskiwanych z każdego zwierzęcia.

Refinement (udoskonalenie): wykorzystywane zwierzęta są utrzymywane w warunkach SPF, w wentylowanych klatkach, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból i cierpienie. Wykorzystane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla myszy, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak aby ograniczyć do minimum ból i stres zwierząt. Przenoszenie oraz czynności badawcze są prowadzone przez wyspecjalizowany personel. Opisane procedury wywołania zawału serca są ogólnie przyjęte na świecie (patrz m.in. publikacje Meloni et al. Mol Ther., 2015; Avolio et al. Circ Res., 2015) i jednocześnie pozwalają na rzetelne porównanie otrzymanych wyników opublikowanych przez różne jednostki badawcze.