

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie adaptacji makrofagów czerwonej miazgi (RPM) do warunków niedoboru żelaza u myszy z makrofagowo-specyficznym nokautem genu *Tfr1*

2. Czas trwania projektu 25.07.2020 – 24.07.2025

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): *erytrofagocytoza, makrofagi miazgi czerwonej, niedobór żelaza, Tfr1*

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A: Badania podstawowe; Układ wewnętrzny lub metabolizm

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; Układ wewnętrzny lub metabolizm

Makrofagi obecne w śledzionie (red pulp macrophages: RPMs) to komórki odpowiedzialne za wychwytywanie starzejących się erytrocytów (czerwonych ciałek krwi), na drodze procesu zwanego **erytrofagocytozą**. Komórki te ‘trawią’ erytrocyty i uwalniają żelazo niezbędne do produkcji nowych krwinek. Komórki RPM są zatem kluczowe dla naszej fizjologii: utrzymują równowagę krwi i zapewniają prawidłowy ‘recykling’ żelaza w organizmie. Celem badań jest odpowiedzenie na nowe, oryginalne pytanie, czy i w jaki sposób komórki RPM adaptują się do zmian poziomu żelaza w organizmie. Wstępne nieopublikowane wyniki badań pokazują, że u myszy karmionych nisko-żelazową dietą, RPMs wydajniej wychwytyują i ‘trawią’ erytrocyty oraz wykazują wyższą aktywność metaboliczną. W odniesieniu do naszych doświadczeń i danych z literatury, taka odpowiedź na niedobór żelaza jest unikalna. Co ciekawe,

towarzyszy jej znaczące podwyższenie poziomu receptora dla żelaza TFR1 na powierzchni komórek RPM. Postawiliśmy hipotezę, że w warunkach niedoboru żelaza, RPMs silnie aktywują szlak pobierania żelaza z krwi, aby zaspokoić potrzeby metaboliczne, niezbędne dla ich zwiększonej aktywności. Celem niniejszego wniosku będzie weryfikacja tej hipotezy u myszy z unieczynnieniem genu *Tfr1* specyficznym w makrofagach. Otrzymane wyniki pomogą określić, jak te wyspecjalizowane komórki, kluczowe dla naszej fizjologii, adaptują się do warunków niskiej dostępności żelaza. Identyfikacja tych mechanizmów pomoże nam lepiej zrozumieć jakie zmiany funkcjonalne w organizmie powoduje niedobór żelaza. To może przyczynić się do lepszego przeciwdziałania deficytowi żelaza, który stanowi globalny problem zdrowotny. W oparciu o nasze doświadczenia i dostępną literaturę, nie spodziewamy się, aby zaproponowane procedury wywołały niekorzystne zmiany fizjologiczne u myszy czy spowodowały cierpienie poza faktem wykonania iniekcji. Po zakończeniu eksperymentu życie zwierząt zostanie w sposób humanitarny zakończone.

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

112 samic w procedurach plus 80 samic kontrolnych (nie poddanych procedurom), Mysz domowa (*Mus musculus*); szczep C57BL/6 (planujemy przeprowadzać eksperymenty na samicach jako, że niedobór żelaza jest problemem zdrowotnym częściej dotykającym kobiety.)

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

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: *erythrophagocytosis*, *red pulp macrophages*, *iron recycling*, *iron deficiency*, *Tfr1*. Na podstawie wiedzy zawartej w literaturze, w tym:

w najnowszych artykułach przeglądowych dotyczących gospodarki żelazowej i makrofagów (Winn et al., 2020)(Sukhbaatar and Weichhart, 2018)(Nairz et al., 2017), 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), a także w najnowszych pracach dotyczących roli receptora TFR1 (Wang et al., 2019) i bazując

---

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

na wieloletnim doświadczaniu w badaniu gospodarki żelaza, stwierdzam, że zarówno wpływ poziomu żelaza w organizmie na fizjologię komórek RPM a także rola receptora TFR1 w makrofagach nie zostały zbadane.

### **Zasada zastąpienia**

Na wcześniejszych etapach projektu wykonaliśmy liczne analizy *in vitro* na hodowlach makrofagów. Nasze wstępne wyniki pokazały, że nadmiar żelaza w makrofagach może wpływać na ich zdolność do erytrofagocytozy i ‘recyklingu’ żelaza. Co ciekawe, sam niedobór żelaza w komórkach hodowanych *in vitro* nie reguluje powyższych procesów w podobnym stopniu jak widzimy to w modelu *in vivo*. W tym kontekście, badanie molekularnych podstaw adaptacji makrofagów RPM do warunków deficytu żelaza wymaga użycia myszy. Myszy z unieczynnieniem genu *Tfr1*, kodującego receptor żelaza, specyficznie w makrofagach stanowią idealne narzędzie do weryfikacji hipotez postawionych w niniejszym projekcie. Jako, że utrzymywanie homeostazy żelaza i krwi wymaga współdziałania między różnymi tkankami, praca na myszach jest konieczna i pozwoli nam określić, jak brak receptora TFR1 w makrofagach wpłynie na adaptację całego organizmu do niedoboru żelaza (np. na układ krwiotwórczy czy dystrybucję żelaza pomiędzy tkankami a osoczem).

### **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. Będziemy również dokładać wszelkich starań, aby z każdej poświęconej myszy uzyskać maksymalną ilość informacji (np. z jednej śledziona standardowo wykonujemy 3-4 pomiary).

### **Zasada udoskonalenia**

Proponowane doświadczenia zostały dobrze przemyślane i opracowane bazując na wiedzy oraz doświadczeniu naszego zespołu, zdobytych podczas realizacji naszego większego projektu. Procedury w przedstawionym projekcie zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Większość metod/pomiarów zaproponowanych we wniosku zostało opracowanych w trybie pracy *ex vivo* z wyizolowanymi komórkami, aby w procedurach nie były konieczne żadne dodatkowe czynności na żywych zwierzętach. Specjalne zlecenie zostało złożone u dostawcy myszy z USA przed rozpoczęciem projektu, aby zweryfikować, czy model z unieczynnieniem genu *Tfr1* specyficznie w makrofagach nie wykazuje szkodliwych fenotypów w normalnych warunkach. Stosowana przez nas dieta nisko-żelazowa została tak dobrana, aby jedynie efektywnie obniżać poziom żelaza w organizmie, ale nie wywoływać anemii. Minimalizuje to ryzyko wystąpienia szkód dla zwierząt. Z naszego doświadczenia wiemy, że krótkotrwałe podanie myszom dożylnie ‘sztucznie postarzonych’ czerwonych ciałek krwi w opracowanej przez nas dawce jest przez myszy bardzo dobrze tolerowana. W literaturze opisywane jest podawanie 4-krotnie wyższej dawki takich erytrocytów, które również nie powoduje szkodliwych efektów u zwierząt (Theurl et al., 2016). Udoskonaliliśmy zatem opublikowaną procedurę poprzez zmniejszenie dawki podawanych erytrocytów, wystarczającej do uzyskania potrzebnych efektów fizjologicznych. Przy

wykonywaniu iniekcji dożylnych dodatkowo wykładamy wewnątrz 'poskramiaczy', służących do unieruchamiania myszy, miękkim ręcznikiem papierowym (zaobserwowaliśmy, iż czynność ta znacznie uspokaja zwierzęta).

#### **Literatura:**

Bennett, L.F., Liao, C., Quickel, M.D., Yeoh, B.S., Vijay-Kumar, M., Hankey-Giblin, P., Prabhu, K.S., and Paulson, R.F. (2019). Inflammation induces stress erythropoiesis through heme-dependent activation of SPI-C. *Sci Signal* 12.

Klei, T.R., Meinderts, S.M., van den Berg, T.K., and van Bruggen, R. (2017). From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* 8, 73.

Nairz, M., Theurl, I., Swirski, F.K., and Weiss, G. (2017). "Pumping iron"-how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch* 469, 397-418.

Pek, R.H., Yuan, X., Rietzschel, N., Zhang, J., Jackson, L., Nishibori, E., Ribeiro, A., Simmons, W., Jagadeesh, J., Sugimoto, H., et al. (2019). Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance. *Elife* 8.

Sukhbaatar, N., and Weichhart, T. (2018). Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals (Basel)* 11.

Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszyk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M., Holderried, T.A., Seifert, M., et al. (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med* 22, 945-951.

Wang, S., He, X., Wu, Q., Jiang, L., Chen, L., Yu, Y., Zhang, P., Huang, X., Wang, J., Ju, Z., et al. (2019). Transferrin receptor 1-mediated iron uptake plays an essential role in hematopoiesis. *Haematologica*.

Winn, N.C., Volk, K.M., and Hasty, A.H. (2020). Regulation of tissue iron homeostasis: the macrophage "ferrostat". *JCI Insight* 5.

#### 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

☒ NIE

---

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