

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie skutków sterylnego zapalenia (wywołanego lipopolisacharydem, LPS) u myszy z niedoborem żelaza na żywotność i podstawowe funkcje makrofagów czerwonej miazgi.

2. Czas trwania projektu: 5 lat

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

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

Makrofagi miazgi czerwonej śledziona (red pulp macrophages: RPM) to wyspecjalizowane komórki odpowiedzialne za usuwanie starzejących się erytrocytów (czerwonych krwinek) z krwiobiegu i uwalnianie żelaza niezbędnego do krwiotworzenia. Niedobór żelaza jest globalnym problemem zdrowotnym upośledzającym funkcje organizmu. W naszej bieżącej pracy, odkryliśmy, że komórki RPM wykazują unikalną adaptację do niedoboru żelaza: u myszy karmionych niskożelazową dietą, RPM są bardziej aktywne metabolicznie i wydajniej usuwają erytrocyty. Zaobserwowaliśmy, że zjawisko to jest zależne od niskiego poziomu hormonu hepcydyny: podanie hepcydyny myszom na niskożelazowej diecie 'wyłącza' ich 'program adaptacyjny'. Zauważyliśmy również, że u myszy z niedoborem żelaza hepcydyna już krótko po podaniu nieznacznie zmniejsza ilość komórek RPM w

śledzienie. Nasze wstępne obserwacje mają znaczenie w kontekście współistnienia w organizmie niedoboru żelaza i warunków prozapalnych, które podnoszą ilość hepcydyny we krwi. Jest to częste w zarówno w rozwijających się krajach, jak i w rozwiniętych i nabiera szczególnego znaczenia w kontekście epidemii SARS-CoV-2. Ciężki przebieg choroby COVID-19 koreluje zarówno ze stopniem niedoboru żelaza jak i z wysokim poziomem hepcydyny. **Postawiliśmy zatem hipotezę, że rozwój zapalenia, któremu towarzyszy indukcja hepcydyny, w obliczu niedoboru żelaza, prowadzi do dysfunkcji komórek RPM i tym samym przyczynia się do dalszego pogłębienia deficytu żelaza i anemii.** Aby zweryfikować tę hipotezę, zbadamy jak sterylne zapalenie wywołane przez wykonanie iniekcji lipopolisacharydu (endotoksyny pochodzenia bakteryjnego) oraz (niezależnie) podanie dopasowanej dawki hormonu hepcydyny, wpływa na podstawowe funkcje makrofagów RPM. Przewidywane są następujące szkody dla zwierząt: ból przy wykonywaniu zastrzyków, dyskomfort i ból związany z wywołanym stanem zapalnym oraz jako szkoda ostateczna śmierć. **Spodziewamy się, że otrzymane wyniki mogą mieć duże znaczenie dla zrozumienia patogenezы anemii podczas infekcji i chorób zapalnych.**

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

192 samice, 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 UDOSKONALENIA¹

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: *red pulp macrophages*, *iron recycling*, *iron deficiency*, *hepcidin*, *inflammation*, *LPS*. Na podstawie wiedzy zawartej w literaturze, w tym:

w aktualnych artykułach przeglądowych dotyczących gospodarki żelazowej i makrofagów (Pradhan et al., 2020; Sukhbaatar and Weichhart, 2018; Winn et al., 2020), w najnowszych artykułach badawczych, dotyczących mechanizmów molekularnych związanych z usuwaniem erytrocytów przez komórki RPM (Lu et al., 2020; Pek et al., 2019) i związku pomiędzy usuwaniem erytrocytów a stanem zapalnym (Akilesh et al., 2019; Bennett et al., 2019; Olonisakin et al., 2020), jak również śledząc doniesienia o

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

powiązaniach przebiegu COVID-19 z gospodarką żelaza (Hippchen et al., 2020; Nai et al., 2020) oraz bazując na wieloletnim doświadczeniu z mojego obszaru badań, stwierdzam, co następuje:

Badania nad wpływem poziomu żelaza w organizmie na funkcje makrofagów RPM, związane z wychwytywaniem erytrocytów, nie zostały opisane. W szczególności, nie jest dostępna żadna wiedza na temat tego, jak obniżony poziom żelaza w organizmie, w połączeniu z rozwojem stanu zapalnego, wpływa na funkcje tych komórek. Opublikowane zostały artykuły, pokazujące zwiększenie intensywności fagocytozy erytrocytów w warunkach infekcji (Bennett i wsp.), jak również pojawianie się w organizmie nowych komórek (nie makrofagów RPM) zdolnych do wychwytu erytrocytów w odpowiedzi na czynniki zapalne (Akilesh i wsp.). Prace te nie podważają oryginalności naszych badań, jako, że nie analizują opisanych w nich zjawisk w warunkach niedoboru żelaza, który w świetle naszych oryginalnych wyników silnie wpływa na funkcje komórek RPM (znacznie je intensyfikuje). Niemniej jednak, prace te stanowią również bardzo ważny i ciekawy punkt odniesienia dla naszej pracy. Zebrane informacje i własne doświadczenie, pozwoliły na prawidłowe zaplanowanie badań, uwzględniające również jak najmniejsze szkody dla zwierząt. **Nasze pionierskie badania mają szansę wykazać, że dysfunkcja komórek RPM może być kolejnym czynnikiem patologicznym, wpływającym na ciężki przebieg chorób zakaźnych i stanów zapalnych.**

Zasada zastąpienia

Na wcześniejszych etapach projektu wykonaliśmy liczne analizy *in vitro* na hodowlach makrofagów. Nasze wstępne wyniki pokazały, że zawartość (nadmiar) żelaza w makrofagach może wpływać na ich zdolność do usuwania erytrocytów. Jednak, niedobór żelaza w komórkach hodowanych *in vitro* nie reguluje funkcji makrofagów RPM w taki sposób, jak widzimy to w modelu *in vivo*. W tym kontekście, spodziewamy się, że unikalna adaptacja komórek RPM występuje jedynie w warunkach *in vivo* i prawdopodobnie zależy od czynników obecnych w krążeniu (jak hepcydyna) jak również od sygnałów płynących z mikrośrodowiska śledziony. Jako, że utrzymywanie homeostazy żelaza i krwi wymaga współdziałania między różnymi tkankami, a zapalenie jest również zjawiskiem ogólnoustrojowym, jedynie praca na żywym modelu mysim może nam pomóc zrozumieć, jak rozwój stanu zapalnego na tle niedoboru żelaza może wpłynąć na funkcje komórek RPM.

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. **Nasze badania zaplanowaliśmy w taki sposób, aby z każdej poświęconej myszy uzyskać maksymalną ilość informacji** (z jednej śledziony standardowo wykonujemy 3-4 pomiary).

Zasada udoskonalenia

Proponowane doświadczenia zostały opracowane bazując na wiedzy oraz doświadczeniu naszego zespołu, zdobytych podczas realizacji naszych powiązanych projektów. Procedury w przedstawionym

projekcie zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Dawki lipopolisacharydu zostały tak dobrane, aby spowodować najmniejsze z możliwych szkody dla zwierząt, jakie mogą powstać przy wywoływaniu stanu zapalnego. Iniekcje syntetycznej hepcydyny nie będą powodować innego dyskomfortu niż fakt wykonania iniekcji dootrzewnowej. Pomiary zaproponowane we wniosku zostały tak opracowane, aby nie były konieczne żadne dodatkowe czynności (pomiar przeprowadzany jest na komórkach śledzonych *ex vivo*). W klatkach zwierząt będą umieszczone elementy wzbogacenia środowiska takie jak: tekturowe rurki, duże fragmenty papierowych ręczników i plastikowe domki. Doświadczenie zespołu gwarantuje prawidłowe wykonanie procedur, ze szczególnym uwzględnieniem dobrostanu zwierząt. Zwierzęta będą pozostawać pod codziennym nadzorem lekarsko – weterynaryjnym.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

☒ NIE

Literatura:

- Akilesh, H.M., Buechler, M.B., Duggan, J.M., Hahn, W.O., Matta, B., Sun, X., Gessay, G., Whalen, E., Mason, M., Presnell, S.R., et al. (2019). Chronic TLR7 and TLR9 signaling drives anemia via differentiation of specialized hemophagocytes. *Science* 363.
- 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.
- Hippchen, T., Altamura, S., Muckenthaler, M.U., and Merle, U. (2020). Hypoferremia is Associated With Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *Hemasphere* 4, e492.
- Lu, Y., Basatemur, G., Scott, I.C., Chiarugi, D., Clement, M., Harrison, J., Jugdaohsingh, R., Yu, X., Newland, S.A., Jolin, H.E., et al. (2020). Interleukin-33 Signaling Controls the Development of Iron-Recycling Macrophages. *Immunity* 52, 782-793 e785.
- Nai, A., Lore, N.I., Pagani, A., De Lorenzo, R., Di Modica, S., Saliu, F., Cirillo, D.M., Rovere-Querini, P., Manfredi, A.A., and Silvestri, L. (2020). Hepcidin levels predict Covid-19 severity and mortality in a cohort of hospitalized Italian patients. *Am J Hematol*.
- Olonisakin, T.F., Suber, T.L., Gonzalez-Ferrer, S., Xiong, Z., Penaloza, H.F., van der Geest, R., Xiong, Y., Osei-Hwedieh, D.O., Tejero, J., Rosengart, M.R., et al. (2020). Stressed erythrophagocytosis induces immunosuppression during sepsis through heme-mediated STAT1 dysregulation. *J Clin Invest*.
- 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.
- Pradhan, P., Vijayan, V., Gueller, F., and Immenschuh, S. (2020). Interplay of Heme with Macrophages in Homeostasis and Inflammation. *Int J Mol Sci* 21.
- Sukhbaatar, N., and Weichhart, T. (2018). Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals (Basel)* 11.
- Winn, N.C., Volk, K.M., and Hasty, A.H. (2020). Regulation of tissue iron homeostasis: the macrophage "ferrostat". *JCI Insight* 5.

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