

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ 2/2018

Název projektu pokusů	
Alternativní signalizace kanonických komponent dráhy Wnt	
Doba trvání projektu pokusů	5 let
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	funkce genů; genetické modifikace; proteinové komplexy; LGR4; nádory tlustého střeva; organoidy; regenerace tkání; signalizace Wnt; střevní epitel; TCF4
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
<input checked="" type="checkbox"/>	základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
<p>Cílem projektu je identifikovat alternativní mechanismy kanonické dráhy Wnt, které se podílí na obnově a diferenciaci buněk střevního epitelu u myši a také na obnově střevního epitelu po jeho poškození. Pochopení těchto mechanismů je důležité, protože jejich abnormální působení vede k tvorbě a růstu nádorů střeva. V rámci tohoto projektu budeme studovat především kanonickou dráhu Wnt, jejíž aktivita je pro obnovu střevního epitelu klíčová a jež je hyperaktivovaná ve většině střevních nádorů u lidských pacientů. Ačkoliv je tato dráha již dlouho předmětem studia, v posledních letech se ukazuje, že je zde mnoho alternativních a tkáňově specifických mechanismů a komponent, jejichž roli v této signalizaci je třeba objasnit a doplnit. Zapojení těchto alternativních komponent dráhy Wnt se podílí také na heterogenitě nádorů u lidských pacientů, což znesnadňuje léčbu. V rámci tohoto projektu budeme studovat především roli receptoru Lgr4 a jeho interakci s ligandy Rspo, jakož i ambivalentní roli transkripčního faktoru Tcf4 v obnově střevního epitelu a v počátečních fázích růstu střevních nádorů. Vyřazení regulačních mechanismů dráhy umožňuje hyperaktivovat kanonickou signalizaci Wnt v myši střevěch a vyvolat tak tvorbu nádorů v tenkém i tlustém střevě. Tvorby nádorů lze docílit také podáním mutagenu a vyvoláním zánětu v tlustém střevě. Data získaná při studiu myších modelů rakoviny střeva budeme v rámci projektu ověřovat také na standardizovaných lidských nádorových buněčných liniích a na vzorcích nádorů z operovaných pacientů, které budeme aplikovat imunodeficientním myším a dále analyzovat. Také <i>in vitro</i> kultura střevních organoidů, získaných z lidských nádorů, umožní charakterizovat tyto nádory a může v budoucnu přispět k individualizaci léčby pacientů s kolorektálním karcinomem.</p>	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)	
Očekáváme, že pokusy popsáné v tomto projektu povedou k získání nových informací o střevních nádorech a že tyto informace budou potenciálně využitelné v cílené léčbě a tvorbě prognózy u jednotlivých typů kolorektálního karcinomu u člověka.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
K pokusům budou použiti dospělí jedinci <i>Mus musculus</i> různého stáří. Předpokládáme následující celkovou „spotřebu“ pokusných zvířat: rok 2018 – 250; rok 2019 – 250; rok 2020 – 250; rok 2021 – 350, rok 2022 - 350.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Navrhovaná míra závažnosti je mírná. Navrhované metody aplikace látek jsou pro zvířata šetrné a nezpůsobují výraznou či dlouhodobou bolest. Vyvolání zánětu či nádorů ve střevěch může zhoršit fyziologickou funkci střeva, nicméně zvířata budou usmrcena dřív, než dojde k výrazným patologickým změnám působícím utrpení. Růst lidského nádoru v podkoží imunodeficientních myši způsobuje pouze nepohodlí, nádor nezasahuje do funkce orgánů a zvíře je usmrceno, jakmile dosáhne léze potřebné velikosti.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uved'te, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Studium molekulárních mechanismů obnovy a regenerace střevního epitelu vyžaduje vzhledem ke komplexní struktuře epitelu a signalizačními kontextu okolních tkání myši <i>in vivo</i> model. Také zachování fenotypu lidských nádorových buněk při jejich expanzi mimo pacienta vyžaduje živé pokusné zvíře. Vznik a vývoje nádoru a s tím spojenou signalizaci v organismu nelze sledovat jinak než <i>in vivo</i> . Data získaná <i>in vitro</i> je vždy třeba ověřit s použitím statisticky významného množství pokusných zvířat.	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
V pokusech použijeme vždy nejmenší statisticky významné množství zvířat. Experimenty budou pečlivě plánovány, což zamezí nutnosti jejich opakování. Využití organoidových kultur zdravého i nádorového epitelu umožní značné snížení množství pokusných zvířat.	
Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější	

použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlíte obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Pro účely tohoto projektu byla jako modelový organismus vybrána myš a to z toho důvodu, že se jedná o nejčastěji používaný savčí model, který je z genetického i fyziologického hlediska blízký člověku a tudíž poznatky získané studiem myši jsou potenciálně aplikovatelné i v lidské medicíně. Zvířata budou chována ve speciálně upraveném zvěřinci v prostorných chovných nádobách s neustálým přístupem k vodě i potravě. Šetrnou manipulaci se zvířaty zajistí dohled zkušených vědeckých pracovníků. Manipulace se zvířaty za účelem vyvolání zánětů či nádorů ve střevě budou probíhat co nejkratší dobu. U metod, které způsobují větší nepohodlí či bolest, bude použita krátkodobá celková anestezie.