

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Rozklíčování "Nekanonického" signalizačního potenciálu ligandů dráhy Notch u savců.

Navržený projekt pokusů si klade za cíl objasnit roli intracelulární domény Notch ligandu JAGGED1 během patologie Alagillova syndromu a extrahepatické biliární atresie.

Doba trvání projektu pokusů v měsících

60

Klíčová slova

Signalizace Notch

Alagillův syndrom

Extrahepatická Biliární atresie

geneticky manipulované myší modely

Jagged1

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Gastrointestinální systém včetně jater [PB5]

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

0

0

Cíle projektu pokusů

Extrahepatická biliární atresie (EHBA) a Alagillův syndrom (ALGS) představují hlavní pediatrické patologie jater vyžadující chirurgický zákrok jater, či jejich transplantaci, mnohdy již během prvních měsíců po narození. Notch je klíčová juxtakrinní signální dráha konzervovaná napříč živočišnou říší, která řídí biologické procesy sebeobnovy / diferenciací / proliferace, a to jak ve vývoji, tak v dospělosti. Její narušení vede k vývojovým chorobám a rakovině. Mutace v genu pro Notch ligand JAGGED1 (JAG1) způsobují až 94% zaznamenaných případů ALGS, a hrají dosud neobjasněnou roli i v EHBA.

Navržený projekt si klade za cíl objasnit roli intracelulární domény Notch ligandu JAGGED1 během vývoje a v dospělosti a to za použití kmenů se systemickou mutací způsobujících ALGS (Jag1R1097W), (Jag1Ndr) (Jag1K1095N,R1097W) a EHBA (Jag1R1213Q). Patologickou cholestázu budeme následně léčit cílenou expresí intracelulární domény JAG1 proteinu, která by do budoucna mohl být používána jako terapeutický nástroj pro léčbu ALGS a EHBA.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Navrhovaný projekt má potenciál objasnit funkci vnitrobuněčné domény signalizační molekuly Jagged1, která je nezbytná pro život, a jejíž mutace stojí za 94% novorozenců s ALGS. Pokusy mohou rovněž objasnit vztah této molekuly k dalšímu závažnému defektu žlučových cest u pediatrických pacientů a to EHBA. Přípravované myší modely, nám umožní studovat patologickou cholestázu, kterou budeme následně léčit cílenou expresí intracelulární domény JAG1 proteinu, která by do budoucna mohla být používána jako terapeutický nástroj pro léčbu ALGS a EHBA i u lidí.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Zvířata budou použita k odběrům biologické tkáně, aplikaci testované látky gaváží a injekci, vytvořením modelu jaterní cholestázy a transplantaci imunitních buněk.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

krátkodobé mírně bolestivé úkony, doprovázený chvilkovým stresem, krátkodobé zákroky v anestezii

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná

myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	0	0	1990
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat			
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Pokus 1) je nezbytný první krok k určení jednotlivých geneticky modifikovaných hmyších kmenů, který bude předcházet pokusům 2-7) Plánovaná histologická a molekulárně biologická analýza tkání, pro kterou jsou plánovány pokusy 2-7) není slučitelná se životem.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Pro takto specifické studium funkce jednotlivých aminokyselin a lidských patologií způsobených jejich mutací není možné najít vhodnou eticky akceptovatelnou alternativu, která zároveň splňuje požadavky na genetickou a fyziologickou blízkost k člověku. Případné využití in silico a in vitro metod nepostihuje v dané šíři komplexitu procesů probíhajících při vývoji celých orgánů a jejich vzájemné interakce, na úrovni celého savčího organismu. Kdykoliv však bude možné, budou využity lidské, nebo čerstvě izolované myší tkáňové kultury.				
Omezení používání zvířat				
Pro experimenty jsou využívány cíleně geneticky modifikované myší modely, umožňující studium zapojení konkrétních typů buněčných populací a/nebo jimi produkovaných faktorů do procesu patologie ALGS a EHBA. Využití těchto myších modelů samo o sobě snižuje počty experimentálních myší oproti prostému využití wild-type myší. Celkové využití experimentálních zvířat bude omezeno na nutné minimum umožňující statistické zpracování výsledků pokusu. Zároveň budou sbírány, katalogizovány a sdíleny orgány, tkáně a buněčné populace tak aby bylo měřeno co nejvíce různých parametrů najednou.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Pro stálý chov zvířat budou využívána pouze heterozygotní jedinci bez zjevného fenotypu. Experimentální zvířata, vzniklá jejich křížením budou v pokusu jen po dobu nezbytně nutnou k provedení pokusu. Klece budou vybaveny obohacujícími prvky – kartonové trubice apod. Zacházení se zvířaty bude cílit na co nejkratší dobu manipulace a co nejméně stresující zacházení (minimalizace držení za ocas a kůži, odchyt myší do uzavřených dlaní nebo tunýlku). Během pokusů budou zvířata pod pravidelným dohledem, pokud budou jevit známky nepohody, bude kontaktován ke konzultaci veterinář (nebo jiný určený kvalifikovaný odborník). Bude-li potřeba, zvířata budou ošetřena, vyřazena z pokusu, nebo usmrcena cervikální dislokací, či pomocí CO2.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Extrahepatická biliární atrezie (EHBA) a Alagillův syndrom (ALGS) představují hlavní pediatrické patologie jater vyžadující chirurgický zákrok jater, či jejich transplantaci, mnohdy již během prvních měsíců po narození. Myš je v současné době nejlépe geneticky manipulovatelný savčí modelový organismus s dostatečně rychlou reprodukcí, který umožňuje danou problematiku studovat na multisystémové úrovni. Vybraná studovaná stádia odpovídají klíčovým etapám prenatalního vývoje jater, žlučníku a žlučového a následné neo a post-natální patologii u lidských pacientů. Díky tomu pokusy pomohou objasnit podstatu a chronologii vývoje onemocnění a odhalit vhodná stádia pro potenciální terapii pomocí cílené administrace intracelulární domény JAG1 proteinu.