

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ 3|2018

Název projektu pokusů

Ligandy Wnt a buňky produkující tyto ligandy při obnově střevního epitelu, jeho regeneraci a v nádorech tlustého střeva mimo mutaci indukující nádor

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* ligandy Wnt; Wnt5a; rakovina tlustého střeva; střevní epitel; myší modely; střevní organoidy; sekrece ligandů Wnt; Wnt signalizace

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

<input checked="" type="checkbox"/>	základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
<input type="checkbox"/>	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
<input type="checkbox"/>	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
<input type="checkbox"/>	zachování druhů
<input type="checkbox"/>	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
<input type="checkbox"/>	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Cílem tohoto projektu je objasnit roli ligandů Wnt v obnově střevního epitelu a v pokročilých stádiích kolorektálního karcinomu. Různé ligandy Wnt hrají různou roli při aktivaci kanonické i nekanonických kaskád signalizace Wnt a jejich exprese, kooperace a zdrojové buňky ve střevě a především v kolonu nejsou zcela známy. Dosavadní výzkumy naznačují, že zdrojem těchto ligandů, nezbytných pro udržení a proliferaci střevních kmenových buněk, jsou krom epitelálních buněk i některé buněčné typy v mezenchymu. Déle se tento projekt věnuje roli ligandu Wnt5a v regeneraci střevního epitelu po poškození a v progresi a invazivitě pokročilých stádií kolorektálního karcinomu. Vyřazení regulačních mechanismů, především tumor supresorových proteinů Apc a p53 spolu s aktivací onkogenů, např. Kras, vede k tvorbě a progresi nádorů v tenkém i tlustém střevě. Tvorby nádorů lze docílit také podáním mutagenu a vyvoláním zánětu v tlustém střevě. Organoidy izolované ze zdravého střevního epitelu i z kolorektálních nádorů umožní modifikace ligandů Wnt a sledování dopadů těchto modifikací na střevní kmenové buňky a obnovu epitelu. 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. Kultivace organoidů, získaných z lidských nádorů, umožní charakterizovat tyto nádory a může v budoucnu přispět k individualizaci léčby pacientů s kolorektálním karcinomem.

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 popsané v tomto projektu povedou k získání nových informací o regeneraci střevního epitelu a o kolorektálním karcinomu 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 *Mus musculus* různého stáří. Předpokládáme následující celkovou „spotřebu“ pokusných zvířat: rok 2018 – 250; rok 2019 – 250; rok 2020 – 250; rok 2021 – 250; 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 **střední**. Navrhované metody aplikace látek jsou pro zvířata šetrné a nezpůsobují výraznou či dlouhodobou bolest. Vyvolání zánětu či nádorů ve střevech může zhoršit fyziologickou funkci střeva, nicméně zvířata budou usmrcena dřív, než dojde k výrazným patologickým změnám působícím utrpení. Růst lidského nádoru v podkoží imunodeficientních myší 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: Uveďte, 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 myší *in vivo* 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 *in vivo*. Data získaná *in vitro* 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.

Vysvětlete 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.