

**NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ**

<b>Název projektu pokusů</b>	
Úloha vápníkových kanálů v rozvoji a progresi srdečního selhání u spánkové apnoe	
Doba trvání projektu pokusů	1.6.2018 - 31.12.2021
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	srdeční, selhání, spánková, apnoe, vápník
<b>Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka</b>	
	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
<b>Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)</b>	
<p>Obstrukční spánková apnoe je onemocnění postihující 5-15 % běžné populace. Je to onemocnění, které je významně asociováno s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, mezi než patří například srdeční selhání. Pacienti trpící obstrukční spánkovou apnoe mají 2,38x vyšší riziko rozvoje srdečního selhání než běžná populace. Zároveň byla v populaci pacientů se srdečním selháním reportována prevalence obstrukční spánkové apnoe 37 %.</p> <p>Srdeční selhání je onemocnění postihující 250 000 obyvatel v České republice a toto číslo bude v nejbližších letech narůstat vzhledem k prodlužujícímu se věku obyvatelstva. Mezi nejčastější příčiny tohoto onemocnění patří ischemická choroba srdeční, chlopenní vady, hypertenze a kardiomyopatie. Přestože patofyziologické mechanismy vedoucí k rozvoji srdečního selhání u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe jsou známy (fragmentace spánku, expozice intermitentní hypoxii, mechanické zatěžování srdečních oddílů), molekulární podstata dosud není objasněna. Předpokládáme, že mechanismy podílející se na rozvoji srdečního selhání u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe jsou podobné jako u klasické ischemické etiologie, tj. remodelace myokardu, změny energetického metabolismu, nadměrná neurohumorální stimulace a abnormální cirkulace vápníku.</p> <p>V předkládaném projektu budeme využívat myšího modelu k verifikaci objevů z buněčné linie HL-1 (spontánně se kontrahující kardiomyocyty). Předpokládáme, že expozice intermitentní hypoxii ovlivní cirkulaci vápníku v myších kardiomyocytech. Následně budeme testovat, zda-li farmakologická stabilizace vápníkových kanálů pomocí moderních léčiv ze skupiny Rycals (JTV-519 a S107) povede k lepší cirkulaci vápníku na molekulární úrovni.</p>	
<b>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)</b>	
Předpokládáme, že experimenty v rámci tohoto projektu přinesou nové významné poznatky o vlivu intermitentní hypoxie na metabolismus vápníku v kardiomyocytech, jakožto jeden z klíčových molekulárních mechanismů rozvoje srdečního selhání u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe. Translační význam předkládané studie spočívá nejen v popsání vápníkového metabolismu, ale zejména v možnosti efektivně a cíleně zlepšit buněčné hospodaření s vápníkem pomocí stabilizace RyR2 kanálu.	
<b>Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá</b>	
Pro experimenty v rámci zmíněného projektu plánujeme využít zavedený model spánkové apnoe u myši (Tagaito 2001). K pokusu budou použity C57/BL6-J myši (samci) ve věku 6-8 týdnů.	
Celkový počet zvířat použitých v rámci této studie odhadujeme na n=120:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60 zvířat v tomto rozpisu: n=15 pro skupinu léčenou JTV-519 a placebem (DMSO), násobeno 2x (kontrolní a hypoxická skupina)</li> <li>• 60 zvířat v tomto rozpisu: n=15 pro skupinu léčenou S107 a placebem (H<sub>2</sub>O), násobeno 2x (kontrolní a hypoxická skupina)</li> </ul>	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
K pokusu budou použity C57/BL6-J myši (samci) ve věku 6-8 týdnů. Ti budou po dobu 2 týdnů přerušovaně vystavováni hypoxickému nebo normoxickému (kontrolnímu) prostředí. Expozice bude prováděna každý den po dobu 12-ti hodin během spánkové části denního cyklu.	
Rycals budou kontinuálně podávány subkutánně po dobu 14 dní pomocí osmotické pumpy (Alzet, Velaz)	

implantované na hřbetu myši. Léky budou podávány v dávce 0,5mg/kg/h (JTV-519 rozpuštěné v DMSO) resp. 5mg/kg/h (S107 rozpuštěné v H<sub>2</sub>O). Jako placebo bude využito DMSO resp. H<sub>2</sub>O. Po dokončení expozice hypoxickým či kontrolním podmínkám budou myši uvedeny do anestezie isofluranem a následně bude provedena excize srdce, které bude zavěšeno na Langendorffův systém a budou z něj izolovány kardiomyocyty.

Kadavery zvířat budou po ukončení pokusu uloženy do mrazničky a následně odvezeny/zpracovány firmou Asavet a.s.

### **Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)**

**Nahrazení používání zvířat:** Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Pro uvedený typ pokusu neexistuje alternativní metoda vzhledem k mechanickým, metabolickým a neurohumorálním mechanismům způsobujícím srdeční selhání u spánkové apnoe, nicméně součástí celé studie je také in-vitro část, ve které bude zkoumán přímý vliv intermitentní hypoxie na HL-1 linii kardiomyocytů bez interference dalších faktorů. Laboratorní myš je nejvhodnějším druhem pro tuto studii, jelikož metabolické změny indukované syndromem spánkové apnoe jsou pravděpodobně zprostředkovány mechanickými, endokrinními a neuronálními mechanismy, které není možné studovat za podmínek in-vitro a model intermitentní hypoxie je na myším modelu dobře validován a úspěšně využíván v řadě laboratoří.

**Omezení používání zvířat:** Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Počet zvířat užitých v každé skupině byl stanoven na základě předchozích studií jako minimální počet nutný k detekci cca 25% rozdílu mezi skupinami. K redukci počtu zvířat dále dochází vysokou technickou zdatností investigátorů a kombinací in-vitro a in-vivo metodik.

**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.

Invazivní procedury jsou vykonávány v celkové anestezii. Samotné vystavení intermitentní hypoxii nepředstavuje významný zdroj stresu (obdoba spánkové apnoe u lidí), neomezuje sociální interakce ani celkovou kvalitu života pokusných zvířat. Se zvířaty budou manipulovat výhradně osoby s platným školením v rámci zákona na ochranu pokusných zvířat.