

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Využití ketogenní diety v léčbě dědičných poruch ATP syntázy

Doba trvání projektu pokusů v měsících	60
Klíčová slova	mitochondrie
mitochondriální onemocnění	ketogenní dieta
kardiomyopatie	0

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Poruchy svalové a kosterní soustavy u lidí [PT27]
Translační a aplikovaný výzkum: Kardiovaskulární poruchy u lidí [PT23]
Translační a aplikovaný výzkum: Gastrointestinální poruchy včetně jater u lidí [PT26]
0

Cíle projektu pokusů

Dědičné poruchy ATP syntázy představují jednu z nejzávažnějších forem mitochondriálních onemocnění. Jejich nejčastější příčinou v lidské populaci jsou právě mutace v genu Tmem70. Cílem pokusu je porozumění mechanismu benefičního účinku ketogenní diety na zvířecí model deficitu ATP syntázy v důsledku chybní Tmem70 proteinu. Pro pacienty s mutacemi v Tmem70 genu dosud neexistuje účinná terapie. Pokusy mohou mít tedy přímý translační potenciál do humánní medicíny v případě, že se benefiční účinek ketogenní diety a optimální forma její aplikace na zvířecím modelu potvrdí.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Projekt je zaměřen na jednu z nejzávažnějších příčin úmrtí na kardiovaskulární onemocnění. Svými výsledky může významným způsobem přispět k objasnění nových terapeutických postupů v léčbě AIM, které bude možné uplatnit v klinické praxi.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

[A] INDUKCE CRE REKOMBINÁZY:

1. orální gaváž

[B] DIETNÍ INTERVENCE:

1. podávání ketogenní diety, 2. podávání vysokotuké diety, 3. substituce části kalorického příjmu keton estery nebo triglyceridy se střední délkou uhlíkového řetězce (MCT, C8-12)

[C] GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST:

1. Podání glukózy orálně nebo i.p., 2. odběry krve z ocasu.

[D] ANALÝZA FUNKČNÍHO STAVU SRDCE:

1. Echokardiografie

Dietní intervence jsou plánovány na 8-12 týdnů.

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

Vystřížení genu Tmem70 v důsledku indukce Cre rekombinázy může vést ke středně závažným fenotypům. Stav zvířat bude proto průběžně monitorován a v případě jeho zhoršení během pokusů (signalizovaného nežádoucími změnami tělesné váhy, chování či vzezření zvířat) bude konzultován určený veterinární lékař. V případě potřeby budou poté zvířata z pokusu vyřazena a usmrcena předávkováním anestetikem. Pro echokardiografické a katetrizační vyšetření srdce budou zvířata uvedena do inhalační anestézie isofluranem. Vlastní echokardiografie nezpůsobuje bolestivé podněty, nicméně anestézie je nutná z důvodů imobilizace jedinců při vyšetření. Na konci experimentu budou zvířata v celkové anestézii (isofluran) usmrcena zlomením vazů či předávkováním anestetikem.

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
potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2]	0	500	100	0

myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	200	400	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				
Na konci experimentu budou usmrcena předávkováním anestetikem (isofluran). Následně budou odebrány tkáně a orgány (krev, plazma, játra, srdce, ledviny, plíce, kosterní sval, bílá a hnědá tuková tkáň, slezina) po další biochemické a histologické analýzy. Kadavery budou umístěny do sběrných nádob kafilerního boxu.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Vzhledem k nutnosti komplexního pohledu na studovanou problematiku nezbývá než použít laboratorní zvířata, z nichž nejvhodnější jsou laboratorní potkani a myši. Řada dostupných poznatků a využití transgenních modelů s jasně definovanými vlastnostmi umožní minimalizovat počty zvířat v experimentech. Alternativními metodami, bez využití laboratorních zvířat, nelze postihnout složitost studované problematiky, pokud sledujeme fyziologické parametry.				
Omezení používání zvířat				
Počty zvířat na skupinu budou uzpůsobeny minimálním požadavkům na získání relevantních a statisticky prokazatelných výsledků, tj. 6-8 jedinců na biochemické a molekulárně-biologické analýzy; 8-12 jedinců na fyziologická měření.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Je snaha o zajištění co nejšetrnějšího zacházení se zvířaty během celého experimentu. Experimenty budou provedeny v souladu s etickými hledisky. Při práci se zvířaty bude dodržován tichý přístup a jemná manipulace. Stres spojený s manipulací (např. vážení během pokusu) je minimalizován a frekvence vážení byla nastavena na minimální z hlediska výpovědní hodnoty. Invazivní odběry vzorků budou provedeny v celkové anestezii a poté již zvíře nenabyde vědomí.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

K experimentům budou použiti samci laboratorního potkana nebo samci i samice myši.

U potkanů se bude jednat o zvířata outbredního kmene Wistar (kontroly), inbredního kmene SHR/Olalpcv (dále SHR), a GMO linie potkanů z SHR odvozené: SHR-Tmem70tm1/Olalpcv knockout genu Tmem70 (dále SHR-Tmem70ko) a SHR-Tmem70tm1-Tg(Ef1a-Tmem70)Olalpcv (dále SHR-Tmem70tg) potkany, kteří na pozadí ZFN indukovaného knockoutu genu Tmem70 exprimují transgenní Tmem70 konstrukt z Ef1a promotoru. Potkani budou do dietních experimentů nasazováni ve věku 4 týdnů, pokud se bude jednat pouze o odběr vzorků a tkání z kontrolních jedinců bez dietní intervence, budou používány i zvířata ve věku 6 týdnů.

V případě myši budou používány kontrolní myši inbredního kmene Bl/6 a transgenní myši kmen (na Bl/6 pozadí) s celotělově tamoxifenem indukovanou Cre rekombinázou a Cre indukovaným knockoutem genu Tmem 70 (ROSA-Cre ERT2 x ACTFLPe/Tmem 70, dále iTmem70)