LABORATORNÍ ZVÍŘATA

Ústav patologické fyziologie
Lékařská fakulta v Plzni
Univerzita Karlova

Význam pokusných zvířat

- Fyziologie živočichů
- Patofyziologie nemocí
- Vývoj léčiv a léčebných postupů
- Ověřování bezpečnosti látek, biokompatibility materiálů
- Nácvik chirurgických postupů

Translační výzkum

Význam i pro veterinární lékařství (modelový X cílový organismus)

Experiment X pozorování

Objev inzulinu (1920, 1921)

- Frederick Banting, Charles Best, John James Richard Macleod

1. léčený diabetik: Leonard Thompson 1922

Nejvýznamnější druhy laboratorních zvířat

- **Myš** – nejpoužívanější, farmakologie, genetika savců, virologie, modely lidských nemocí (množství mutantních kmenů, transgenních a knock-out linií)
- **Potkan** – výzkum učení, paměti a chování, modely diabetu, onemocnění ledvin apod.
- **Králík** – sérologie, kvantitativní stanovení inzulínu, stanovení pyrogenů, testování dráždivých účinků látek na rohovku
- **Kočka** – výzkum CNS a respiračního systému
- **Pes** – např. beagle, užití v elektrofyziologii, neurofyziologii, farmakologii
- **Morče** – mikrobiologie a sérologie, fyziologie sluchu
- **Křeček** - genetika
- **Prase** - nácvik chirurgických technik, dočasné krytí popálenin prasečí kůží
- **Primáti** – makak, pavián, šimpanz – použití v neurologii, virologii, výzkumu chování, k použití nutná výjimka

Nejvýznamnější druhy laboratorních zvířat

- **Žába** – (drápatka vodní) fyziologie krevního oběhu, elektrofyziologie
- **Ryby** - Danio rerio
- **Měkkýši**
- **Hmyz** - Drosophila melanogaster, genetika
- **Hlístice** - Caenorhabditis elegans

Genetika laboratorních zvířat

1. **Isogenní** = geneticky definované kmeny

   (isogenicita = genetická totožnost všech jedinců)

2. **Neisogenní** = geneticky nedefinované kmeny

3. Kmeny geneticky částečně definované

Isogenní kmeny

Inbrední kmeny

- Vznik příbuzenskou plemenitbou po více než 20 generací (bratr + sestra nebo potomek + jeden z rodičů)
- Homozygotnost více než 98 % (Stupeň homozygotnosti je udáván koeficientem inbreedingu.)
- Vlastnosti: isogenicita, fenotypová uniformita (nízká variabilita reaktivity), obvykle nízká fertilita, náchylnost k nemocem
- Výhody užití v experimentu: homogenní soubor, stačí menší počet jedinců
- Nevýhody užití v experimentu: riziko, že zjištěné skutečnosti jsou kmenově specifické a neplatí pro jiné kmeny, problematičtější generalizace výsledků

Koizogenní kmeny (mutantní kmeny)

- od původního kmene se liší jen v jednom genu, ve kterém došlo k mutaci

Kongenní kmeny

- kmeny vzniklé křížením dvou kmenů a následným zpětným křížením (minimálně 10, selekce sledovaného znaku)
- výskyt specifických genů jednoho kmene na pozadí kmene druhého

Isogenní kmeny

Rekombinantně-inbrední kmeny

- zkřížení dvou kmenů, z hybridů jsou pak vytvořeny nové linie, které jsou dále kříženy bratr x sestra, vznikne nový inbrední kmen

Rekombinantně-kongenní kmeny

- zkřížení dvou kmenů, následně 3 zpětná křížení k jednomu z rodičovských kmenů a pak inbredizace křížením bratr x sestra (alespoň 14krát)

Konsomické kmeny

- na pozadí jednoho kmene přenesen zpětným křížením celý chromosom kmene druhého (podobně, jako jednotlivé geny u kongenních kmenů), obtížný proces

Neisogenní kmeny

Outbrední linie

- geneticky heterogenní populace, nedochází však ke křížení s jedinci jiných linií, v rámci populace se vyhýbáme příbuzenskému křížení tak, aby koeficient inbreedingu zůstával co nejnižší
- Vlastnosti: určitá fenotypová variabilita (vyšší variabilita reaktivity), vyšší fertilita a odolnost vůči nemocem
- Výhody užití v experimentu: levnější a snazší produkce, obecněji platné nálezy
- Nevýhody užití v experimentu: méně homogenní soubor, nutnost použití většího počtu jedinců

Geneticky heterogenní linie

- vznikají zkřížením několika inbredních kmenů a následným chovem jako v outbrední populaci

Outbrední selektované linie

- v outbrední populaci je selektován určitý fenotypový znak

Zvířecí modely onemocnění

Spontánní mutace X geneticky modifikované organismy

Mutantní zvířata

Transgenní zvířata

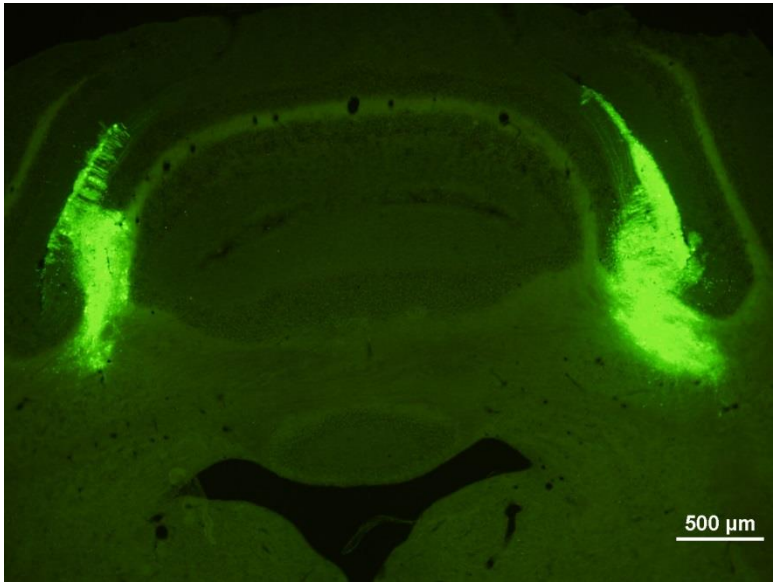
Knock-in

Knock-out (knock-down)

Podmínění mutanti

Lokální transfekce

Modely na jiném než genetickém podkladě



Gnotobiologie laboratorních zvířat

Zvířata konvenční

- nedefinovaná mikroflóra
- otevřený chov za dodržení základních hygienických podmínek

SPF zvířata = specified pathogen free

- mikróflora zvířat prokazatelně neobsahuje specifické patogeny.
- bariérový chov

Gnotobiotická zvířata

- izolátorový chov

1. **Axenická zvířata = germ free**
   - bez přítomnosti jakýchkoliv mikrobů
   - mláďata vybavena sterilní hysterektomií nebo hysterotomií do strerilního prostředí izolátoru
2. **Asociovaná zvířata**
   - vytvořená z axenických zvířat jejich umělým osídlením jedním nebo více druhy mikroorganismů
   - monoxenická, dixenická, polyxenická

Systémy chovu laboratorních zvířat

Otevřený

- vstup zvířat, osob a materiálu je volný, bez bariéry

Bariérový

- zvířata oddělena od vnějšího prostředí bariérou, nejsou oddělena od člověka (sterilizace potravy, vody, steliva, dokonalá osobní hygiena personálu, vstup hygienickou smyčkou)

Izolátorový

- zvířata uzavřena v izolátoru, který je odděluje od vnějšího prostředí i od člověka

Schéma bariérového chovu

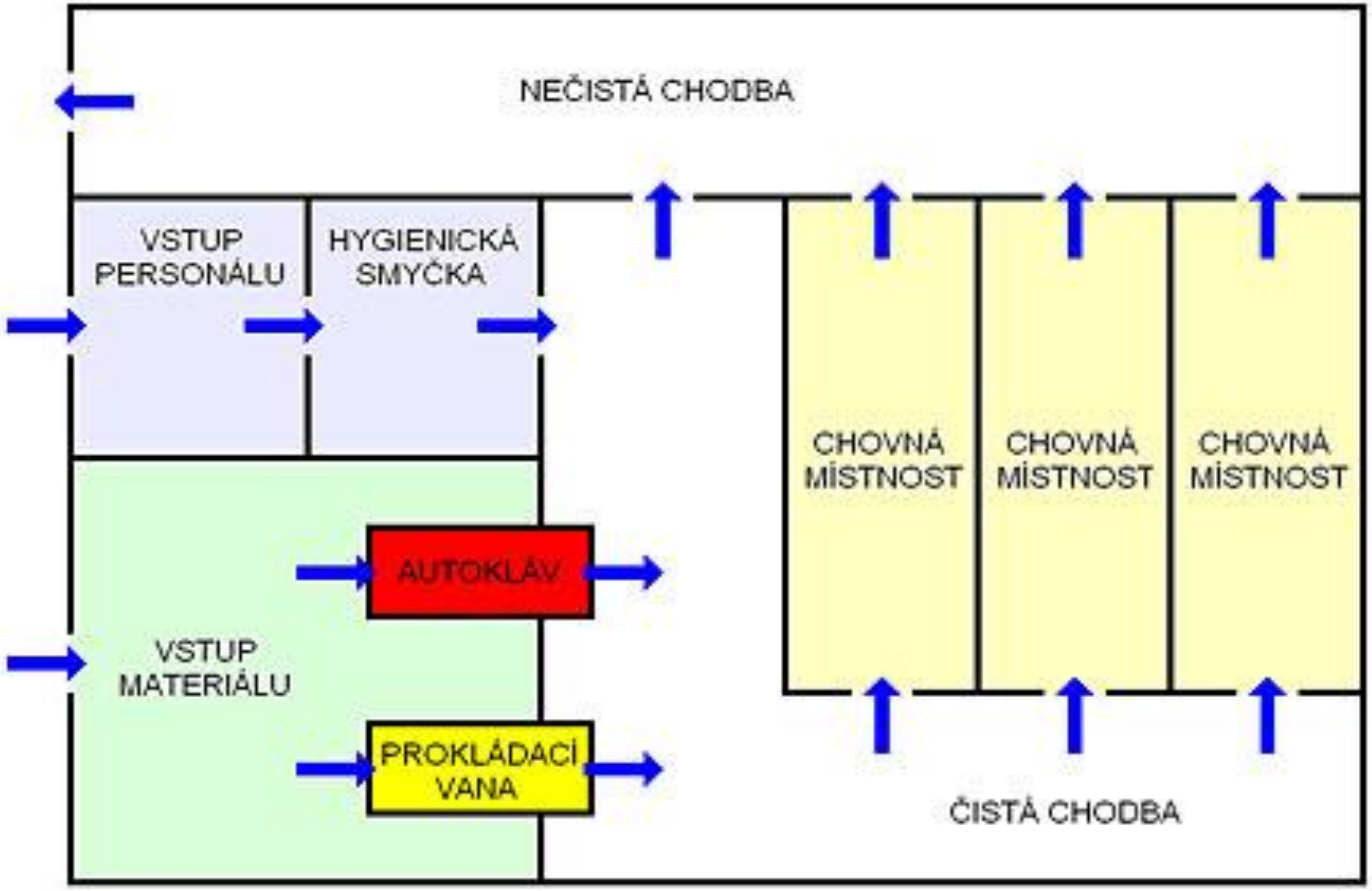
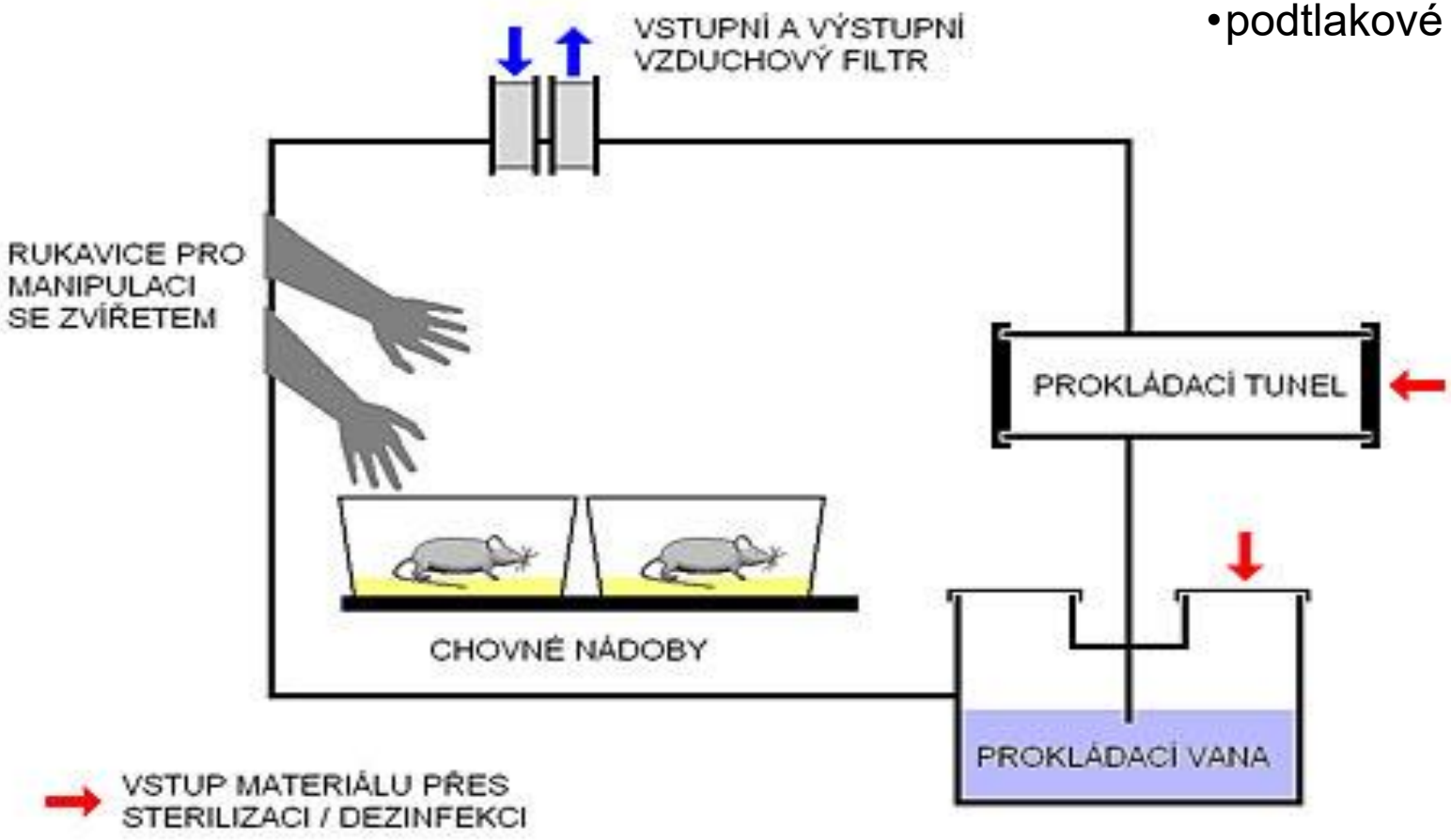


Schéma izolátoru

Izolátory:
- přetlakové
- podtlakové



Zásady práce s pokusnými zvířaty

3 R: REPLACEMENT

REDUCTION

REFINEMENT

Welfare, standardizace podmínek chovu

Chov zvířat za účelem pokusného využití

Alternativní testy

- Musí projít **validačním řízením**, které zajišťuje organizace ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods). Každá nová alternativní metoda je revidována panelem odborníků z celého světa, kteří nejsou na výsledku revize finančně zainteresováni. Po určitou dobu mohou být používány obě metody – stará i nová.
- Dle ECVAM (European Centre for the Validation of alternative methods) v současnosti uznáváno **21 vědecky ověřených alternativních metod** (zejména testování fototoxicity, kožní dráždivosti, embryotoxicity, pyrogenity).

In vitro metody

Buněčné a tkáňové kultury

- rostlinné, živočišné, lidské buňky pěstované v laboratoři

Příklady:

- **Neutral Red assay** – k bb. kulturám se přidá testovací látka s kontrastní barvou, která je vychytávána pouze živými buňkami
- **HeLa buňky** – nesmrtelná linie rakovinných buněk získaná v r. 1951 z cervixu pacientky Henrietty Lacksové. Onkologický výzkum.
- **3T3 NRU phototoxicity test** – k buněčným koloniím přidána testovaná látka v různých koncentracích, následně aplikováno UV záření
- **EYETEX screen test** - proteinový roztok získaný z fazolí – náhrada DRAIZE testu dráždivosti na oko. Chemické poškození: zkalení roztoku

Mikroorganismy

Příklad:

- **Amesův test** - test mutagenity; na agar se Salmonella typhimurium s defektním genem pro syntézu histidinu přidána testovaná látka. Je-li mutagenní, dojde k reverzní mutaci a syntéze histidinu → bakterie přežijí

Počítačové a matematické modely (in silico metody)

- zobecňující modely, kvalita predikce závislá na kvalitě vložených údajů
- Při přípravě modelu nahrazujícím práci se zvířetem je třeba užít velkého množství zvířat pro dostatečné množství dat pro simulaci. Získaný odhad musí být ověřen pokusem.

Testy na nižších živočiších nebo nižších vývojových stádiích

- Kuřecí embryo – náhrada DRAIZE testu; obaly zárodku prokrveny, ale bez inervace
- Nitěnky – testování LD50
- Vajíčka drápatky vodní – testování mortality, malformací, inhibice růstu

Alternativní metody s použitím zvířat

- Změněno testování toxicity xenobiotik: redukce počtu zvířat, nečeká se na úhyn (špatný stav dostatečným projevem toxicity)
- Oční dráždivost – netestuje se, je-li látka dráždivá pro kůži, nebo je-li látka silně kyselá/zásaditá

KONEC