

Zasady zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia. Metody alternatywne

Dr R. Wrzesień
Centralne Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych
WUM

Momenty kluczowe dla sprawy

- ▶ **1789**
Prawnik i filozof Jeremy Bentham zaczyna moralną debatę nad okrucieństwem wobec zwierząt publicznie zadając pytanie „Czy zwierzęta cierpią?”
- ▶ **1822**
Richard Martin ogłasza Brytyjski Akt Przeciw Przemocy
- ▶ **1831**
Marshall Hall, badacz zwierząt, proponuje wprowadzenie kodu etycznego dla eksperymentów
- ▶ **1859**
Zostaje opublikowana teoria ewolucji Darwina, dostarczając racjonalnych podstaw do wykorzystywania zwierząt w celach poznawczych
- ▶ **1885**
Pasteur używa zwierząt do badań nad chorobami zakaźnymi i znajduje szczepionki na cholera i wściekliznę

- ▶ **1906**
Po wzniesieniu na londyńskim University College pomnika przedstawiającego sekcję zwierząt obrońcy praw zwierząt wzniesają rozruchy
- ▶ **1986**
W ustawie o ochronie zwierząt zostaje wprowadzony zapis o konieczności oceny stosunku bólu do korzyści przed rozpoczęciem eksperymentu
- ▶ **1992**
Zostaje ufundowane Europejskie Centrum dla Oceny Metod Alternatywnych
- ▶ **1996**
W Holandii odbywa się Pierwszy Światowy Kongres w sprawie Alternatyw wobec Używania Zwierząt

1997- Ustawa o Ochronie Zwierząt

„Zwierzę, jako istota żyjąca, zdolna do odczuwania, nie jest rzeczą. Człowiek jest mu winien poszanowanie, ochronę i opiekę. „

1999- Krajowa Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Zadania:

- Wydawanie opinii o dopuszczalności doświadczeń na zwierzętach
- Określanie warunków i procedur przeprowadzania tych doświadczeń
- Wyrażanie zgody na wykonywanie doświadczeń powodujących ból i inne cierpienia zwierząt oraz wydawanie opinii o warunkach bytowych w hodowlach zwierząt laboratoryjnych i zwierzętarniach



- Ustalone pochodzenie zwierząt
- Gdzie i kiedy będą się odbywały prace-kontrola
- Odrzucenie-niewyraźny cel, nadmierna ilość zwierząt

W metodach klasycznych wyniki badań, możliwość ich ekstrapolacji na ludzi i koszt zależą przede wszystkim od wyboru właściwego gatunku zwierząt, stanu ich zdrowia, sposobu pielęgnowania i organizacji badań.

Zwierzęta o jak najniższej organizacji układu nerwowego

Badania na dwóch różnych gatunkach zwierząt (w tym jeden nie-gryzoń)

Zwierzęta obu płci, młode, dojrzałe płciowo



WYKORZYSTANIE ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH- ETYCZNE ASPEKTY

- Badania podstawowe
- Toksykologiczne
- Diagnozowanie chorób
- Psychologiczne, behawioralne
- Jako modele do różnych chorób i działania leków
- Do celów kosmetycznych

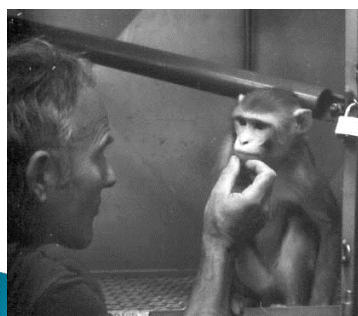


Gatunki zwierząt laboratoryjnych

Żyrodzie badania: toksykologiczne, żywieniowe, onkologiczne, fizjologiczne, farmakologiczne, hematologiczne, transplantologiczne.	Świnka morska badania: serologiczne, patologiczne, immunologiczne, farmakologiczne.
Pies badania: chirurgiczne, farmakologiczne, fizjologiczne, toksykologiczne, transplantologiczne, żywieniowe.	Krolik badania: genetyczne, onkologiczne, immunologiczne, fizjologiczne, chirurgiczne, bakteriologiczne, transplantologiczne.
Kot badania: neurofizjologiczne, chirurgiczne, farmakologiczne.	Chomik badania: parazytologiczne, wirusologiczne, stomatologiczne, onkologiczne, immunologiczne.

W badaniach biomedycznych, genetycznych powodujemy ból i cierpienie

Zwierzęta narażone na cierpienie- ssaki posiadają psychikę, zachowania socjalne itp.



Pięć wolności

- › Pojęcie „dobrostan” (ang. welfare, well-being) w terminologii zootechniczno-weterynaryjnej jest obecne już od mniej więcej 50 lat. Jednakże cały czas trwa dyskusja nad zagadnieniami dobrostanu, a więc wszelkimi elementami, które wpływają na „stan dobra” zwierząt. Mimo iż jest wiele definicji „welfare”, to wszystkie sprowadzają się do tego, że dobrostan jest to stan, w którym zwierze zarówno z etologicznego, jak i fizjologicznego punktu widzenia znajduje się w harmonii z otaczającym środowiskiem i jest zdolne zaadaptować się bez cierpienia do zmian zachodzących w tym środowisku. Bardzo trafnie pojęcie „animal welfare” zinterpretował Kolhaas (1993) – dobrostan oznacza więcej niż komfort fizyczny i biologiczny, ponieważ uwzględnia także równowagę emocjonalną zależną od możliwości wypełniania gatunkowych i osobniczych norm behawioralnych. Można więc powiedzieć, że „stan dobra” dotyczy organizmu jako całości i obejmuje wszystkie jego funkcje – od zjawisk zachodzących na poziomie komórkowym aż do reakcji psychicznych. Spełnienie tak szerokiego spektrum potrzeb ma umożliwić zabezpieczenie zwierzętom „pięciu wolności” zawartych w Kodeksie Dobrostanu Zwierząt, który został opracowany przez angielskich specjalistów z Rady Dobrostanu Zwierząt (Farm Animals Welfare Council).
- › Miernikiem właściwej opieki nad zwierzętami jest zachowanie **pięciu wolności**:
- › **Wolność od głodu i pragnienia** poprzez zapewnienie dostępu do świeżej wody i pokarmu, który zapewni zdrowie i siły.
- › **Wolność od urazów psychicznych i bólu** poprzez zapewnienie odpowiedniego traktowania.
- › **Wolność od ran i chorób** dzięki zapobieganiu, szybkiej diagnozie i leczeniu.
- › **Wolność od stresu** poprzez zapewnienie opieki i traktowanie, które nie powoduje cierpienia zwierząt.
- › **Wolność do wyrażania naturalnego zachowania się** poprzez zapewnienie odpowiedniej przestrzeni, warunków i towarzystwa innych zwierząt.

ZA	PRZECIW
Nie można używać tych metod lub testów na ludziach	Człowiek nie ma prawa wykorzystywać zwierząt
Testowanie wymaga warunków laboratoryjnych, nie można w takich warunkach trzymać ludzi	Zamknięte laboratorium stwarza warunki do nadużyć
Badania na zwierzętach są konieczne, żeby określić reakcję całego organizmu	Są choroby, których nie da się wywołać w organizmie w sposób sztuczny (Parkinson)
Leki psychiatryczne-ważna jest reakcja behawioralna-potrzebny jest żywy organizm	U zwierząt mogą zająć nieoczekiwane rezultaty
Testowanie leków, na choroby na które nie ma jeszcze żadnego leku (ebola, HIV) są śmiertelne	Wyniki badań na zwierzętach mogą być zniekształcone przez stres



Zwierzęta mają szybszą rotację pokoleń-niektóre aspekty trzeba badać w wymiarze wielopokoleniowym

Pewne leki stosowane w medycynie ludzkiej mają negatywne działanie na zwierzęta

Badania mają wpływ na rozwój medycyny i weterynarii

Często celem jest zdobycie stopnia naukowego a nie rzeczywiście znalezienie jakiegoś leku



- › W teorii różnice między zwierzętami laboratoryjnymi a ludźmi nie są na tyle istotne, by nie dało się ich wyeliminować w procesie badawczym.

ALE !!!



- ▶ **Muchomor**, którego niewielka ilość uśmiercić może kilku ludzi, jest całkowicie nieszkodliwa dla królika.
- ▶ **Jeżozwierz** może przyswoić jednorazowo dawkę **opium**, jaką narkoman wypala w ciągu dwóch tygodni, może znieść taką ilość **kwasu cyjanowodorowego**, jaką wystarczyłoby do otrucia jednej szkoły.
- ▶ Zabójcza dla ludzi **strychnina** nie wpływa ujemnie na świnkę morską podczas gdy najmniejsza dawka **penicyliny** powoduje jej śmierć.
- ▶ **Aspiryna** i **insulina** wywołują u szczurów i myszy zniekształcenia płodu, zaś szkodliwa dla ludzi **wilcza jagoda** jest normalnym składnikiem ptasiego menu.

Przykłady te dowodzą jednego:
doświadczenia na zwierzętach nie zawsze
stwierdzają w jaki sposób dany preparat
działa na organizm ludzki !!!

- ▶ **Mexaform** – środek na przeczyszczenie testowany głównie w Japonii, u ponad 200 000 ludzi spowodował utratę wzroku i bezwład nóg.
- ▶ **Conteergan** – to jeden ze środków uspokajających, który przed wypuszczeniem na rynek sprawdzany był na zwierzętach. Jego skutkiem było ok. 100 000 urodzeń chorych i kalekich dzieci oraz 10 000 poronień.
- ▶ **Thalidomid** – (sławny środek uspokajający dla kobiet w ciąży) – wywołał falę ponad 10 tys. narodzonych zdeformowanych dzieci.



ZASADY PROGRAMOWANIA BADAŃ Z UŻYCIEM ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH

3 R

REPLACING	ZASTĘPOWANIE INNYMI MODELAMI DOŚWIADCZALNYMI (METODY ALTERNATYWNE)
REDUCING	OGRANICZENIE LICZBY ZWIERZĄT głównie przez stosowanie oceny statystycznej ilości zwierząt potrzebnych do doświadczenia
REFINING	DOSKONALENIE PLANOWANIA I PRZEPROWADZANIA BADAŃ MODELI ZWIERZĘCYCH I METOD

8. OPIS UWZGLĘDNIENIA W DOŚWIADCZENIU ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA (3R)

9. PLANOWANE METODY UŚMIERCANIA ZWIERZĄT²⁵

8. OPIS UWZGLĘDNIENIA W DOŚWIADCZENIU ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA (3R)

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętych wniosków badawczym, w bazach danych:

___ EBSCO ___ PubMed; ___ Google Scholar; ___ AGRICOLA; ___ ScienceDirect; ___ Web of Science (JCR); ___

Wykorzystałam/skorzystałem słowa kluczowe:

Na podstawie przesłania istniejącej literatury, stwierdzam że: _____

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: _____

B. Brak jest danych dotyczących _____

Uryskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: _____

A/ Rozwinięcie teoretyczne-poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku _____

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na _____

Wskazane jest w ramach uwzględnienia w doświadczeniu zasad 3R podać sprawdzenie istniejącej wiedzy w zakresie objętych wniosków badawczym, w bazach danych.

W przypadku wprowadzenia w procedurach zmian mających na celu ich złagodzenie (zmniejszenie dotkliwości) opisać, na czym polegały zmiany.

ODPOWIEDZIALNOŚĆ NAUKOWCA:

- NAUKOWIEC OSOBIŚCIE JEST MORALNIE ODPOWIEDZIALNY ZA WYKONYWANE DOŚWIADCZENIA Z WYKORZYSTANIEM ZWIERZĄT
- NAUKOWIEC ZE WZGLĘDÓW ETYCZNYCH JEST ZOBOWIĄZANY DO ZMINIMALIZOWANIA NIEKORZYSTNYCH KONSEKWENCJI PRZEPROWADZONEGO DOŚWIADCZENIA - WINIEN REALIZOWAĆ ZASADĘ 3R
- ODPOWIEDZIALNOŚĆ NAUKOWCA ROZCIĄGA SIĘ NIE TYLKO NA OKRES TRWANIA DOŚWIADCZENIA, TAKŻE PO JEGO ZAKOŃCZENIU ODPOWIADA ZA LOS WYKORZYSTANYCH DO BADAŃ ZWIERZĄT
- DO OBOWIĄZKÓW NAUKOWCA NALEŻY TAKŻE PRZEPROWADZENIE SZKOLENIA WSPÓŁPRACOWNIKÓW MNIEJ DOŚWIADCZONYCH, ASYSTENTÓW TECHNICZNYCH I PERSONELU OPIEKUJĄCEGO SIĘ ZWIERZĘTAMI

BADACZ PROGRAMUJĄCY DOŚWIADCZENIE Z UŻYCIEM ZWIERZĄT WINIEN PODAĆ OCENĘ STOPNIA KOMPROMISU W ODPOWIEDNIM ZAKRESIE:

„1” - BRAK OGRANICZENIA.	PROCEDURY NIEINWAZYJNE.
„2” - NISKIEGO STOPNIA.	PROCEDURY POWODUJĄCE LEKKI CHWILOWY BÓL/DYSTRESS ALBO DŁUGOTRWAŁY LEKKI DYSKOMFORT
„3” - ŚREDNIEGO STOPNIA.	PROCEDURY POWODUJĄCE UMIARKOWANY BÓL/DYSTRESS
„4” - DUŻEGO STOPNIA.	PROCEDURY POWODUJĄCE SILNY BÓL/ DYSTRESS I ZWYKLE NIEODWRACALNE USZKODZENIE CIAŁA I FUNKCJI PSYCHICZNYCH

Doświadczenia na zwierzętach są dopuszczalne tylko wtedy, gdy są konieczne do:

- 1) opracowania, wytwarzania, kontroli jakości, zapewnienia skuteczności i testowania bezpieczeństwa produktów leczniczych, środków spożywczych oraz innych substancji, preparatów i wyrobów w celu:
 - a) zapobiegania, rozpoznawania lub leczenia chorób, złego stanu zdrowia lub innego nieprawidłowego stanu, lub ustalenia szkodliwego wpływu tych produktów i wyrobów na człowieka, zwierzęta lub rośliny,
 - b) oceny, wykrywania, regulacji lub zmiany stanu fizjologicznego człowieka, zwierząt lub roślin,
- 2) ochrony zdrowia człowieka lub zwierząt przed chorobami,
- 3) ochrony środowiska w celu ochrony gatunków, zdrowia człowieka lub dobrostanu zwierząt,
- 4) podstawowych badań naukowych,
- 5) dydaktyki w szkołach wyższych.

Metody alternatywne:

- bazy danych i analiza danych archiwalnych symulacje komputerowe *in silico*
- badanie zależności struktura – aktywność
- modelowanie toksokinetyczne
- metody *in vitro*:
 - Hodowle komórkowe
 - Hodowle narządowe
 - Układy *in vivo/in vitro* (Het-CAM)
 - Inne: erytrocyty, pierwotniaki, bakterie, macierze białkowe)



METODY ALTERNATYWNE

Zasada akceptacji danych z innych państw uzyskanych w wyniku procedur uznawanych przez prawodawstwo Unii

ECVAM - Unijne laboratorium referencyjne (Załącznik VII)

Obowiązki państw członkowskich wspierania komisji, wskazania specjalistycznych laboratoriów oraz propagowania informacji (**krajowy punkt kontaktowy** do porad w sprawie metod alternatywnych zgłoszonych do walidacji)

Badanie toksyczności ostrej-doustnej

Toksyczność ostra- objawy w krótkim czasie po podaniu ksenobiotyku

LD₅₀ – medialna dawka śmiertelna powodująca śmierć 50% zwierząt użytych w doświadczeniu

- Przed badaniem zwierzętom nie podaje się pokarmu 12-18 h
 - Badaną substancję podaje się zwierzętom głębokim do żołądka
 - Ubić wszystkie zwierzęta
- Metody :Blissa, I



łebnikiem do
la.



Metodyka

Badanie pilotażowe



Grupa kontrolna



Badanie właściwe



Potwierdzenie wyników badań



Klasyfikacja działania toksycznego substancji chemicznej po podaniu dożołądkowym stosowana w krajach Wspólnoty Europejskiej-metodą klasyczną

Zakres LD ₅₀ (mg/kg mc)	Klasa toksyczności
LD ₅₀ <25	Bardzo toksyczna
25<LD ₅₀ <200	Toksyczna
200<LD ₅₀ <2000	Szkodliwa
2000<LD ₅₀	Nieklasyfikowana



Alternatywa: **zastosowanie metod *in vitro* do oceny toksyczności ostrej**

1. Testy cytotoksyczności

Pierwszy etap: określenie cytotoksyczności

IC₅₀ – stężenie hamujące różne parametry w testach cytotoksyczności

Unieśmiertelnione linie komórkowe

Parametry:

- Integralność błony komórkowej

Test wychwyty lub uwalniania barwnika-czerwieni obojętnej

Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej w środowisku zewnątrzkomórkowym



- Zdolność proliferacji komórek

Pomiar całkowitego białka komórkowego

Zdolność tworzenia kolonii

- Zdolność metaboliczna komórek

Ocena funkcji metabolicznej mitochondriów

Drugi etap : ocena potencjalnego działania toksycznego metabolitu badanego związku

- Połączone hodowle hepatocytów ludzkich oraz komórek stosowanych do badań cytotoksyczności podstawowej

Trzeci etap : wykonanie testów na komórkach z narządów krytycznych

- Pomiar parametrów charakterystycznych dla funkcji narządu, a nie podstawowe funkcje życiowe komórki



Badanie ostrego drażniącego/żrącego działania na skórę



Metoda klasyczna:

- Nakładanie dawki substancji na wygoloną skórę

- Na ciele jednego zwierzęcia 3 jednakowe próbki : pierwszą usuwa się po 3 min., drugą po 60 min., trzecią po 4 godz.

- Jeśli brak objawów, kolejne dwa zwierzęta poddaje się 4-godzinnej ekspozycji



Alternatywa :

I etap: ocena działania żrącego/drażniącego na skórę przez analizę zależności: budowa chemiczna-toksyczność

- Za pomocą programów komputerowych

Wynik pozytywny - zaniechanie dalszych badań

- Na podstawie pomiaru pH

Substancje o pH >11,5 lub <2

II etap: badania *in vitro*

- 1) Test oporności elektrycznej za skóry szczura (TER)
- 2) EPISKIN
- 3) EpiDerm
- 4) CORROSITEX



SIFT (mouse skin integrity function test)- metoda z zastosowaniem wycinków skóry myszy- do badania działania drażniącego



Test na tolerancję błony śluzowej (Draize-Test)



- ▶ Dla wykonania tego testu zakrapla się i wciera aparat do oka królika. Ponieważ króliki nie wydzielają płynu łzowego, substancja testowana pozostaje w oku zwierzęcia w skondensowanej formie min. przez 24 godziny.
- ▶ Skutkami tego testu mogą być silne zapalenie spojówek lub nawet całkowite zniszczenie oka.

Alternatywa

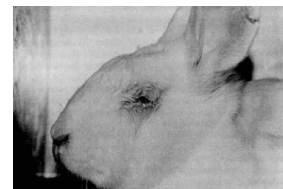


- ▶ Dziesięć lat temu kilkoro badaczy zamiast na oczach żywych królików zaczęło przeprowadzać go na **świeżych gałkach ocznych pozyskiwanych z rzeźni.**
- ▶ Choć może niezbyt estetyczna, metoda ta w oczywisty sposób **eliminowała zarówno ból, jak i użycie dodatkowych zwierząt.**
- ▶ Obecnie tego rodzaju badania przeprowadza się coraz częściej już nie na rogówce, ale na **delikatnej błonie oddzielającej w kurzym jajku żółtko od białka** ("test kurzego jaja.")
- ▶ Także do badań na tolerancję błony śluzowej stworzono odpowiedni sztuczny system o nazwie "EYETEX".



Badanie ostrego działania drażniącego lub uszkodzającego oko

- Podanie ksenobiotyku do worka spojówkowego lub aerozole
- Na jednym zwierzęciu, ale jeśli brak jednoznacznych wyników- dodatkowe dwa
- Uszkodzenie rogówki, tęczówki i spojówki ocenia się punktowo korzystając z odpowiednich tabel



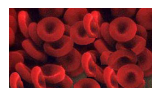
Alternatywa:

- I) Próby przewidywania właściwości toksycznych substancji na podstawie budowy chemicznej i właściwości fizykochemicznych
- II) Testy *in vitro*:
 - **BCOP** (Bovine Corneal Opacity and Permeability) – badanie zmętnienia i przepuszczalności wyizolowanej rogówki oka wołowego
 - **HET-CAM** (Hen's Egg – Chorioallantoic Membrane) - z zastosowaniem zarodka jaja kurzego, w którym bada się uszkodzenie błony kosmówkowo - omoczniowej
 - **ICE** (Isolated Chicken Eye) i **IRE** (Isolated Rabbit Eye) – obrzęk i zmętnienie rogówki oka oraz retencja fluoresceiny



- **NRR** (Neutral Red Release) – pomiar stężenia czerwieni obojętnej uwolnionej z fibroblastów rogówki królika lub ludzkich keratynocytów na skutek uszkodzenia błon komórkowych

- **RBC** – test hemolizy czerwonych krwinek, bada się uszkodzenie błon czerwonych krwinek z krwi cielęcej



Ocena genotoksyczności

Zdolność związków chemicznych do wywoływania mutacji

- Mutacja w komórce rozrodczej → zmiany przekazane potomstwu
- W komórce somatycznej → proces nowotworowy
- Można wykazywać związki prowadzące do kancerogenezy przez uszkodzenie DNA
- Ponad 100 testów stosowanych do oceny genotoksyczności
- Różne organizmy: bakterie, grzyby, rośliny, ssaki, owady oraz hodowle tkankowe *in vitro*

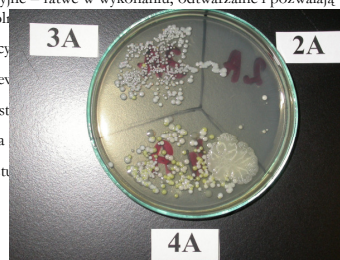


Badania Amesa:

Testy bakteryjne – łatwe w wykonaniu, odtwarzalne i pozwalają wiarygodnie wykazać zdolność do wywołania mutacji

Czynniki decydujące o wyniku:

- Typ spodziewanej mutacji
- Przyszłe zastosowanie
- Oczekiwana mutagenność
- Wartość testu w badaniach genotoksycznych



1. Badania mutacji genowych

- Test mutacji powrotnych u *Salmonella typhimurium*

Ocena siły mutagenności związku przez ilość rewertantów

- Badania mutacji genowych w komórkach ssaków *in vitro*

Na specjalnych liniach komórek, np. chłoniaka myszy lub komórki jajnika (CHO) i płuc (U79) chomika chińskiego

Komórki traktowane substancją indukującą śmierć – jeśli wystąpiła mutacja komórki przeżywają

2. Badania uszkodzeń DNA

- Uszkodzenie DNA oraz naprawa/nieplanowana synteza DNA w komórkach ssaków *in vitro*

Odbudowa uszkodzonego fragmentu DNA z włączeniem tymidyny znakowanej trytem



Wady:

- Uzyskiwanie błędnych wyników w *in vitro*
- Porównanie wyników badań *in vitro* i *in vivo* od różnych gatunków

Zalety:

- Skrócenie czasu badań
- Zmniejszenie liczby zwierząt
- Zmniejszenie liczby substancji przeznaczonych do badania



DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH – CZY ZAWSZE KONIECZNE?

Dzięki nim:

- ▶ wynaleziono szczepionki przeciwko wielu groźnym chorobom, takim jak wścieklizna, polio, odra, świnka, różyczka i gruźlica.

- ▶ Przeciwnicy testów na zwierzętach twierdzą, że mogą one prowadzić w ślełą uliczkę, ponieważ **reakcja organizmu zwierzęcia na lek może być całkowicie różna od reakcji organizmu ludzkiego.**

- ▶ Inne metody nie są wystarczająco zaawansowane, by mogły zadziałać



- ▶ Istnieją **skuteczne** metody alternatywne, które pozwalają na uzyskiwanie równie wiarygodnych lub nawet lepszych wyników



Test na podrażnienie skóry

- ▶ Ostrzyżone, częściowo okaleczone partie skóry poddaje się działaniu testowanych substancji. Mogą przy tym wystąpić podrażnienia skóry, zapalenia i egzemy.
- ▶ Zarówno dla testu na tolerancję błony śluzowej, jak i dla testu na podrażnienia skóry zwierzęta są trzymane w zamknięciach w specjalnych klatkach, albo "zabezpieczane" specjalnymi opatrunkami lub obrożami uniemożliwiającymi lizanie i drapanie ran.



Alternatywa

- ▶ Tolerancja skóry może być zbadana testem "SKINTEX", sztucznym systemem, który pozoruje budowę i funkcjonowanie ludzkiej skóry



Alternatywa DLA BADAŃ INWAZYJNYCH

- ▶ Zmniejszenie liczby zwierząt można osiągnąć, stosując **nieinwazyjne techniki obrazowania** takie jak w medycynie klinicznej, np. **prześwietlenia rentgenowskie, magnetyczny rezonans jądrowy czy emisyjną tomografię pozytonową.**



- ▶ Pozwalają one systematycznie śledzić zmiany stanu narządów za życia zwierzęcia, podczas gdy tradycyjna procedura polega na podaniu badanej substancji dużej grupie zwierząt i zabijaniu kolejnych osobników w określonych odstępach czasu, by ocenić na przykład stan wątroby.
- ▶ Dzięki zastosowaniu technik obrazowania uzyskuje się spójniejsze dane, a liczba testowanych zwierząt zmniejsza o prawie 80%.

Redukcja ilości zwierząt

- ▶ Opracowanie statystyczne minimalnych grup w zależności od rodzaju doświadczenia
- ▶ Używanie sprawdzonych metod badawczych
- ▶ Przygotowanie odpowiednich jałowych instrumentów medycznych do operacji chirurgicznych
- ▶ Praca ze sprawdzonym personelem
- ▶ Zaufanie do obsługi w zwierzętarni
- ▶ Dostosowanie żywienia do potrzeb eksperymentu

Wykorzystanie telemetrii także prowadzi do redukcji ilości używanych zwierząt.



System telemetryczny Stellar - opis

producent: TSE Systems



System telemetryczny do zdalnego badania ciśnienia krwi, EKG, EEG, EMG i temperatury podczas praktycznie każdego eksperymentu in vivo. Pomiar z odległości aż 10 m. Możliwość jednoczesnego pomiaru u 256 000 zwierząt za pomocą jednego odbiornika rejestrującego parametry fizjologiczne.

System telemetryczny Stellar - opis

System telemetryczny Stellar jest wykorzystywany we wszystkich badaniach, w których rejestruje się takie parametry jak:

- temperatura (wnętrze ciała, mózgu, ogona, łuszczy brunatnego itp.)
- aktywność
- ciśnienie krwi
- objętość oddechowa
- tętno serca
- elektrokardiogram EKG
- elektroencefalogram EEG
- elektromiogram EMG
- elektrokulogram EOG

System pozwala na monitorowanie do 256 000 zwierząt za pomocą jednego (1) odbiornika. Dzięki temu daje on badaczom możliwość na wykonanie każdego studium grupowych w klatkach bitytowych i monitorowania zwierząt bez potrzeby instalacji indywidualnych platform pomiarowych pod każdą klatką.



REDUKCJA ILOŚCI ZWIERZĄT ALE TAKŻE UDOSKONALENIE METODY

-wybór zwierzęcia

Gatunek zwierzęcia o słabej wrażliwości i świadomości-o wrażliwości i inteligencji

-Prawdopodobny ból związany z badaniem

-Długość trwania dyskomfortu

-Długość eksperymentu w stosunku do długości życia zwierzęcia

-Liczba gatunków w badaniu

-Warunki życia zwierząt doświadczalnych

Muszą być spełnione pewne standardy utrzymania



Przemyślany dobór szczepu lub stada zwierząt

- ▶ Stada niekrewniacze outbred zapis w nazwie :
- ▶ Stada krewniacze inbred zapis w nazwie \
- ▶ Łatwiejsze przyjęcie doniesienia do druku przy zastosowaniu ogólnie przyjętych modeli zwierzęcych.

 Atymiczna mysz NUDE producent: Charles River Laboratories Model do badań biologii guzów nowotworowych i przeszczepów ksenograftowych. Nie wykazuje komórek T układu odpornościowego. + do zapytania	 Modele GFP i lucyferazy producent: Charles River Laboratories Razem we współpracy z Charles River i Genoway oferujemy przygotowanie modeli zwierzęcych, z wszczepionymi białkami green fluorescent protein oraz lucyferazą. Wszystkie zwierzę. + do zapytania	 Mysi model miażdżycy AKR producent: Charles River Laboratories Model miażdżycowy, badania raka, badania metaboliczne, otyłość indukowana dietą. + do zapytania
 Mysz 11BHS2 producent: Charles River Laboratories Model transgeniczny do badań hipertrofii serca i zawału serca. + do zapytania	 Mysz 129 Mouse producent: Charles River Laboratories Model do rozwoju modeli transgenicznych/knockout, wykazuje dużą ilość beźmielowych aksonów motoneuronów łęgowych. + do zapytania	 Mysz ApoE producent: The Jackson Laboratory Model do badań układu krążenia (miażdżycy, zaburzenia serca, hipercholesterolemia, hipertriglicerydemia, wady naczyniowe). + do zapytania

 Mysz BALB/c Powszechny, wielofunkcyjny model, rozwój hybridom, produkcja przeciwciał monoklonalnych, choroby zakaźne. + do zapytania	 Mysz BALB/c Nude producent: Charles River Laboratories Model do badania guzów i przeszczepów ksenograftowych. + do zapytania	 Mysz C3H producent: Charles River Laboratories Model do badań onkologicznych, zaburzeń neurologicznych i zwyrodnienia siatkówki, test + do zapytania
 Mysz C57 producent: Charles River Laboratories Uniwersalny, wielofunkcyjny model. Otyłość indukowana dietą, rozwój modeli transgenicznych/knockout, bezpieczny i efektywny model badawczy, immunologia. + do zapytania	 Mysz C57BL/6J JAX producent: The Jackson Laboratory Standardowy i wielofunkcyjny model JAX. Wykorzystywany w badaniach otyłości indukowanej dietą, rozwoju modeli transgenicznych/knockout i immunologii. + do zapytania	 Mysz CBA producent: Charles River Laboratories Model do zastosowania w badaniach rozwoju mózgu, neurochemii i badaniach behawioralnych. + do zapytania

 Mysz CD-1® producent: Charles River Laboratories Powszechny, wielofunkcyjny model, bezpieczny i efektywny. Model chirurgiczny, studia starzenia i ciąży urogennej. + do zapytania	 Mysz CD-1® Nude producent: Charles River Laboratories Model myszy bezgłazkiej, nagiętej - nude do badań biologii guzów i przeszczepów ksenograftowych. + do zapytania	 Mysz Dbidb diabetic JAX producent: The Jackson Laboratory Model badania otyłości i cukrzycy oraz genetyki raka. + do zapytania
 Mysz DBA/2 producent: Charles River Laboratories Bezpieczny i efektywny model badawczy, do zastosowania w badaniach immunologicznych i oddechowych napadów epileptycznych. + do zapytania	 Mysz Fox Chase CB17™ Mouse producent: Charles River Laboratories Model kontroli do myszy SCID. + do zapytania	 Mysz Foxp3 producent: Charles River Laboratories Nomenklatura: C57BL/6J-Foxp3^{tm1Lpy/Crl} Pochożenie: Szczep został utworzony przez naukowców z Sekcji Immunologii w laboratorium Dr. Richarda A. Flavell'a. + do zapytania

 Mysz FVB producent: Charles River Laboratories Model do transgenizacji i rozwoju modeli knockout. + do zapytania	 Mysz GLUT 4 producent: Charles River Laboratories Model o szerokich zastosowaniach w badaniach cukrzycy. + do zapytania	 Mysz HSD11B1 producent: Charles River Laboratories Model regulacji kortyzonu. + do zapytania
 Mysz IL-4 producent: Charles River Laboratories Nomenklatura: B6.129X1-I14m1Lpy/Crl Pochożenie: Szczep został utworzony w laboratorium Prof. Richarda Locksley'a, Wydział Chorób Zakaźnych, University of ... + do zapytania	 Mysz Immortomouse® producent: Charles River Laboratories Nomenklatura: C5A.810-Tg(H2Kb-tsA58)Kio/Crl Zastosowania badawcze: Kraj pochodzenia: Stany Zjednoczone ... + do zapytania	 Mysz LCAT producent: Charles River Laboratories Nomenklatura: C57BL/6J-Tg(Abb-LCAT)1Prl Więcej informacji na stronie Charles River ... + do zapytania

 Model GFP i lucyferazy producent: <i>Charles River Laboratories</i> Razem we współpracy z Charles River i Genoway oferujemy przysposobione model zwierzęcych, z wszczepionymi białkami green fluorescent protein oraz lucyferazą. Wszystkie zwierzę...	 Szczur ApoE nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model badawczy choroby Alzheimer'a z nokautem ApoE. Posiada zserokre zastępowane w badaniach choroby typu II, otyłości, miażdżycy, oporności insulinowej i nadciśnienia.	 Szczur APP nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model z nokautem białka APP do badań choroby Alzheimera, demencji i innych chorób neurodegeneracyjnych.
 Szczur Bcrp Knockout producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: Cr(WU)-Abcdm1Hubr Więcej informacji na stronie Charles River [wejdź] ...	 Szczur Bcrp TGEM® Knockout producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: Cr(WU)-Abcdm1Hubr Więcej informacji na stronie Charles River [wejdź] ...	 Szczur BDIX producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: BDIX/Chrl Hodowla krewnicza Pochodzenie: Szczur wyselekcjonowany w 1937 przez H. Druckery w Berlinie ze szczupku szczurzego o pokryciu złotym i różowym.

 Szczur Bdnf nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model zawiera monoalleliczną delecję genu BDNF. Użyteczny w badaniach Alzheimera, depresji, łuku, rozwoju nerwów, utraty pamięci.	 Szczur Brown Norway producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: BN/Crl Pochodzenie: W 1959 r. Silvers i Billingham rozpoczęli kłótnie brat i siostra z selekcją haplotypu brązowej mutacji w szacie dżokach szczurów utrzymywanych...	 Szczur BSEP nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model z nokautem genu kodującego transporter ABC, kluczowego dla pompy eksportującej sole kwasów żółciowych.
 Szczur Buffalo producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: BUF/Crl Hodowla krewnicza Pochodzenie: W Hoston od 1946 roku z hodowli Buffalo H. Morris (USA). Przeniesione do National Institute...	 Szczur CAR nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model z nokautem genu kodującego CAR, mającego wpływ na indukcję cytotoksyny p450s. Ma zastosowanie w badaniach hepatokarcynogenezy, cholesterolu i metabolizmu leków.	 Szczur CD® IGS producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: Cr(CD) (Sprague Dawley) Hodowla krewnicza Pochodzenie: Użytkowane w 1925 roku przez Roberta W. Dawley z skopanej hybrydowej samicy i samca szczurów Wistar...

 Szczur CFTR nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model z brakiem ekspresji białka CFTR prowadzącym do mukowiscydozy oraz zaburzeń transportu chlorów i białek.	 Szczur Cntnap2 nokaut producent: <i>SAGE Labs</i> Model wykazuje delecję genu Cntnap2 i jest użyteczny w badaniach autyzmu, deficytu komórkowej i plastyczności synaptycznej.	 Szczur Copenhagen producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: COP/Crl Pochodzenie: Rozhodowane w 1921 r. na Columbia University for Cancer Research (USA) przez dr Curtisa. Przeniesione do National Cancer Institute z progi...
 Szczur Cotton, niekremiasty producent: <i>SAGE Labs</i> Model bardzo użyteczny na czynniki infekcyjne pochodzenia ludzkiego. Idealny do badań nad nowymi szczepionkami i terapiami genowymi opartymi o wektory adenowirusowe.	 Szczur Dahl/Salt Sensitive (Dahl/SS) producent: <i>Charles River Laboratories</i> Nomenklatura: SS/JHsdMow/Crl Więcej informacji na stronie Charles River [wejdź] ...	 Szczur DAT-CRE model transportera dopaminy producent: <i>SAGE Labs</i> Model szczur laboratoryjny z ekspresją rekombinacji Cre. Do zastosowań w odgryzieniu, ekspresji i nokautach zrekombinowanych genów oraz w DREADD.

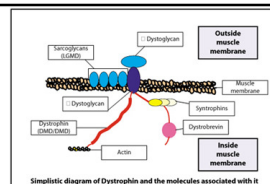


Udoskonalanie modelu zwierzęcego

- metodami i wymaganymi warunkami hodowli zwierząt
- określaniem genotypu i fenotypu
- produkcją nowych modeli do badań biomedycznych

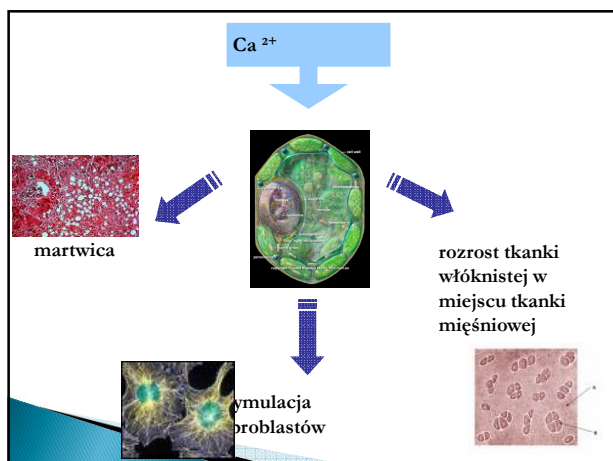
Myszy *mdx*– zwierzęcy model
ludzkiej dystrofii mięśniowej typu
Duchenne’a

ROLA DYSTROFINY:



„uszczelnianie” błony komórkowej

zachowuje selektywną przepuszczalność



- Odkrycie białka **dystrofiny** – identyfikacja zwierząt z podobnymi zaburzeniami



- Zwierzęta z **brakiem** dystrofiny (*mdx*) – myszy, psy, koty, nicianie

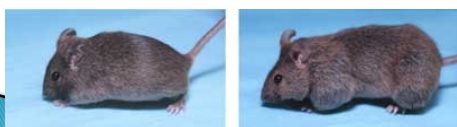


Kierunki badań klinicznych:

Są kluczowym odkryciem w badaniu nad patofizjologią dystrofii

Stanowią użyteczny system badań nad efektywnymi strategiami terapeutycznymi miopatii mięśniowych (Sicinski i wsp. 1989)

Manipulacje na poziomie genu i genomu

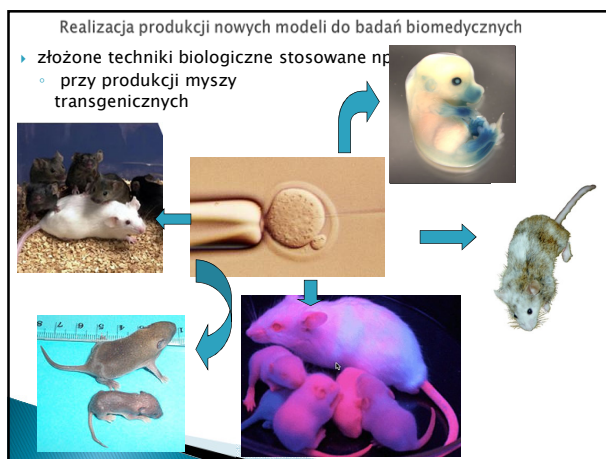
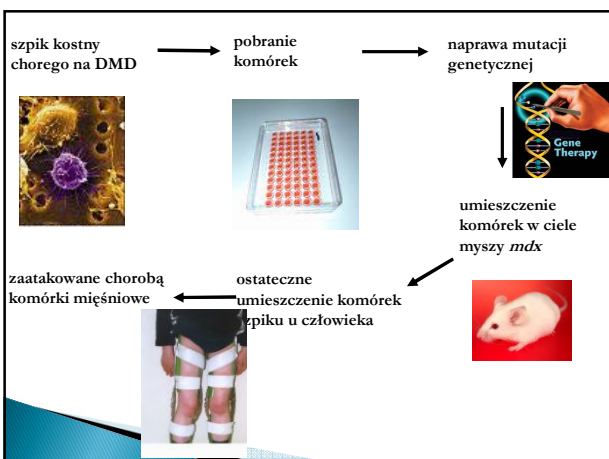
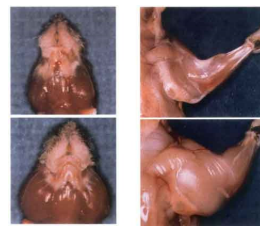


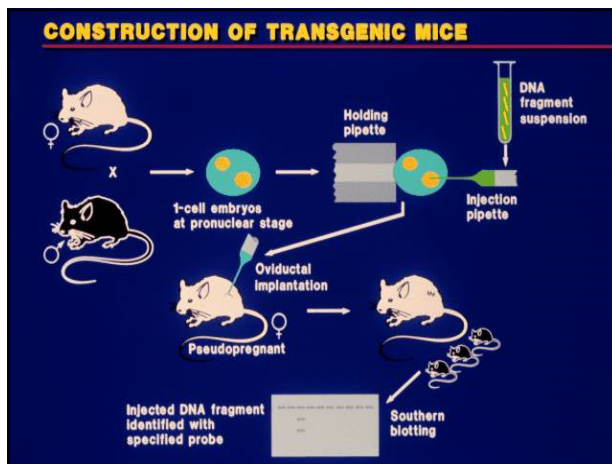
Wykazano że zablokowanie miostatyny za pomocą przeciwciał zwiększa masę i siłę mięśni (Whittemore i wsp. 2003)

Zastosowanie tego samego przeciwciała u myszy dystroficznych (*mdx*) chroniło je przed wystąpieniem objawów chorobowych (Bogdanovich i wsp. 2002)

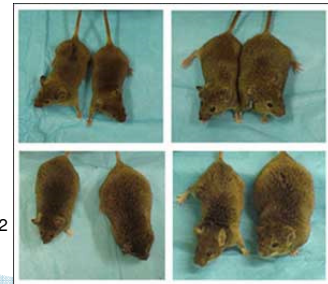
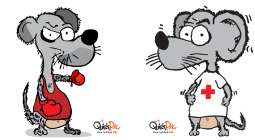
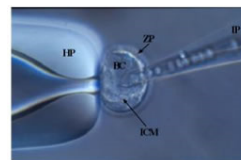
Przy braku miostatyny nastąpiło osłabienie objawów dystrofii

Rozwój teorii „bloku miostatyny” u ludzi – możliwa terapia





► Przy produkcji myszy z nokautem

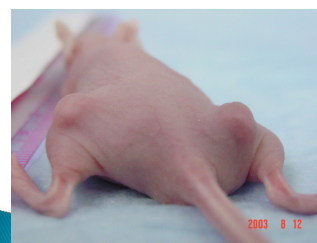


► Mysz normalna i mysz ze znokautowanym genem Nhlh2



► Można również wykorzystać metody utrwalania samoistnych lub indukowanych mutacji i tworzenia tą drogą szczepów koizogenicznych

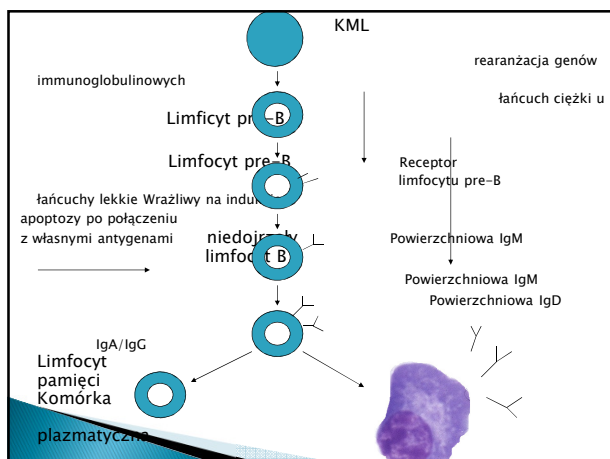
- Większość szczepów myszy z niedoborami immunologicznymi uzyskano właśnie w ten sposób.

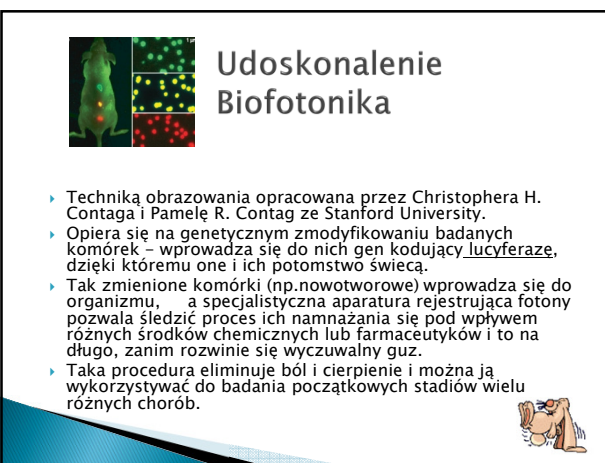
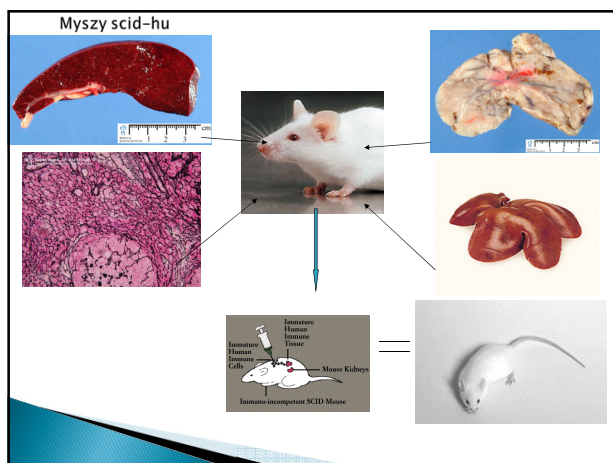


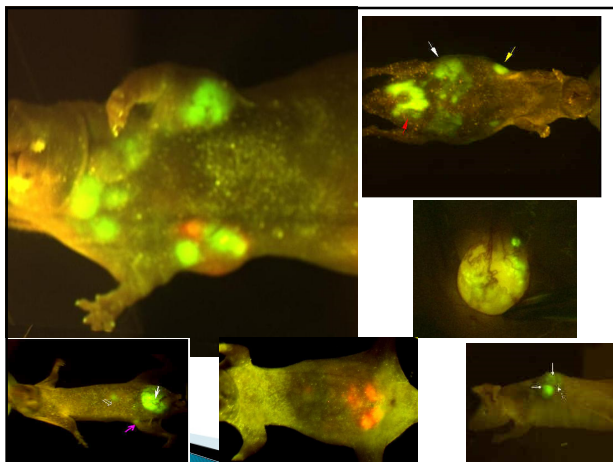


Mutacja scid (*severe combined immunodeficiency*)

- Wzbudziła wielkie zainteresowanie i znalazła szerokie zastosowanie.
- To ostra postać złożonego niedoboru immunologicznego.
- Pojawiła się ona u myszy wsobnych immunologicznego C.B-17/Icr kongenicznych w stosunku do szczepu BALB/cAnIcr pod względem genu Igh (ciężki łańcuch immunoglobulin) znajdującego się na chromosomie 12.
- Wykazano, że zmutowany gen scid sprzężony jest z genem md (mahoganoid) znajdującym się na chromosomie 16.
- Mutacja ta została odkryta przez Mel Bosmę i wsp. w 1980 r. a opisana w 1983 r.

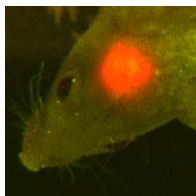






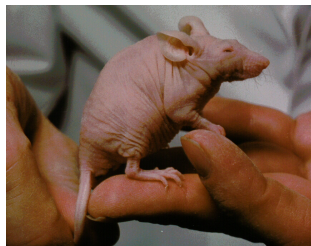
Praca na myszach nu/nu NCr/Sed oraz N:NIH-nu-bg-xid/Sed

- ▶ Autorzy porównywali przeszczepialność wybranego panelu nowotworów człowieka na zwierzętach z obu szczepów i stwierdzili, że była ona podobna u zwierząt z obu szczepów.



Myszy nude

- ▶ Oryginalna mutacja nu pojawiła się w 1962r.
- ▶ Ponownie mutację w tym locus u myszy ze szczepu AKR zaobserwowano i nazwano ją nu^{str} .
- ▶ Utrzymywana jest jako szczep koizogeniczny AKR/J- $nu^{str}/+$.



Dwie linie szczepu wsobnego różniące się jednym zmutowanym genem określane są jako pary koizogeniczne

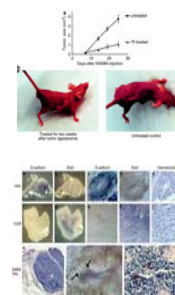
- ▶ limfocyty T u myszy nude są zatrzymane w jednym lub kilku stadiach różnicowania, które normalnie występują podczas limfopoezy u myszy z grasicą.



- ▶ Trzy warunki, które pozwoliłyby uznać myszy bezgrasicze za w pełni użyteczne zwierzęta laboratoryjne:
 - zorganizowanie produkcji na dużą skalę w warunkach SPF,
 - wyhodowanie szeregu linii kongenicznych z mutacją nu u zwierząt reprezentujących różne tło genetyczne,
 - zastosowanie odpowiednich systemów monitorowania do kontroli genetycznej i mikrobiologicznej tych zwierząt.

Komórki ludzkiego czerniaka przeszczepionego na myszy z potrójnym niedoborem immunologicznym BNX(bg/nu/xid)

- ▶ Myszy te wykazują znaczne upośledzenie zdolności odpowiedzi immunologicznej przez komórki T i B oraz przez aktywowane limfokinami komórki cytotoksyczne (LAK)
- ▶ Muszą być utrzymywane w warunkach SPF.



Myszy KSN-bg/bg-nu/nu (KSN-bg),
KSN-xid/xid-nu/nu (KSN-xid) oraz KSN-BNX

- ▶ Noszą wszystkie trzy geny niedoboru immunologicznego
- ▶ Powstały dzięki metodzie wprowadzenia dwóch genów
 - bg (powodującego niedobór aktywności komórek NK)
 - xid (obniżającego produkcję immunoglobulin) na tło genetyczne myszy KSN-nude

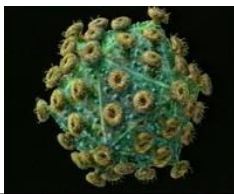
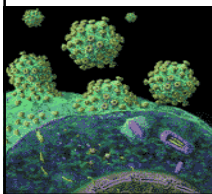


Zjawisko niedoboru immunologicznego w wyniku zakażenia wirusowego

- ▶ Opracowano wykaz właściwości kwalifikujących potencjalny model zwierzęcy do badań nad AIDS:

- indukcja niedoboru immunologicznego przez tzw. lentiwirus
- zastępowanie tych samych genów regulujących co w przypadku HIV-1
- zaskakowanie komórek T CD4 i makrofagów przez wirusa CD4 jako receptora
- indukcja przewlekłej choroby z długim okresem układowania wirusa w komórkach docelowych i powolne obniżanie liczby komórek T CD4
- indukcja klinicznego obrazu choroby podobnego do wywołanego

- ▶ Jeden typ zakażenia myszy retrowirusem typu C został określony jako ten, który powoduje szereg klinicznych objawów charakterystycznych dla AIDS.
- ▶ Został on nazwany mysim AIDS (MAIDS).
- ▶ Myszy C57BL/6 zakażone wirusem MAIDS-określone jako dogodny model doświadczalny.
- ▶ Drugim najczęściej używanym modelem zostały myszy SCID-hu zakażone wirusem HIV-1.



Zupełnie inną metodą doskonalenia jest zastępowanie bardziej rozwiniętych gatunków zwierzątami z niższych szczebli drabiny ewolucyjnej

- ▶ W ostatnich latach do obserwacji wpływu chemicznych na rozwój układu nerwowego wykorzystuje się zwłaszcza rybę, danio pręgowany oraz nicienie *Caenorhabditis elegans*.
- ▶ U obu tych gatunków udało się już ustalić funkcje wszystkich kluczowych genów.
- ▶ Teraz kiedy jakaś substancja chemiczna powoduje włączenie lub wyłączenie danego genu, potrafiamy powiedzieć, jak wpłynie ona na metabolizm komórkowy i produkcję białek.



HODOWLA KOMÓREK

JAKO METODA ALTERNATYWNA

Wypożażenie pracowni

- ▶ Komora z przepływem laminarnym
- ▶ Inkubator
- ▶ Ciepłarka lub łaźnia wodna
- ▶ Autoklaw
- ▶ Sterylizator
- ▶ Lodówka i zamrażarka
- ▶ Termos do przechowywania komórek w ciekłym azocie
- ▶ Wirówki
- ▶ Mikroskop



Wypożażenie pracowni cd.

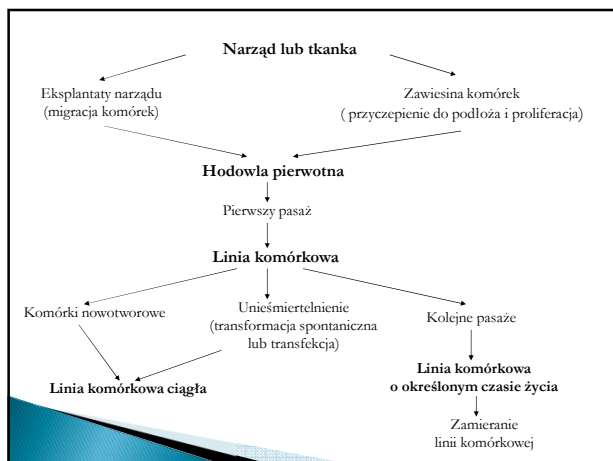
- ▶ Naczynia hodowlane (butelki, szalki, płytki)
- ▶ Falkony
- ▶ Pipetusy
- ▶ Pipety plastikowe
- ▶ Pipety automatyczne
- ▶ Pipety pasterowskie
- ▶ Kamery do liczenia komórek



Typy hodowli komórkowych

- ▶ **Hodowle pierwotne** – wyprowadzone z materiału pobranego bezpośrednio z organizmu
- ▶ **Hodowle wtórne** – wyprowadzone z hodowli pierwotnej po pierwszym pasażu
- ▶ **Ustalone linie komórkowe** – populacje komórek powstające z hodowli wtórnej po wielokrotnych pasażach





Warunki hodowli

- ▶ Utrzymanie ściśle określonych warunków:
 - Temperatura 37°C
 - Stężenie dwutlenku węgla 5%
 - pH 6,8 – 7,2
 - Wilgotność 95%

Pożywki do kultur *in vitro*

- ▶ Sterylne środowisko wzrostu
- ▶ Związki odżywcze: węglowodany, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, peptydy i białka, lipidy i cholesterol, witaminy, mikroelementy
- ▶ Stabilne pH
- ▶ Dodatkowo może zawierać surowicę:
 - ▶ FCS – płodową surowicę bydlęcą
 - ▶ HS – końską surowicę z dorosłego organizmu

Surowica dostarcza czynniki wzrostu i różnicowania komórek (pobudza wzrost lub intensyfikuje różnicowanie), hormony.



- ▶ Pożywkę należy wymieniać co 24-36 h, zależy to od:

- gęstości komórek w hodowli
- tempa ich proliferacji
- metabolizmu komórek

- ▶ W przypadku niedoboru składników odżywczych lub gdy nagromadzi się zbyt duża ilość metabolitów, komórki przestają się dzielić, zmienia się ich morfologia, ulegają wakuolizacji, przybierają okrągły kształt i odklejają się od podłoża
- ▶ Komórki mogą też być hodowane w zawieszynie (w przypadku zbyt dużej gęstości, komórki mogą obumierać co jest spowodowane przez ograniczony dostęp do substancji odżywczych i bioaktywnych, oraz przez nagromadzenie się metabolitów, co powoduje zakwaszenie środowiska)

- ▶ Kiedy hodowla komórkowa staje się konfluentna (komórki pokrywają całą powierzchnię naczynia) należy je przepasażować
- ▶ Do odtrawiania komórek używa się słabego roztworu trypsyny, która powoduje kontrolowane odklejenie się komórek od podłoża, nie naruszając ich struktury komórkowej.
- ▶ Odklejone komórki zawieszają się w medium, zawierającym substancje krioprotekcyjne- DMSO- dimetylosulfotlenek (chroniące komórki przed zniszczeniem w czasie zamrażania) oraz surowicę FBS



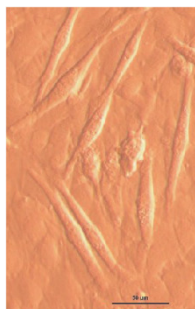
Bankowanie komórek

Bankowanie komórek ma na celu przygotowanie komórek do długotrwałego przechowywania w stanie niezmiennym.

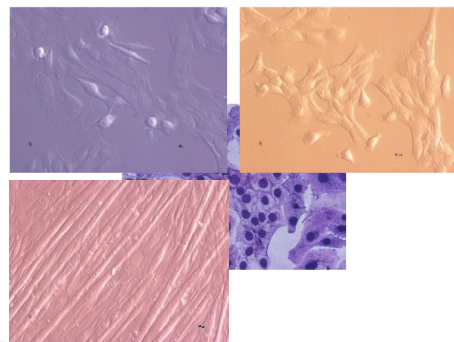
Komórki przechowuje się w ciekłym azocie (temperatura – 196 °C) lub w zamrażarce (temperatura – 80 °C – krótkotrwałe przechowywanie)

Linia komórkowa C2C12

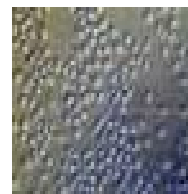
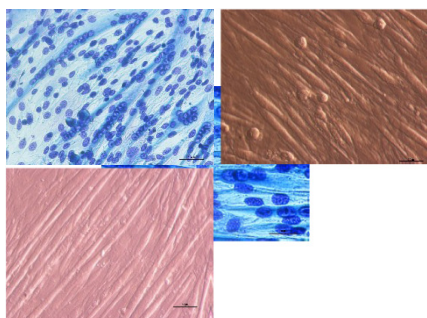
- ▶ Linia komórkowa mioblastów mysich wyprowadzona z mięśnia *soleus*.
- ▶ Model do badania różnicowania komórek *in vitro*.
- ▶ Pożywka:
 - DMEM 4500/10% FBS/AB
 - DMEM 4500/2% HS/AB



Wygląd komórek C2C12



Miotuby



Hodowle tkankowe i narządowe

Cechy komórek linii komórkowych ciągłych

Komórki nowotworowe:

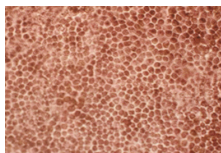
- › Nieograniczona możliwość podziału
- › Zdolność do wzrostu na pożywkach bez surowicy,
- › Zdolność do wzrostu w zawieszinie (możemy osiągnąć dużą gęstość komórek i tym samym wydajność syntezy)
- › Wady glikozylacji, spadek efektywności syntezy
- › Błędy genetyczne prowadzące do zmiany wrażliwości komórek na czynniki zewnętrzne
- › Produkcja czynników wzrostowych, G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) oraz GM-CSF (granulocyte/macrophage – colony stimulating factor), stosowanych w onkologii

Wkład hodowli tkankowych w rozwój nauki

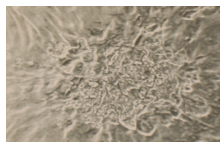
Hodowla tkanek pozwoliła:

- › na wgląd w mechanizm działania przeciwciał, hormonów, enzymów, w procesy wiązania ligandów przez odpowiednie receptory komórkowe
- › na rozwój metod immunocytochemicznych w medycynie i histopatologii
- › na wytwarzanie in vitro produktów komórek endokrynnych (hormon wzrostu)
- › hodowla tkanek dostarcza wielu podstawowych danych o regulacji transkrypcji co znajduje zastosowanie w biotechnologii
- › ma zastosowanie w produkcji szczepionek
- › ma zastosowanie linii komórkowych jako metod alternatywnych w medycynie, onkologii, embriologii, cytogenetyce, biologii komórki, hematologii, mikrobiologii oraz wirusologii
- › mieć nadzieję na implantowanie „naprawionych” komórek własnych pacjenta

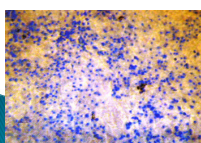
Hodowle komórek śródbłonki rogówki



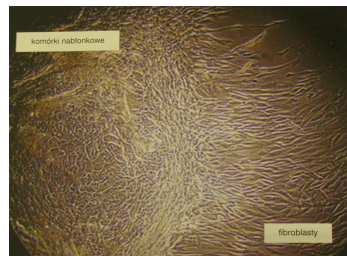
Zdrowy śródbłonek 30-letniego dawcy
do hodowli;



Grupa proliferujących komórek śródbłonki



Rozległe warstwy śródbłonki 75 letniego dawcy.
Granatowo są zabarwione martwe komórki.
(błękit tryptofanu)



Hodowla 14-dniowa, widać infiltrację fibroblastów w obszar zajęty przez komórki nabłonkowe

Zalety i wady hodowli tkanek



Hodowla tkanek zapewnia:

- › Utrzymanie warunków na stałym poziomie
- › Możliwość bezpośredniego eksperymentowania na komórkach
- › Możliwość badania funkcji i reaktywności poszczególnych typów komórek budujących tkanki i narządy
- › Możliwość bezpośredniego badania interakcji poszczególnych typów komórek w tkankach i narządach
- › Powtarzalność wyników
- › Mniejszy koszt badań



Do ograniczeń hodowli tkanek należą:

- › Konieczność utrzymania ścisłej aseptyki
- › Hodowla tkanek jest systemem znacznie upraszczającym naturalne środowisko
- › Masowe namnażanie komórek pociąga za sobą duże koszty
- › Niestabilność linii ciągłych wynikająca z aneuploidalnego składu chromosomów

Hodowla narządowa (Organ culture)

- › Hodowanie małych narządów w całości lub wycinki większych oraz fragmenty tkanek
- › Wprowadzenie terminu 1 jednostki mysiej, czyli ilości ekstraktu zdolnej wywołać reakcję biologiczną
- › Zaletą hodowli tkankowych jest zachowanie in vitro integralności strukturalnej narządu, z interakcjami komórkowymi i zróżnicowaniem biochemicznym histologicznym i czynnościowym

Prowadzenie hodowli narządowej

- ▶ Bogata pożywka płynna (medium Waymouth i medium Trowella)
- ▶ Istotna jest wielkość narządu bądź eksplantatu
- ▶ Odpowiednia obróbka histologiczna narządu
- ▶ Narząd powinien być płaski ze względu na penetrację tlenu do komórek, transport glukozy i odprowadzanie produktów katabolizmu
- ▶ Najlepszymi narządami do hodowli tkankowych są:
 - gruczoł mlekowy myszy
 - przepona
 - krezka
 - wyizolowana osłonka przejrzysta pęcherzyka jajnikowego



Obecnie hodowle tkankowe przeżywa fazę specjalizacji, której wynikiem jest m.in. Inżynieria tkankowa zajmująca się konstruowaniem modeli tkankowych i narządowych. Rozwój w tym kierunku odpowiada na wyzwania transplantologii, klonowania zwierząt i na wezwania obrońców praw zwierząt, którzy domagają się modeli *in vitro*, zastępujących żywe zwierzęta w testach diagnostycznych w medycynie i toksykologii

- ▶ Przeciwnicy badań na zwierzętach najbardziej zdecydowanie potępiają jednak fakt, że wciąż są one wykorzystywane do testowania środków czystości, a nie tylko do celów medycznych.



Oprócz argumentów naukowych przemawiających za i przeciw testom na zwierzętach, istnieje jeszcze moralny aspekt problemu.

- ▶ Obrońcy badań uważają, że życie ludzkie jest warte więcej niż życie zwierzęcia, a prawo chroni zwierzęta laboratoryjne przed okrucieństwem i znęcaniem się.
- ▶ Miliony zwierząt są zabijane na pożywienie każdego roku, a badania medyczne, które budzą tyle emocji, racjonalnie rzecz biorąc wydają się być bardziej usprawiedliwione.
- ▶ W końcu – argumentują zwolennicy badań na zwierzętach – laboratoryjne myszy rzadko doświadczają jakiegokolwiek bólu, ponieważ są zabijane, zanim zaczną cierpieć.

- ▶ **W Polsce** doświadczeniom poddaje się kilkaset tysięcy kręgowców rocznie
- ▶ Jeszcze 10 lat temu takie eksperymenty prowadzono praktycznie bez żadnej kontroli, jeśli pominąć kilka najlepszych instytucji, które z własnej inicjatywy ustawiły wewnętrzne komisje etyczne.

W przyszłości...

- ▶ Możliwe jednak, że ostateczna eliminacja żywych zwierząt z badań nastąpi wcale nie dzięki metodom in vitro, lecz raczej **"in silico"** – przemysł farmaceutyczny już dziś wykorzystuje komputerowe modele interakcji różnych układów do analizy aktywności leków.
- ▶ Charles DeLisi z Boston University i inni poszukują wsparcia dla programu Virtual Human Project, futurystycznego przedsięwzięcia z dziedziny obliczeń rozproszonych, zakrojonego na skalę Projektu Poznania Ludzkiego Genomu.
- ▶ **Być może więc któregoś dnia na pytania o szkodliwość fizyczną, chemiczną i biologiczną zamiast zwierząt będzie odpowiadać wirtualny człowiek.**



- ▶ **Firmy, które nie testują swoich produktów na zwierzętach:**

Avon, Biokosma, Biotop, Beauty Without Cruelty, Bodyline, Butterfly, Chanel, Davidoff, Eris, Femi, Flex, Freeman, L'oreal, Oriflame, Pollena-Uroda, San Francisco, Weleda, Wella.

- ▶ **Firmy, które testują swoje produkty, bądź ich składniki na zwierzętach:**

BAYER (leki), Benckiser (Coty – Adidas, Crossmen, Miss Sporty), Biotherm, **COLGATE-PALMOLIVE**, **GILLETTE**, **HENKEL** (Fa), **JOHNSON&JOHNSON**, L&M, Maestro, Malboro, **PROCTER&GAMBLE** (Old Spice, Secret, Pampers, Head&Shoulders, Always, Tampax, Ariel, Oxydol, Clearasil, Max Factor), Rexona, Signal, Vichy.

Dziękuję za uwagę!