

Experimentální modely

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD

Babákova myelomová skupina

ÚPF LF

Historie

- ▶ 2 st. n.l. Galen - pokusy na prasatech a primátech
- ▶ 1242 Ibn Al-Nafis- cirkulace krve u savců
- ▶ 18. století Lavoisier – morče – respirace
- ▶ 1880- Pasteur – antrax ovcím
- ▶ 1890- Pavlov a psi
- ▶ 1880- Emil von Behring – záškrť – izolace a pokusy na morčatech
- ▶ 1943- izolace streptomycinu z půdy a Feldman- léčba morčat
- ▶ 1940- Salk a identifikace viru obrny a vakcína v roce 1955

Historie II

- ▶ **1789 J. Bentham – první hnutí proti pokusům na zvířatech**
- ▶ 1822 – v GB zákon na ochranu zvířat
- ▶ 1876 – zákon na testování zvířat

Experimentální modely

- ▶ Zjednodušení reálného života
- ▶ Studium specifických otázek
- ▶ Dostupné kdekoliv (ATCC)
- ▶ Možnost opakování
 - ▶ Opakování pokusu
 - ▶ Opakování na více geneticky stejných jedincích
 - ▶ Opakování v jiné laboratoři, jiné zemi

Experimentální model

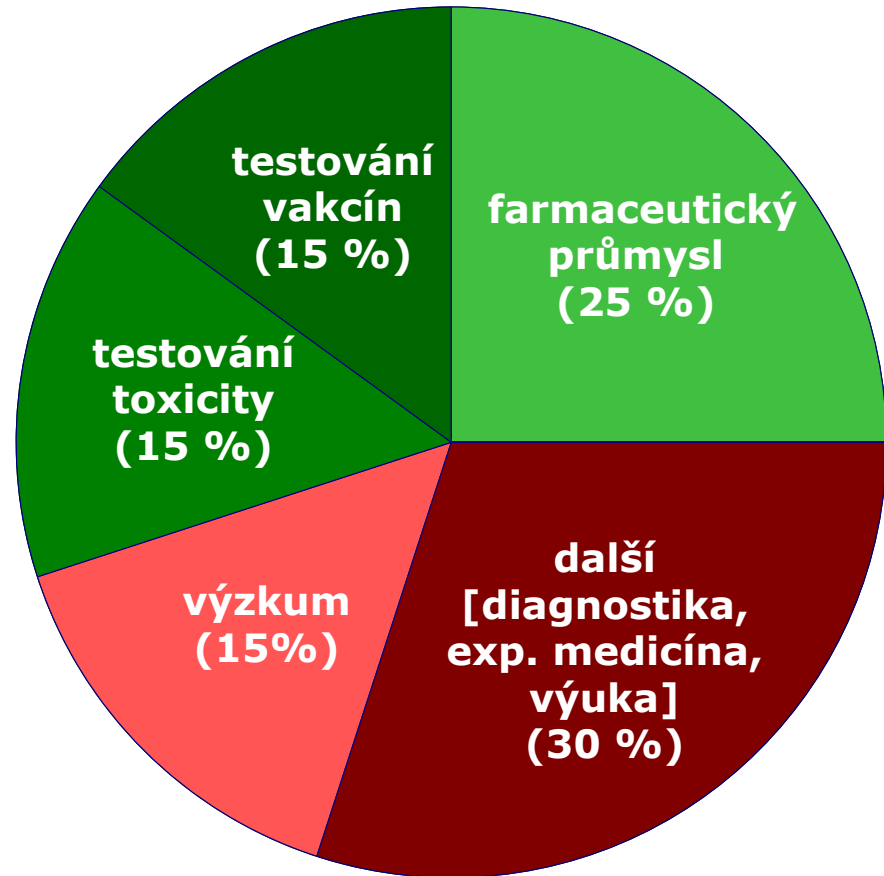
- ▶ Jasná definice
- ▶ Snadno dostupný
- ▶ Snadno udržovatelný
- ▶ Pro popis obecnějších jevů
- ▶ Krátký životní cyklus
- ▶ Větší počet potomstva
- ▶ Etické problémy

Obvyklé druhy laboratorních zvířat

- ▶ Bezobratlí
 - ▶ *Saccharomyces cerevisiae*
 - ▶ *Drosophila melanogaster*
 - ▶ *Caenorhabditis elegans*
 - ▶ *Danio rerio*
- ▶ Obratlovci
 - ▶ myš laboratorní (*Mus musculus* var.)
 - ▶ potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*)
 - ▶ morče domácí (*Cavia porcellus*)
 - ▶ křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*)
 - ▶ králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*)
 - ▶ pes domácí (*Canis familiaris*)
 - ▶ kočka domácí (*Felis catus*)
 - ▶ křepelka obecná (*Coturnix coturnix*)
 - ▶ primáti (*Macacus rhesus*)

Množství „spotřebovaných“ zvířat

- ▶ celosvětově
 - ▶ ~50 mil./rok
- ▶ Evropa
 - ▶ ~12 mil./rok



Kontroverze – použití zvířat

▶ pro

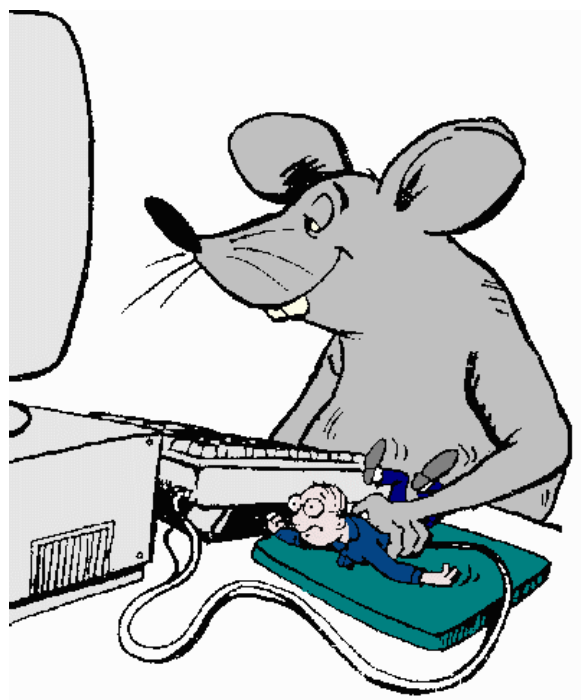
- ▶ většina pokroků v medicíně 20. – 21. století
- ▶ jsme jejich konzumenti
- ▶ lidé mají vůči sobě morální a etické závazky, které nemají vůči zvířatům

▶ proti

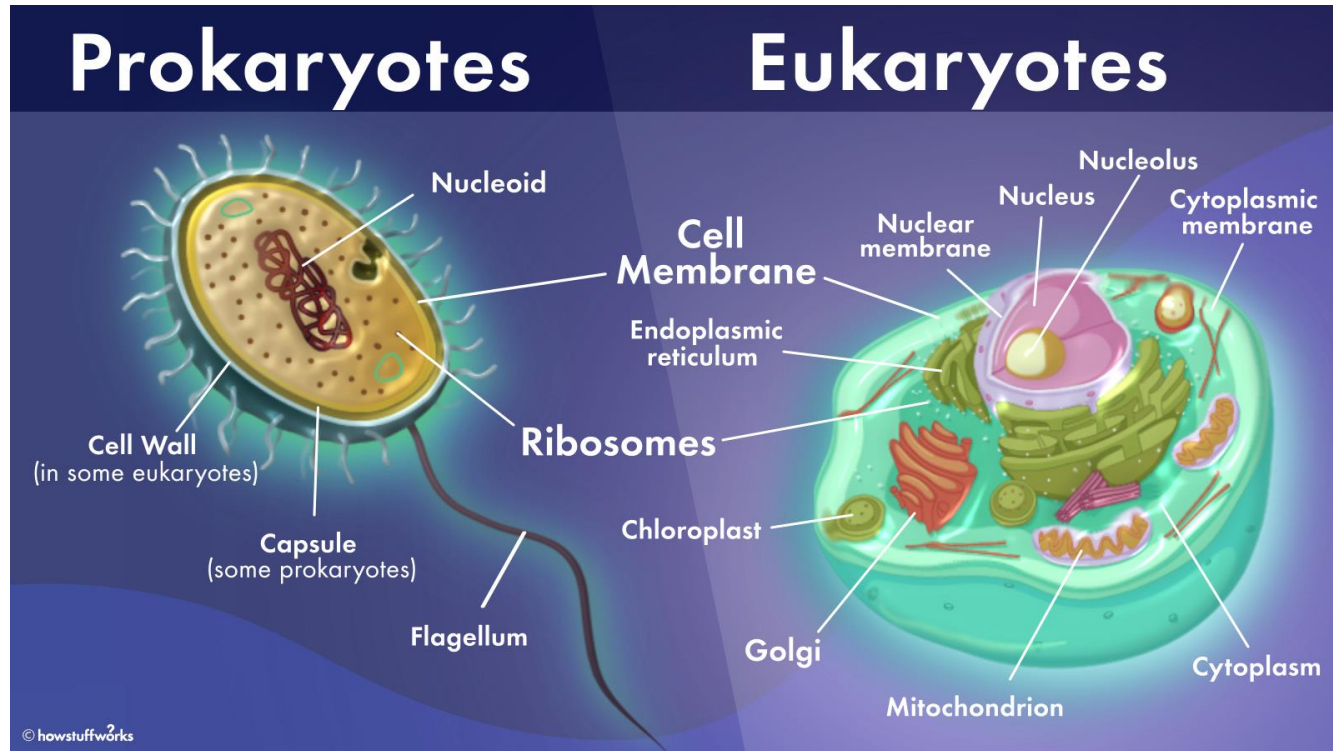
- ▶ kruté a neodůvodnitelné i přes to, že z výzkumu profituje člověk (mohlo by se experimentovat na člověku)
- ▶ zvíře nemůže dát souhlas
- ▶ všechny živé organizmy vč. Homo sapiens mají stejná práva

Regulace používání lab. zvířat

- ▶ Zákon na ochranu zvířat 246/1992 Sb. 162/1993 Sb. 167/1993 Sb. 77/2004 Sb.
- ▶ Ústřední komise na ochranu zvířat (ÚKOZ)
- ▶ Odborné komise při uživatelském zařízení
- ▶ Oprávnění dle §17 zákona 246/1992 Sb.
- ▶ autoregulace

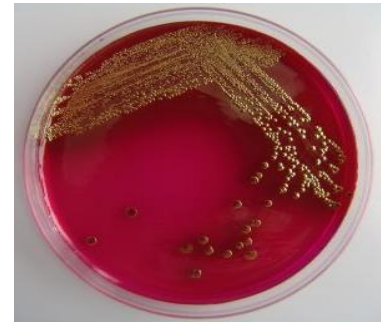


Prokaryota vs eukaryota



Escherichia coli

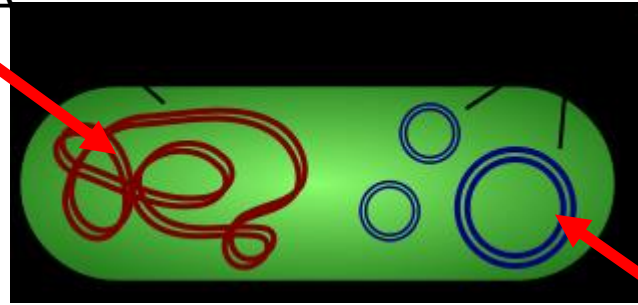
- ▶ Gram negativní bakterie
- ▶ V trávícím traktu
- ▶ Genom sekvenován (1997)
- ▶ Snadno rostou na definovaném médiu, resistance k antibiotikům
- ▶ Studium replikace, genové exprese, syntéza proteinů
- ▶ Plazmidy, proteiny



Plasmidy

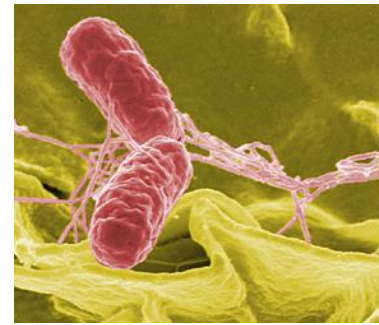
- ▶ Malé kruhové DNA
- ▶ Možnost jejich namnožení v bakteriích
- ▶ Nesou gen pro resistenci k antibiotiku (selekce)
- ▶ Použití v genovém inženýrství
- ▶ Izolace pomocí kolonek

Bakteriální DNA



plasmid

Salmonella typhimorium



- ▶ Používána pro Amesův test
- ▶ Screening mutagenního potenciálu genotoxických chemických látek
- ▶ Hodnocení biotransformačních produktů z krve a moči

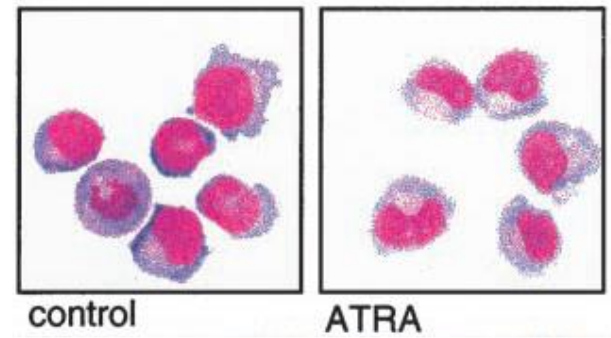
- ▶ Enzymy excizní reparace
- ▶ Zvýšená permeabilita
- ▶ Zvýšená citlivost k mutagenním látkám

Tkáňové kultury

- ▶ Primární (přímo z těla)
- ▶ Sekundární (buněčné linie)
- ▶ Hlavně sekundární
 - ▶ snadno se pěstují
 - ▶ velké množství
 - ▶ uniformní – proliferace, diferenciace, apoptóza, moderní metody
 - ▶ optimalizace metod
- ▶ Testování různých látek
- ▶ Velké množství kultur – 10% CO₂, médium, sérum, antibiotika, ...přesně definované podmínky
- ▶ Lidské, myší, krysí...

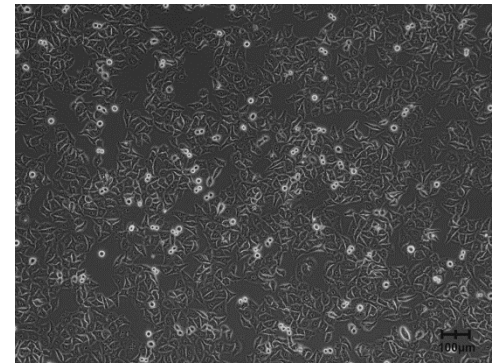
NB4 buněčná linie

- ▶ t(15, 17) – APL
- ▶ APL akutní promyelocytární leukemie
- ▶ Diferencují do granulocytů pomocí ATRA
- ▶ ATCC (American tissue and cell collection) – sbírka linií, mikroorganismů
- ▶ 1989 izolována z 23-leté ženy s APL



HeLa buňky

- ▶ Buňky cervikálního karcinomu, 1957
- ▶ Henrietta Lacks, zemřela na karcinom
- ▶ Linie vytvořena bez souhlasu pacientky a nebyla anonymizována – začátek hnutí
- ▶ Dr. Salk linii použil k testům obrny
- ▶ 21.4.2023 – 120 096 studií na této linii



Eukaryontní modely

- ▶ Kvasinky
- ▶ *Drosophila melanogaster*
- ▶ *Caenorhabditis elegans*
- ▶ *Arabidopsis thaliana*
- ▶ *Danio rerio*
- ▶ *Mus musculus*
- ▶ *Oryctolagus cuniculus domesticus*

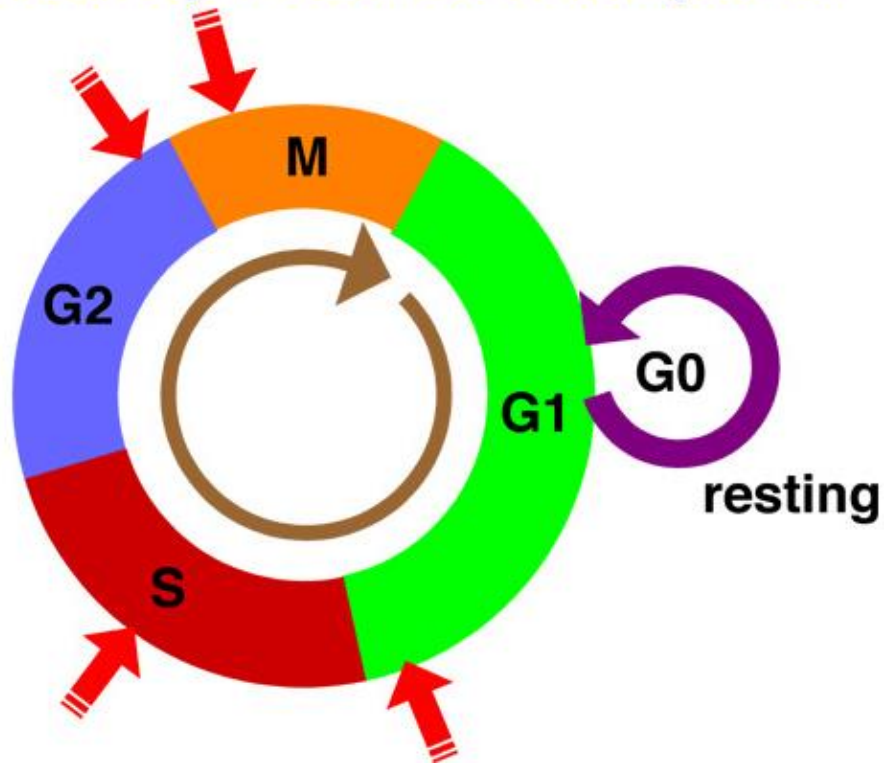
Saccharomyces cerevisiae



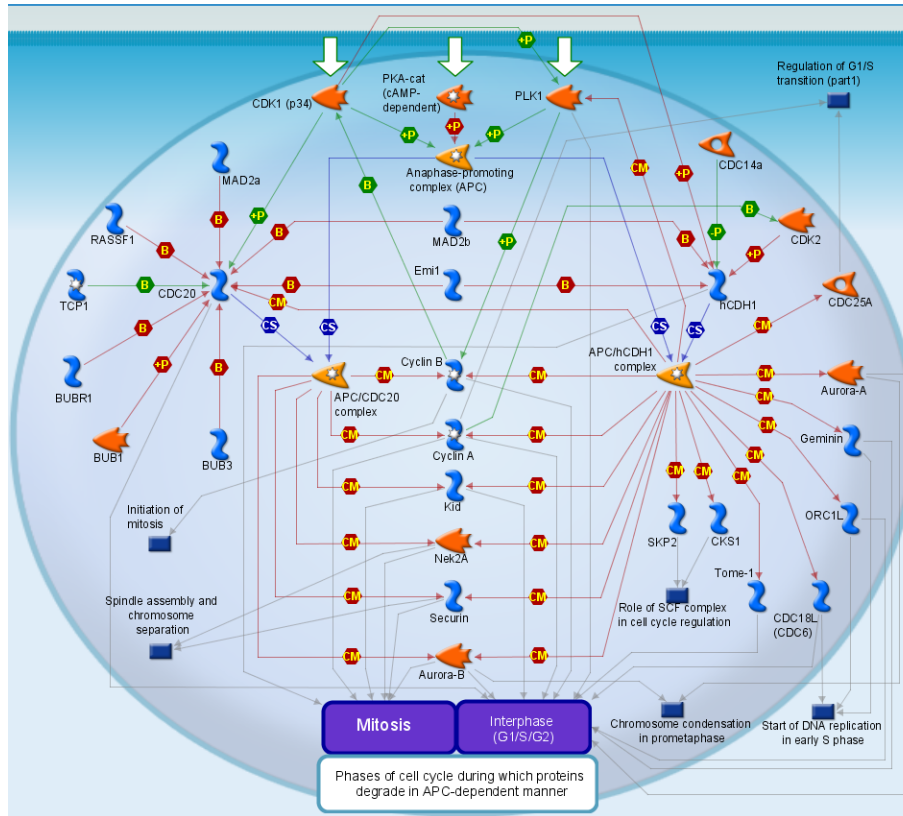
- ▶ První osekvenovaný eukaryontní organismus
- ▶ Roste na speciálních definovaných půdách
- ▶ Studium
 - ▶ buněčného cyklu
 - ▶ signálních drah
 - ▶ opravy DNA
 - ▶ replikace DNA
 - ▶ RNA procesy
- ▶ 136 719 článků na pubmed
- ▶ Jednohybridový a dvouhybridový screening (interakce DNA-protein, protein-protein)

Buněčný cyklus

The Cell Cycle and the Checkpoints



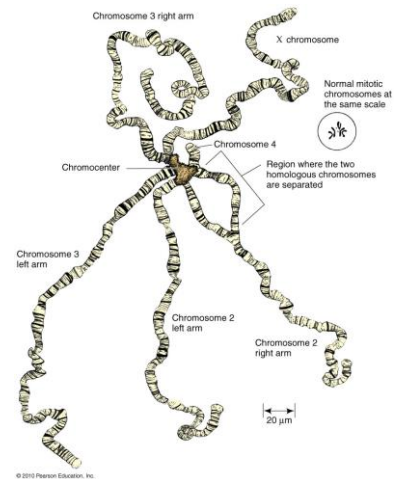
Buněčný cyklus - doopravdy



Drosophila melanogaster



- ▶ Studium genetiky a vývojové biologie
- ▶ Malá, snadno se chová, hodně potomstva, krátký životní cyklus
- ▶ Jen 4 páry velkých polytenních chromozomů
- ▶ Genom osekvenován
- ▶ Velká homologie genů (sekvence lidských a mušičích genů velmi podobný)
- ▶ Wing spot test- chemická látka v potravě, inhalačně, akutně, chronicky
- ▶ Morgan 1933 Nobelova cena

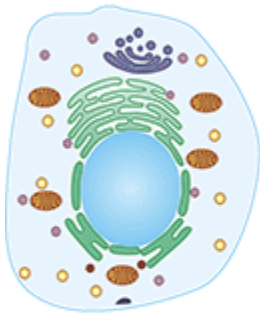


Caenorhabditis elegans

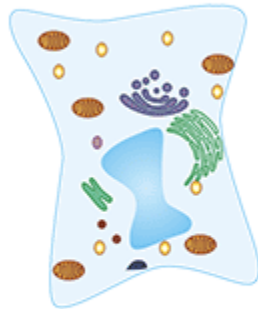


- ▶ 1998 sekvence známá
- ▶ Snadno se chová, dá se zamrazit, lehce se rozmnožuje
- ▶ 1031 buněk u dospělého samce
- ▶ 19 000 genů
- ▶ Vývoj, diferenciace, apoptóza
- ▶ 2002- Nobelova cena - Brenner, Horvitz, Sulston za apoptózu
- ▶ 2006-Nobelova cena - Fire, Mello - RNAi
- ▶ 2008-Nobelova cena - Chalfie- GFP

Apoptóza



Normal Cell



Chromatin Condensation

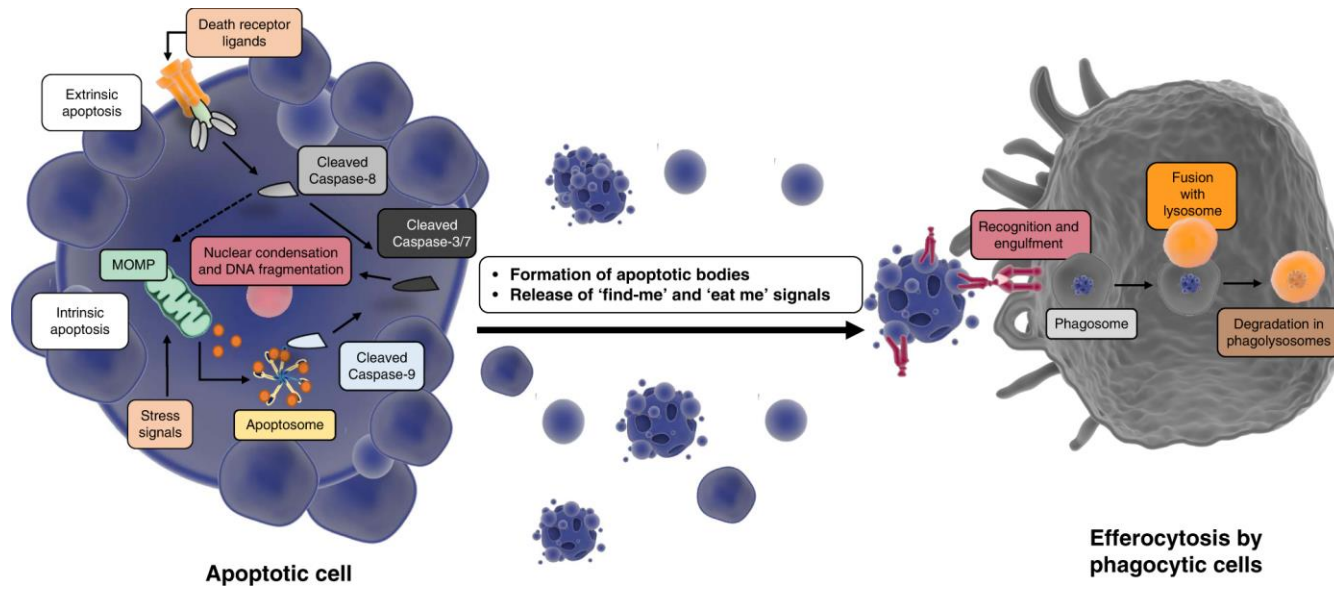


DNA/Nuclear Fragmentation
& Membrane Blebbing



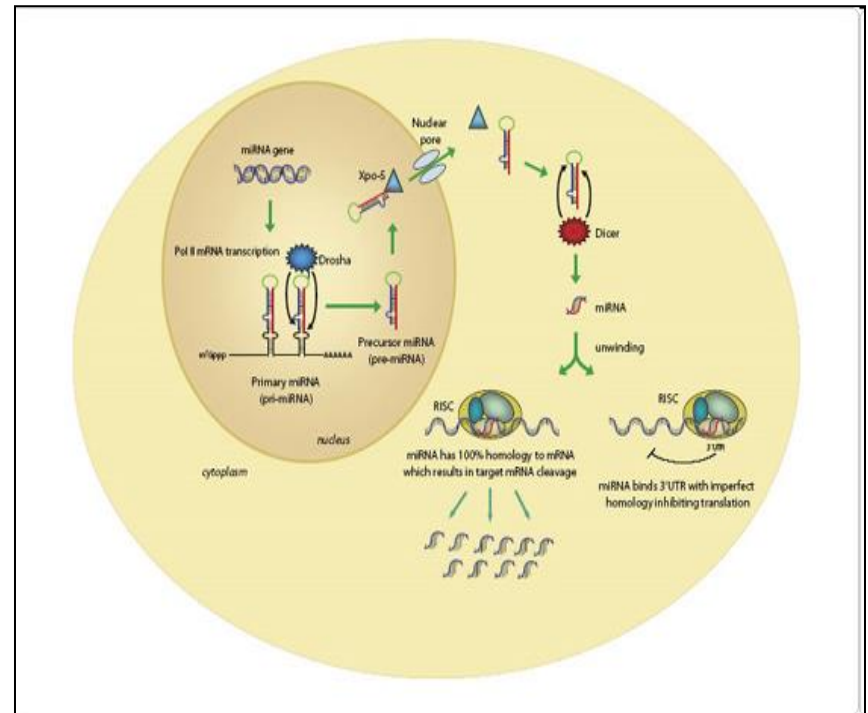
Apoptotic Body

Apoptóza



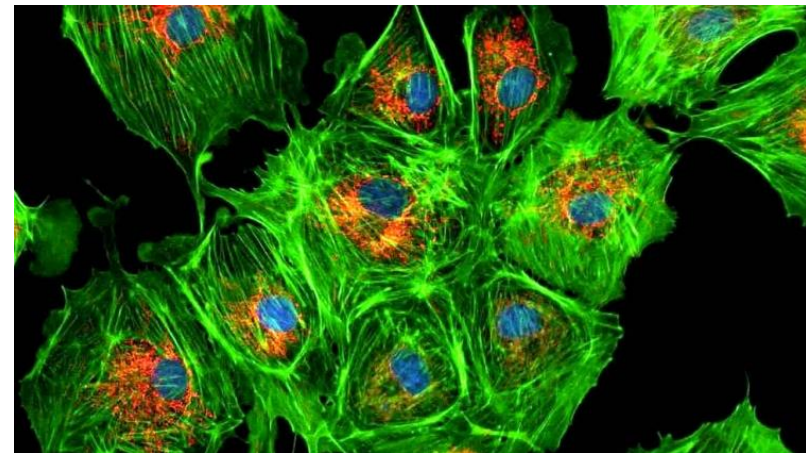
RNA interference

- ▶ Sekvenčně specifické umlčování exprese genů (mRNA nebo i translace)
- ▶ Spouští endogenní RNA (miRNA) i exogenní (siRNA)
- ▶ miRNA důležité ve vývoji, apoptóze i patogenezi nádorů

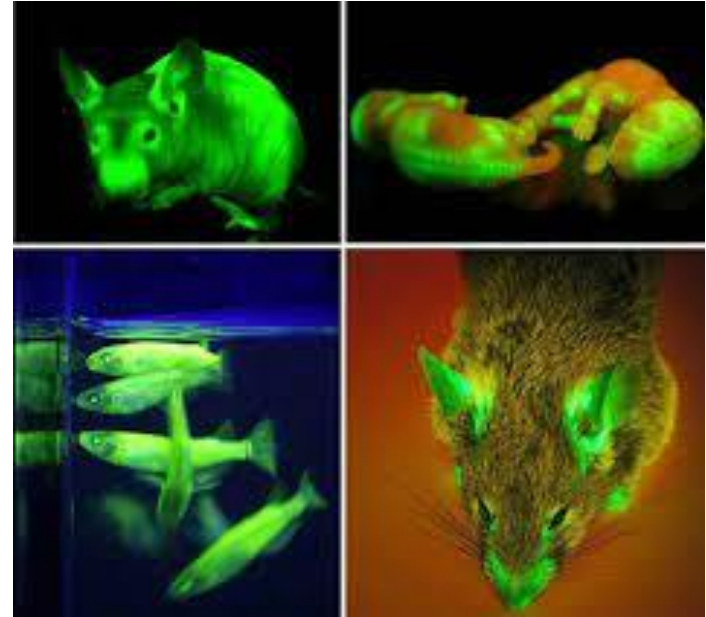
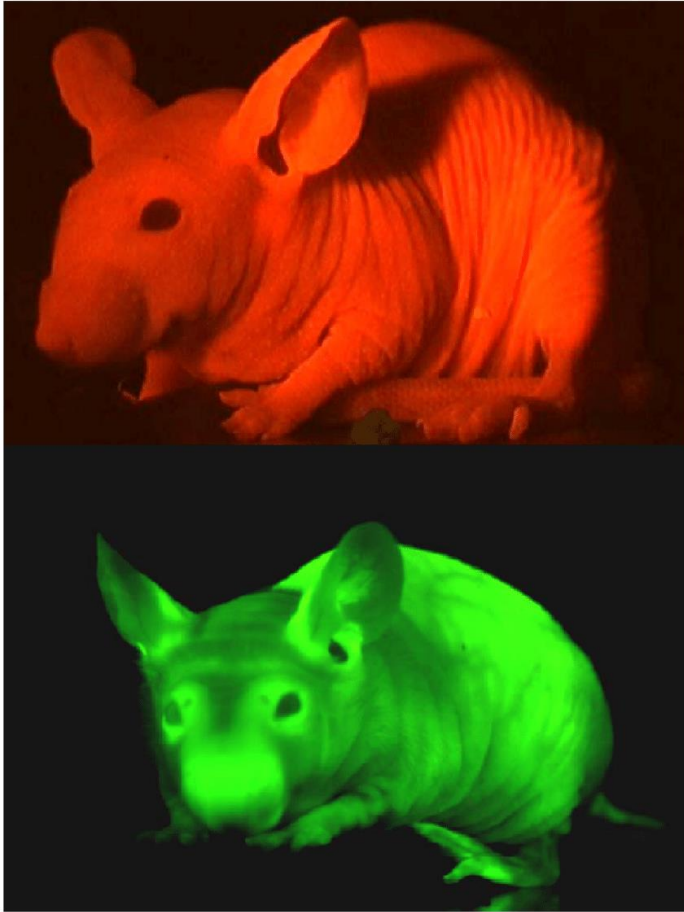


GFP

- ▶ Green fluorescent protein
- ▶ 1962 izolován z *Aequorea Victoria* (Osamu Shimomura)
- ▶ 1992 – naklonován (Douglas Prasher)
- ▶ 1992 – exprimován *in vivo* (Martin Chalfie)
- ▶ Fluorescenční značka genové exprese, lokalizace proteinů v buňce
- ▶ Není toxický pro buňky
- ▶ Detekce pomocí mikroskopu



GFP *in vivo*



Arabidopsis thaliana

- ▶ Malý genom
- ▶ Snadno roste v laboratoři
- ▶ Identifikace genů pro vývoj rostlin, studium metabolismu
- ▶ 27 000 genů, 35 000 proteinů
- ▶ V současnosti *Agrobacterium tumefaciens* a detergent s DNA – vnesení DNA do rostliny



Danio rerio

- ▶ Toxikologie
- ▶ Studie mutací genů
- ▶ Vývojová biologie, toxikologie, onkologie, genetika, neurobiologie
- ▶ Rychlý embryonální vývoj
- ▶ Regenerace
- ▶ 2009 sekvenace
- ▶ 52 000 studií



Mus musculus



- ▶ Snadno se rozmnožují, snadno se chovají, snadná manipulace
- ▶ 99% homologie genů s lidskými
- ▶ Studium lidských chorob (APL, AML...)
- ▶ Studium interakcí léků
- ▶ Studium patogeneze nemocí
- ▶ Transgenní myši (nemají funkční gen, nebo je mutovaný-patogeneze onemocnění)
- ▶ 1,838,566 článků

Imunodeficientní myši

- ▶ Myši bez funkčního imunitního systému
- ▶ Skvělé modely na studium
 - ▶ Vývojová biologie
 - ▶ Neurodegenerativní onemocnění
 - ▶ Nádorová biologie
 - ▶ Studium imunity



Oryctolagus cuniculus domesticus

- ▶ Produkce protilátek
- ▶ Blíž lidem než hlodavci
- ▶ Krátký životní cyklus, hodně potomků
- ▶ Genom osekvenován
- ▶ Studium reprodukce

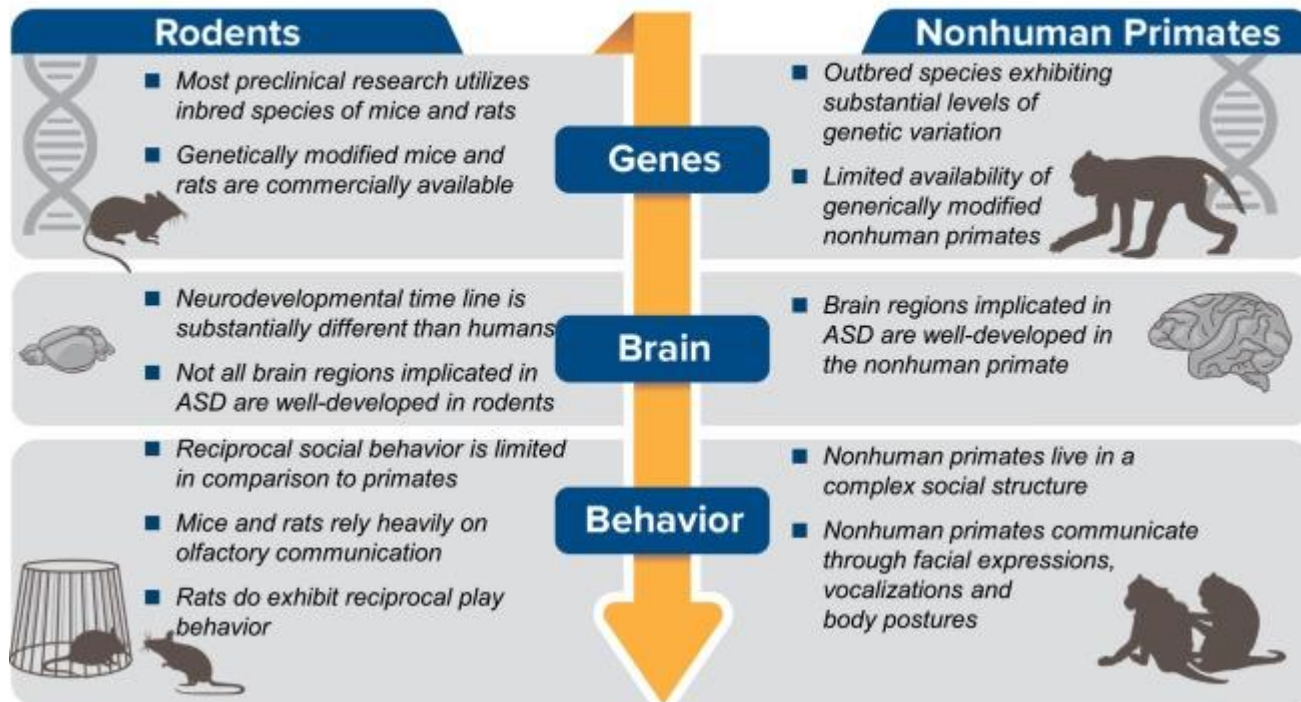


Primáti

- ▶ Obrna
- ▶ Mozek
- ▶ Toxicita
- ▶ AIDS
- ▶ neurobiologie
- ▶ Hodně kritiky
- ▶ Infekční choroby, vývoj vakcín, HIV a malárie

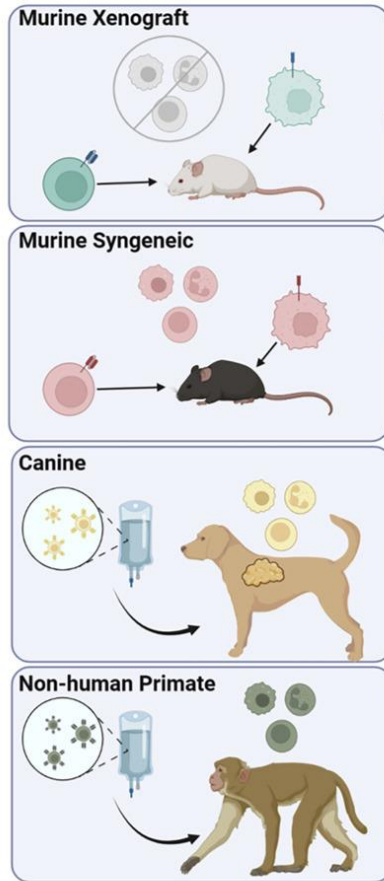
Studium autismu

Preclinical Models of ASD

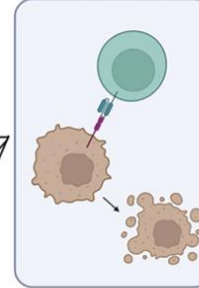


CAR-T therapie

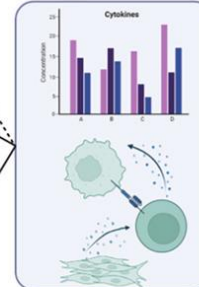
Animal models for CAR-T cell therapy



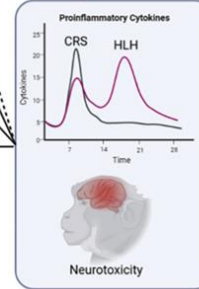
Anti-tumor Activity



Biology



Toxicity



Proč jsou potřeba zvířecí modely?

- ▶ Jednobuněčné modely-skvělé pro preklinický výzkum ALE nedostačující - buněčné interakce
- ▶ Dávkování léků - v organismu jiné mechanismy – metabolismus, enzymy....
- ▶ Člověk - zhruba 200 typů tkání
- ▶ Řada vlivů- stravování, prostředí, životní styl, genetická výbava
- ▶ Léky schválené jen pro určité rasy – gefitinib pro léčbu nádorů plic u Asijských žen, které nikdy nekouřili
- ▶ Lék jen pro lidi s černou pletí – BiDil – srdeční selhání

Etické zásady – koncepce tří „R“

- ▶ **REPLACEMENT** – náhrada zvířat v pokusech pokud dosažený výsledek je na stejné nebo vyšší úrovni (hlavně výuka)
- ▶ **REDUCTION** – redukce počtu zvířat výběrem vhodných metod, uspořádáním experimentu, péčí o kvalitu zvířat, atd.
- ▶ **REFINEMENT** – snížení až úplné vyloučení bolestivých a stresujících přístupů a experimentálních postupů
- ▶ 1959 Russel and Burch

Proč je to nutné?

Historie thalidomidu

- ▶ 1953 Chemie Grunenthal
- ▶ 1957 distribuce
- ▶ Sedativum, proti ranní nevolnosti u těhotných
- ▶ Anti-angiogenní účinky
- ▶ Nebyl dostatečně otestován
- ▶ Zhruba 10 000 dětí takto narozených
- ▶ Některé z těchto dětí naživu – těžké zdravotní problémy přibývající s věkem



Obrna

- ▶ Obrna jedna z nejhorších nemocí 20. století
- ▶ Postihla statisíce lidí, hlavně dětí
- ▶ Vymolává paralýzu a smrt
- ▶ Landsteiner a Popper prokázali, že je infekční a možnosti přenosu – opice
- ▶ Salk a Sabin vyrobili vakcínu prací na kuřatech a opicích



Obrna

POLIO

Contagious Viral Illness

Poliovirus Destroys
Nerve Cells in the
Spinal Cord

Causing Muscle
Wasting and
Paralysis

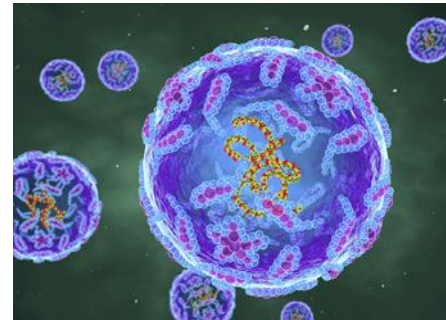
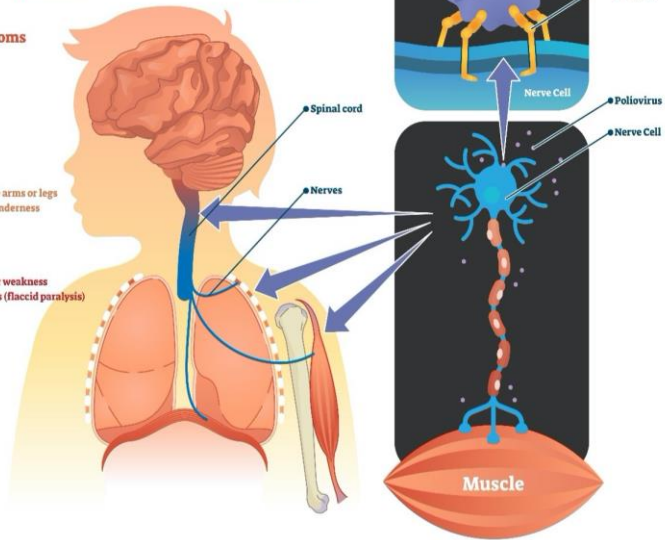
Signs and symptoms

Nonparalytic polio

- Fever
- Sore throat
- Headache
- Vomiting
- Fatigue
- Back pain or stiffness
- Neck pain or stiffness
- Pain or stiffness in the arms or legs
- Muscle weakness or tenderness

Paralytic polio

- Loss of reflexes
- Severe muscle aches or weakness
- Loose and floppy limbs (flaccid paralysis)



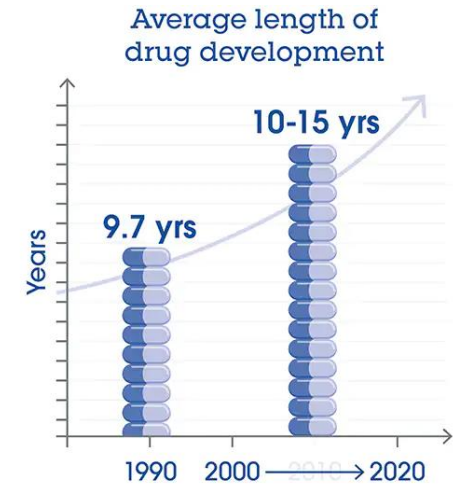
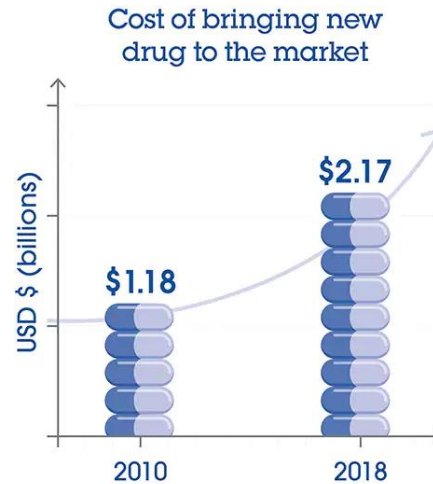
Úmrtí dětí SIDS

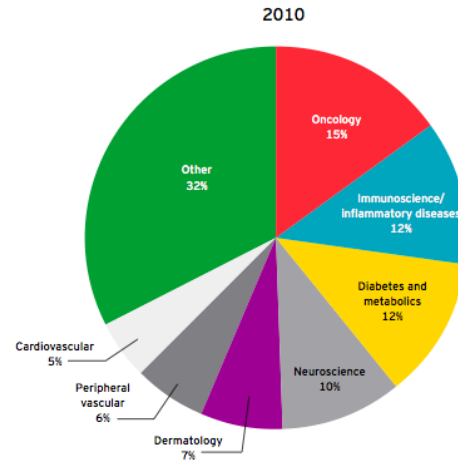
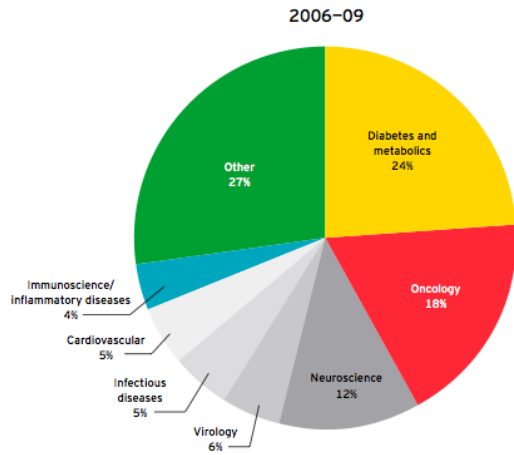
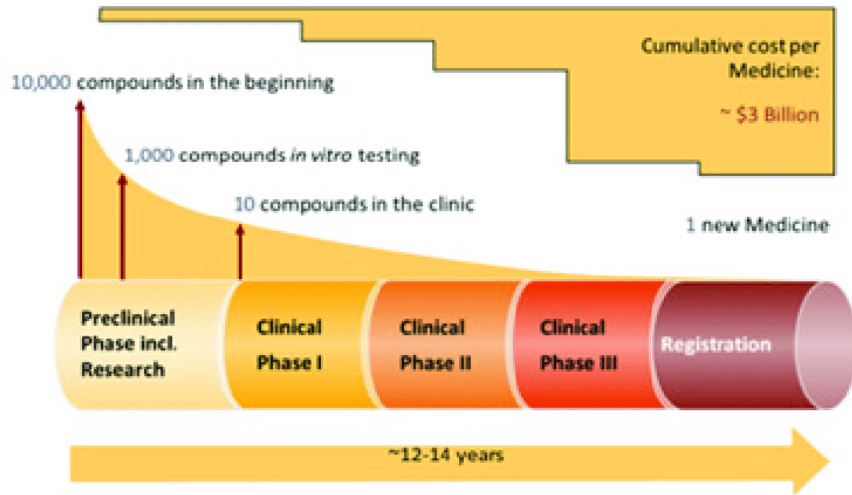
- ▶ Studie na ovčích umožnili užívání steroidů u respiračních problémů nedonošených dětí
- ▶ Poznatky a léčba SIDS pochází ze studií na krysách, myších, psech a ovčích



Jak se změnilo testování léčiv?

- ▶ 6 let preklinika, 8 let testování
- ▶ Tkáňové kultury
- ▶ Zvířecí modely
- ▶ Klinické testování I, II, III a IV fáze
 - ▶ I - bezpečnost
 - ▶ II- testovací protokol
 - ▶ III- finální testování
 - ▶ IV- post-approval studies
- ▶ 2004 VIOXX stáhnut – zvýšené riziko infarktu a mrtvice





Source: Ernst & Young.

Děkuji za pozornost