MUNI
MED

Principy a etické zásady provádění experimentů na zvířatech

Ing. Hana Holcová Polanská, Ph.D.

Použití živých systémů

Myšlenka použití zvířat v experimentech
Claude Bernard (1813-1878) – lékař

- 1867 publikace *l'Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* (Úvod do studia experimentální medicíny)
  - *„Principy experimentální medicíny jsou principy všech experimentálních věd.“*

Pokusné zvíře

1. živý obratlovec, který je nebo má být použit k pokusům, s výjimkou člověka, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, nebo

2. živý hlavonožec, který je nebo má být použit k pokusům;

za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium uvedené v bodě 1, pokud má být zvířeti umožněno žít nad rámec tohoto stadia vývoje a v důsledku prováděných pokusů je pravděpodobné, že po dosažení tohoto stadia vývoje je postihne bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození,

Nejčastěji používaná pokusná zvířata

- laboratorní myš (*Mus musculus*)
- laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)
- králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*)
- křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*)
- morče domácí (*Cavia apperea*)
- prase domácí (*Sus scrofa*)
- drápatka vodní (*Xenopus laevis*)
- ryby - např. dánio pruhované (*Danio rerio*)

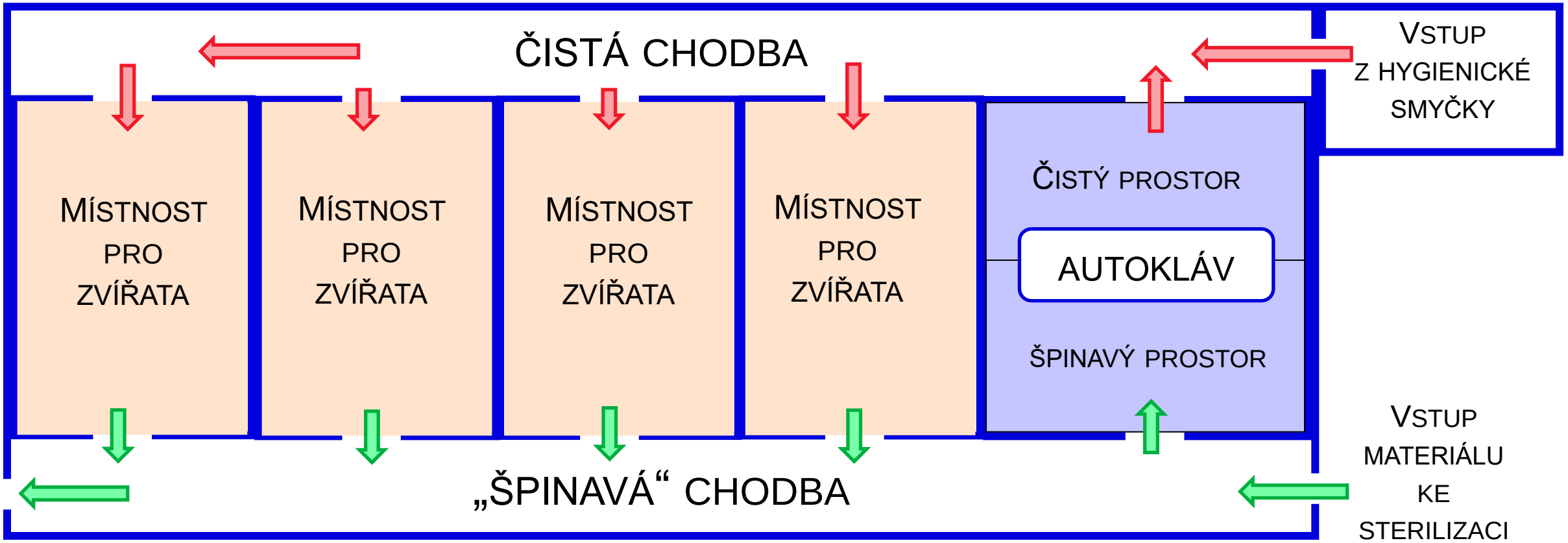
Obrázky: https://www.biolib.cz/ & https://www.velaz.cz/

MUNI MED

Způsoby chovu

1. Otevřený
   - vstup zvířat, osob a materiálu je volný, bez bariéry
2. Uzavřený
   a) Bariérový
      - zvířata oddělena od vnějšího prostředí bariérou, nejsou oddělena od člověka
      - SPF zvířata
   b) Izolátorový
      - zvířata uzavřena v izolátoru, který je odděluje od vnějšího prostředí i od člověka
      - gnotobiotická zvířata

Bariérový chov - schéma



MUNI MED

Izolátorový chov

University of Calgary

Ohio State University

MUNI MED

Zvířecí modely – mikroorganismy

Konvenční
- běžná zařízení, otevřený systém chovu, kontrola patogenů přenosných na člověka

SPF
- uzavřený systém chovu, je definováno, jaké mikroorganismy zvířata **nemají**

Axenická
- uzavřený systém chovu
- bez mikroorganismů

Gnotobiotická
- "*gnotos*" (known) and "*bios*" (life)
- uzavřený systém chovu
- axenické zvíře + definovaný mikroorganismus (mono-, di-, poly-xenická)

MUNI MED

Zvířecí modely – genetika

Inbrední

- kolonie vytvořené minimálně 20 generacemi páření bratr-sestra, které lze vysledovat k jedinému zakládajícímu páru.

Outbrední

- křížení kolonií, které byly geograficky odděleny (jiné chovatelské zařízení), až dosáhnou stejného rozsahu genetických variací.

Hybridní

- křížením dvou inbredních kmenů
- hybridní zvířata jsou odolnější vůči nemocem, mají z výšenou míru přežití ve stresu
- větší vrhy než rodičovské kmeny

Trangenní

- používají se téměř v každé terapeutické oblasti a oblasti výzkumu nemocí
- modifikace DNA
  - vypnutí funkčního genu
  - zapnutí nefunkčního/utlumeného genu
  - vnesení části cizorodé DNA

Zvířecí modely – imunitní systém

Imunokompetentní

- bez změny imunitního systému

Immunodeficientní

- zvířata s různou úrovní imunodeficience a fenotypovými charakteristikami

Humanizované zvířecí modely

- indukovaný lidský imunitní systém různé úrovně

Použití zvířat v experimentu

Zásada 3R

- 1959 Russel a Burche
  - Reduction (snížení)
  - Replacement (nahrazení)
  - Refinement (zmírnění)

Více info na: https://norecopa.no/media/bjwh1h2s/the-three-rs-cz.pdf

MUNI MED

Reduction (Snížení)

- jakýkoli postup, který vede k dosažení stejného množství informací za použití nižšího počtu zvířat nebo k maximalizování získaných informací z jednoho zvířete
- vhodný plán pokusu a přiměřená analýza výsledných dat s náležitým posouzením statistických principů může zvýšit přesnost výsledků a stejně tak umožní použití nižšího počtu zvířat k vývoji těchto dat
- malá pilotní studie naznačí, zda je nebo není vhodné přikročit k hlavnímu pokusu

Replacement (Nahrazení)

- jakákoli experimentální metoda, která nevyžaduje použití celého, živého zvířete
- některé z těchto metod nahrazují pouze částečně
- humánní zabíjení zvířat pro získání buněk, tkání nebo orgánů pro následné studie *in vitro*

Některé alternativní metody nahrazují plně, jelikož nevyžadují žádný biologický materiál získaný od zcela vyvinutého obratlovce.

Alternativy pokusů na zvířatech

- Důsledné vytěžení existujících experimentálních dat
- Modely, počítačové programy
- Fyzikálně-chemické techniky
- Bezobratlí, rostliny, mikroorganismy (nižší organismy)
- Časná vývojová stádia – zárodečný terčík ptačího vejce, embrya
- Lidští dobrovolníci, epidemiologická data
- Buněčné, tkáňové a orgánové kultury (tzv. relativní náhrady - vyžadují čerstvě získané buňky nebo tkáň)

Refinement (Zmírnění postupů)

- upravení jakékoli procedury, která zasahuje do života laboratorního zvířete od jeho narození až po jeho smrt, takže se tím minimalizuje bolest a utrpení, které zvíře prožívá, a pozvedá úroveň jeho života
- personál musí být dobře vyškolený a zručný v zacházení s druhy používaných zvířat
- anestézie a analgezie by měly být použity všude, kde je to vhodné a možné

Regulace používání laboratorních zvířat

- Zákon na ochranu zvířat proti týrání č. **246/1992 Sb.** a jeho prováděcí vyhláška **419/2012 Sb.**
- Ústřední komise na ochranu zvířat (ÚKOZ)
- Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat při uživatelském zařízení

Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat

- při každém **uživatelském**, chovatelském i dodavatelském zařízení
- poskytuje **poradenství** týkající se dobrých životních podmínek pokusných zvířat, 3R, …
- zavádí, kontroluje a přezkoumává vnitřní provozní postupy
- sleduje a kontroluje průběh a výsledky projektů pokusů

Ústřední komise na ochranu zvířat (ÚKOZ)

- ochrana hospodářských zvířat
- ochrana zvířat v zájmových chovech
- ochrana volně žijících zvířat
- ochrana **pokusných zvířat**

Zákon na ochranu zvířat č. 246/1992 Sb.

§ 3 Pro účely tohoto zákona se rozumí

a) zvířetem každý živý obratlovec, kromě člověka, nikoliv však plod nebo embryo,

…

j) pokusným zvířetem

1. živý obratlovec, který je nebo má být použit k pokusům, s výjimkou člověka, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, nebo
2. živý hlavonožec, který je nebo má být použit k pokusům;

za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium uvedené v bodě 1, pokud má být zvířeti umožněno žít nad rámec tohoto stadia vývoje a v důsledku prováděných pokusů je pravděpodobné, že po dosažení tohoto stadia vývoje je postihne bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození,

Zákon na ochranu zvířat č. 246/1992 Sb.

§ 18 Účely pokusů

(1) Pokusy lze provádět výhradně pro tyto účely:

a) základní výzkum,
b) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem
   1. zabránit a předejít onemocnění, špatnému zdravotnímu stavu nebo jiným anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit,
   2. posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin, nebo
   3. zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům,
c) pro jakýkoli z cílů uvedených v písmeni b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků,
d) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat,
e) výzkum zaměřený na zachování druhů,
f) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí,
g) trestní řízení a jiné soudní řízení.

(2) Provádět na zvířatech pokusy za účelem vývoje nebo zkoušení zbraní, bojových látek nebo munice a k nim příslušných zařízení **je zakázáno**.

Zákon na ochranu zvířat č. 246/1992 Sb.

§ 15a Oprávnění k chovu, oprávnění k dodávce a oprávnění k používání pokusných zvířat

…

(2) Pokusy mohou být prováděny pouze **ve schválených zařízeních** uživatele pokusných zvířat. Ministerstvo může udělit výjimku z požadavku uvedeného ve větě první, pokud uživatel pokusnýchzvířat prokáže, že je to vědecky odůvodněno. Udělit výjimku k provádění pokusů mimo schválenézařízení uživatele pokusných zvířat bez uvedení adresy místa, kde hodlá žadatel vykonávat svojičinnost, je možné pouze v případě provádění pokusů ve volné přírodě.

Zákon na ochranu zvířat č. 246/1992 Sb.

§ 15d Kurzy odborné přípravy k získání kvalifikace a odborné způsobilosti na úseku pokusných zvířat

…

(2) Osoba, která bude navrhovat pokusy a projekty pokusů, provádět pokusy na pokusnýchzvířatech, pečovat o pokusná zvířata nebo usmrcovat pokusná zvířata, musí před prováděnímtěchto úkonů absolvovat náležité vzdělávání a odbornou přípravu v

a) navrhování pokusů a projektů pokusů,
b) provádění pokusů na pokusných zvířatech,
c) péči o pokusná zvířata, nebo
d) usmrcování pokusných zvířat.

Zákon na ochranu zvířat č. 246/1992 Sb.

§ § 15d Kurzy odborné přípravy k získání kvalifikace a odborné způsobilosti na úseku pokusných zvířat

(3) Úkony uvedené v odstavci 2 písm. a) mohou provádět pouze **lékaři, veterinární lékaři** a **osoby s jiným vysokoškolským vzděláním v oblasti biologických oborů**, pokud se během studia nebo postgraduálního studia **prokazatelně seznámili s metodami chovu a práce na pokusných zvířatech**, s jejich ochranou a s vyhledáváním a používáním alternativních metod a kteří absolvovali kurz odborné přípravy a **získali osvědčení o odborné způsobilosti** k navrhování pokusů a projektů pokusů. Na základě tohoto osvědčení mohou tyto osoby provádět také pokusy na pokusných zvířatech, péči o pokusná zvířata a usmrcování pokusných zvířat. Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů vydává ministerstvo, a to na dobu 7 let.

(4) Provádět úkony uvedené v odstavci 2 písm. b), c) nebo d) mohou pouze osoby, které absolvovaly kurz odborné přípravy a **získaly osvědčení o odborné způsobilosti k provádění pokusů** na pokusných zvířatech, péči o pokusná zvířata a usmrcování pokusných zvířat. Toto osvědčení vydává ministerstvo, a to na dobu 7 let.

MUNI MED

MUNI
MED

Probatorní laparotomie

- zvířecí model

Ing. Hana Holcová Polanská, Ph.D.
Mgr. Lucie Válková, Ph.D.

Created in BioRender.com bio

Probatorní laparotomie

Praktikum

1) Potkan v chirurgické toleranci
2) V poloze na zádech umístění na operační stolek
3) Laparotomie
4) Sutura svalové vrstvy
5) Sutura kožní vrstvy

Created in BioRender.com bio

Praktikum

1) Zvíře v plné chirurgické toleranci
- zvíře již dostalo iniciační dávku anestezie

Bez vyzvání další anestezii nepodávat!

MUNI MED

Created in BioRender.com bio

Praktikum

2) V poloze na zádech umístění na operační stolek

- gumičkou fixovat hrudní i pánevní končetiny
- gumičkou fixovat hlavu (za horní řezáky)

Praktikum

3) Laparotomie

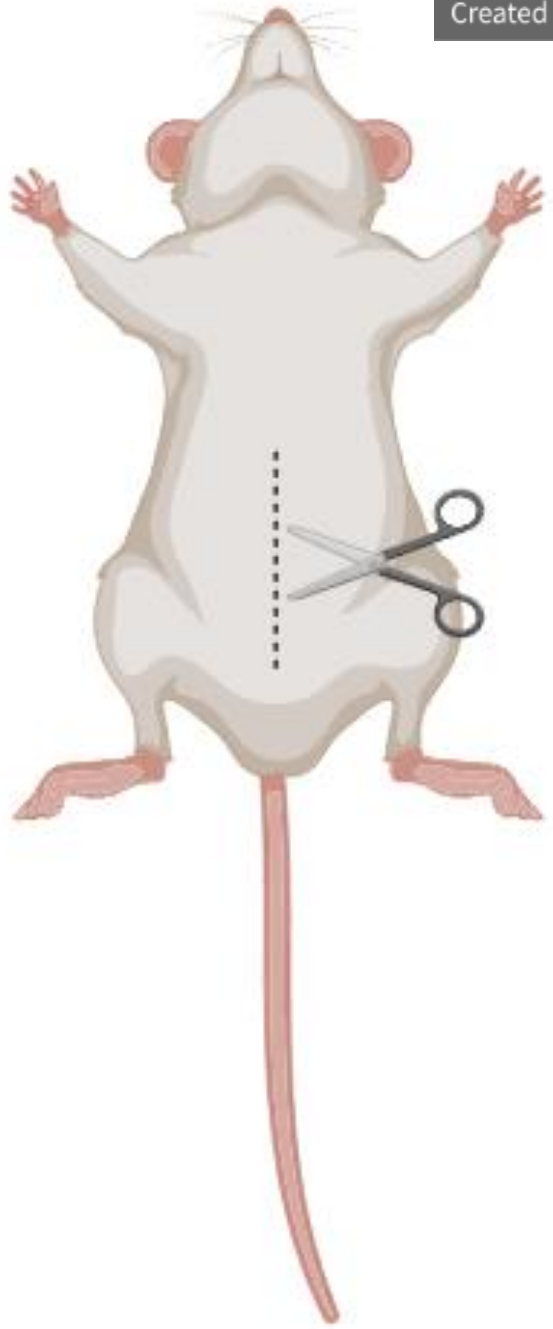
- v průběhu abdominální oblasti

(od *processus xiphoideus* téměř k symfýze)

- nejprve kožní vrstva, poté svalová

- NIC se neholí

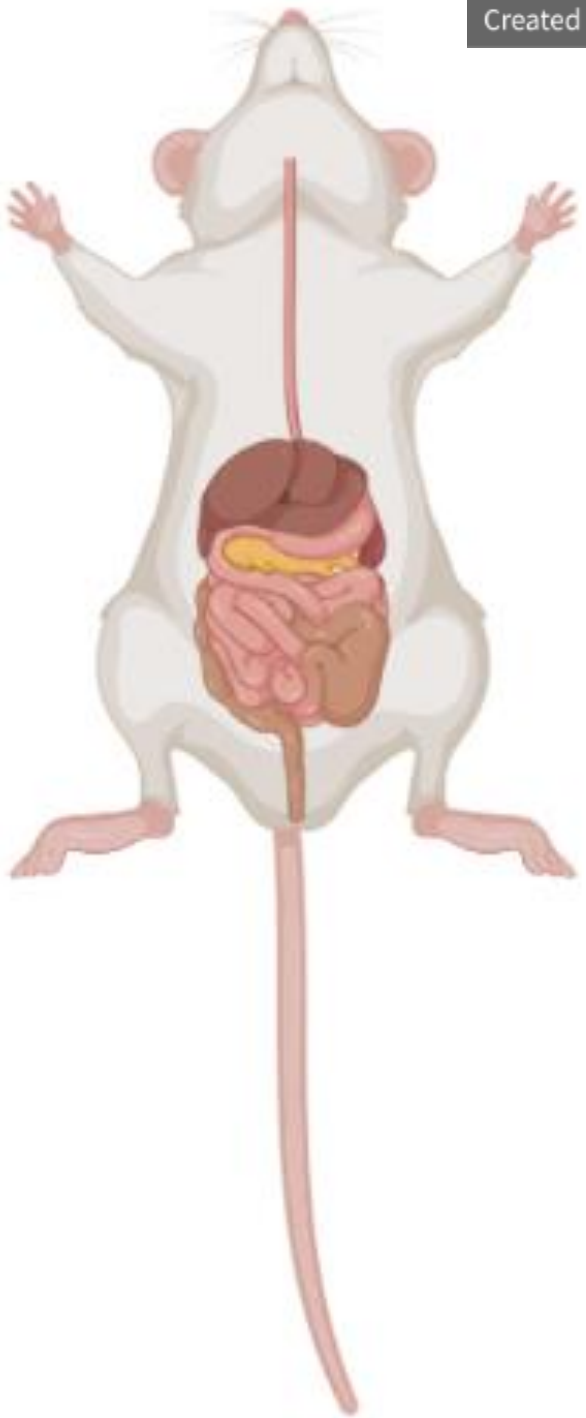
Nenastřihněte hrudník!!!



Created in BioRender.com bio

Praktikum

4) Observace dutiny břišní
   - *caecum* vs. žaludek
   - ledviny (především levá) + *vena renalis*
   - *aorta abdominalis* + *vena cava caudalis*
   - močový měchýř
   - …



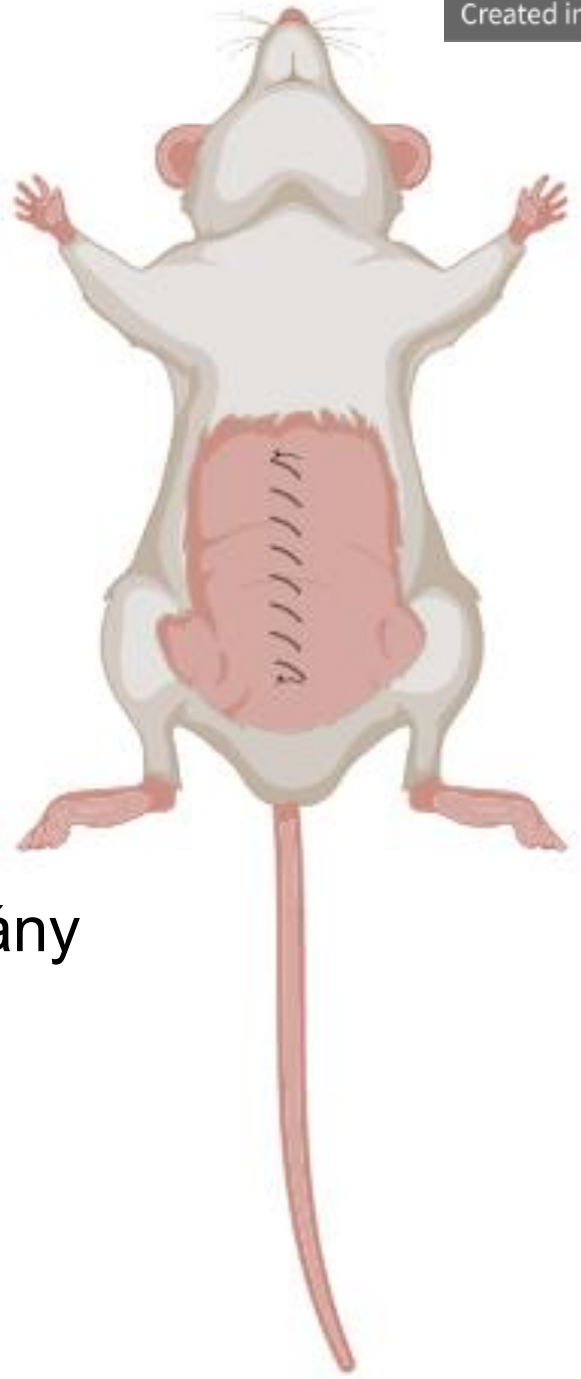
Created in BioRender.com bio

Praktikum

5) Sutura svalové vrstvy
- pokračovací steh
- jehla na průřezu kulatá
- vzdálenost mezi stehy 5-7 mm

- řádně utáhnout stehy

= okraje rány k sobě přiléhají (nejsou vidět orgány vespod, ale ani nedochází k ischemii sešité tkáně)

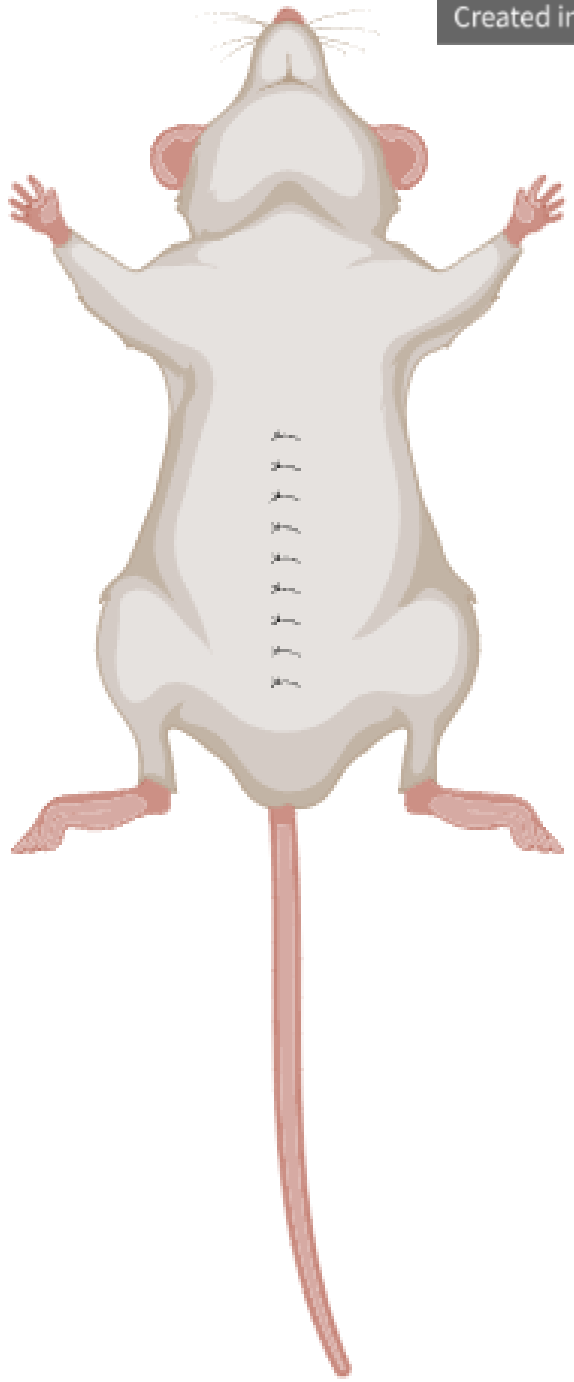


Created in BioRender.com bio

Praktikum

6) Sutura kožní vrstvy
   - individuální stehy
   - jehla na průřez trojúhelníkovitá
   - vzdálenost mezi stehy 5-7 mm
   - konce stehů zkrátit na cca 5 mm

   - řádně utáhnout stehy



Created in BioRender.com bio

Created in BioRender.com bio

Praktikum

Podání další anestezie POUZE na pokyn vyučujícího
(s největší pravděpodobností nebude nutná).

Pokud se zvíře začne samo hýbat (jevit známky odeznívající anestezie), neprodleně to ohlaste vyučujícímu.

Pokud by se Vám udělalo nedobře (z jakýchkoliv důvodů), nebojte se zavčasu ozvat a oznamte to vyučujícímu.

MUNI
MED

V laboratorních prostorách je zakázáno jíst, pít a kouřit

MUNI
MED

Je zakázáno pořizování jakýchkoliv záznamů z laboratorních prostor

MUNI
MED