

M U N I
S C I

Experimentální embryologie

Bi1130

Modelové organizmy ve vývojové biologii - obratlovci

Marie Šulcová
Jarní semestr 2023

Dnešní osnova

3. MODELOVÉ ORGANIZMY VE VÝVOJOVÉ BIOLOGII - OBRATLOVCI

- Danio rerio,
- Ambystoma mexicanum,
- Xenopus laevis,
- Reptilia,
- Galus gallus,
- Mus musculus,
- Sus scrofa

Legislativa platná pro zásady práce s obratlovci

Dodržování:

- Neoficiálně: pravidlo 4R (reduction, refinement, replacement, responsibility)
- Oficiálně: v ČR pro chov, práci a navrhování pokusů s obratlovci nutné dodržovat legislativu a absolvovat odborný kurz:

Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č.246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání

- Obsahem kurzu jsou informace o :
 - ustanovení zákona a právní předpisy ČR o chovu a péči zvířat a jejich používání pro vědecké účely
 - ustanovení předpisů EU proti týrání zvířat
 - etické otázky týkající se vztahu člověka a pokusných zvířat a pro a proti používání zvířat pro vědecké účely
 - základní biologie (anatomie, fyziologie, chov a genetika) a etologie pokusných zvířat
 - péče, hygiena a výživa pokusných zvířat, druhově specifické metody zacházení s pokusnými zvířaty
 - zásady humánního zacházení včetně metod snižujících bolest a usmrcování pokusných zvířat, pochopení druhově specifických strachů, bolestí a utrpení pokusných zvířat
 - návrh pokusů a projektů pokusů včetně vedení, evidence, statistiky a archivace údajů souvisejících s chovem a použitím pokusných zvířat
 - specifika pokusů na hospodářských a volně žijících zvířatech

Legislativa platná pro zásady práce s obratlovci

A jak je to s embryi?

Pokusným zvířetem se rozumí:

1. Živý obratlovec, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje
 2. (Též) živý hlavonožec
- ✓ Za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium uvedené výše, pokud má být zvířeti umožněné 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

Welfare pokusných zvířat

- Snaha o zvýšení kvality péče o zvířata v zajištění sociálním obohacením (možnost kontaktu s jedinci téhož druhu či s člověkem), obohacením náplně zvířat (možnost kontroly nad prostředím, či podněty podporujícími fyzickou aktivitu), obohacením prostředí (přidáním příslušenství), smyslovým obohacením (čichovými, taktilními či chuťovými podněty) či nutričním obohacením (nový druh krmiva, či jiný způsob podávání krmiva) tak, aby pokusné zvíře mohlo vyjádřit druhově typické chování
- Obohacené welfare → spokojené zvíře → zkvalitnění výzkumných dat a poznatků

Přehled druhů zvířat a jejich spotřeby k pokusným účelům v ČR v roce 2021

© MZe - OoZ 28.2.2022

	Akademie věd ČR	Ministerstvo obrany	Ministerstvo průmyslu a obchodu	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy	Ministerstvo zdravotnictví	Ministerstvo zemědělství	Ministerstvo životního prostředí	ČESKÁ REPUBLIKA
TABULKA 1								
Počet použitých pokusných zvířat podle druhů								
Myš laboratorní (<i>Mus musculus</i>)	50550	2974	1353	12899	1863	5350		74989
Potkan laboratorní (<i>Rattus norvegicus</i>)	3937	506	2946	5553	3634	799		17375
Morče domácí (<i>Cavia porcellus</i>)	251		32	28	24	1 664		1999
Křeček zlatý (<i>Mesocricetus auratus</i>)	39					251		290
Křečík čínský (<i>Cricetulus griseus</i>)				40				40
Pískomil mongolský (<i>Meriones unguiculatus</i>)								0
Ostatní hlodavci (ostatní <i>Rodentia</i>)	178			423		203	491	1295
Králík domácí (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	154		24	346	84	4430		5038
Kočka domácí (<i>Felis catus</i>)	3			11	40	61		115
Pes domácí (<i>Canis familiaris</i>)					193	184		377
Fretka (<i>Mustela putorius furo</i>)				2	142			144
Ostatní šelmy (ostatní <i>Carnivora</i>)							5	5
Koně, osli a kříženci (<i>Equidae</i>)				31		193		224
Prase domácí (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	169	118		512	51	769		1619
Koza domácí (<i>Capra aegagrus hircus</i>)				95				95
Ovce domácí (<i>Ovis aries</i>)				173		657		830
Tur domácí (<i>Bos primigenius</i>)				1967		338		2305
Poloopice (<i>Prosimiae</i>)								0
Kosmani a tamarini (např. <i>Callithrix jacchus</i>)								0
Makak jávský (<i>Macaca fascicularis</i>)								0
Makak rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)								0
Kočkodani (<i>Chlorocebus spp.</i>)								0
Paviáni (<i>Papio spp.</i>)								0
Kotulové (např. <i>Saimiri sciureus</i>)								0
Ostatní primáti Nového světa (ostatní druhy <i>Ceboidea</i>)								0
Ostatní primáti Starého světa (ostatní druhy <i>Cercopithecoidea</i>)								0
Lidoopi (<i>Hominoidea</i>)								0
Ostatní savci (ostatní <i>Mammalia</i>)						45	17	62
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	592			339	1	21101		22033
Krůta domácí (<i>Meleagris gallopavo domesticus</i>)				13	2	516		531
Ostatní ptáci (ostatní <i>Aves</i>)	2081			640		25		2746
Plazi (<i>Reptilia</i>)				218			12	230
Skokan hnědý a skokan levhartí (<i>Rana temporaria</i> , <i>R. pipiens</i>)								0
Drápatka vodní a d. tropická (<i>Xenopus laevis</i> , <i>X. tropicalis</i>)								0
Ostatní obojživelníci (ostatní <i>Amphibia</i>)				120				120
Danio pruhované (<i>Danio rerio</i>)	2666		4374	300				7340
Mořčák evropský (např. <i>Serranidae</i> , <i>Moronidae</i>)								0
Lososovití (<i>Salmonidae</i>)				928			6718	7646
Živorodkovití (<i>Poeciliidae</i>)			22022	350			51933	74305
Ostatní ryby (ostatní <i>Pisces</i>)	485		1657	15087	9345	435	3176	30185
Hlavonožci (<i>Cephalopoda</i>)								0
Celkem	61105	3598	32408	40075	15379	37021	62352	251938

	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Zebrafish	<i>Xenopus</i>	Chicken	Mouse
Brood size	250-350	80-100	100-200	1000-5000	1	5-8
Costs per embryo	low	low	low	low	medium	high
High-throughput multiwell-format screening	good	good	good	good	poor	poor
Access to embryos	good	good	good	good	good	poor
Micromanipulation of embryos	limited	limited	fair	good	good	limited
Genome	known	known	known	known*	known	known
Genetics	good	good	good	fair*	none	good
Knock downs (RNAi, morpholinos)	good	good	good	good	limited	limited
Transgenesis	good	good	good	good	poor	good
Evolutionary distance to man	very distant	very distant	distant	intermediate	intermediate	close

Dánio pruhované (*Danio rerio*)

Zebříčka, Zebrafish



Úvod

- Třída: paprskoploutví (Actinopterygii)
 - Nadřád: kostnatí (Teleostei); řád: máloostí (Cypriniformes)
 - Čeleď: kaprovití (Cyprinidae)
- Původ: jižní Asie
- Délka těla až 5 cm, podél 5 charakteristických pruhů pigmentových buněk
- Pohlavní dimorfismus: samice plnější břicho, samci štíhlejší



Výhody

vs.

Nevýhody

zebřičky jako experimentálního modelu



Stovky vajíček vyvíjejících se mimo tělo samice

Rychlý a snadno pozorovatelný vývoj (díky transparentnímu embryu)

K dispozici velké množství různých mutantů; plně sekvenovaný genom

Snadná aplikace chemikálií do chovných nádrží

Snadný chov



Mnoho fyziologických a anatomických odlišností v porovnání s ostatními savčími modely vůči člověku

Duplikace genomu

Dlouhá přítomnost chorionu (až 48 hpf) může ovlivnit působení aplikovaných chemikálií

Výhody

vs.

Nevýhody

Feature	Benefit/Drawback
<p>Advantages</p> <p>Easy maintenance Year round spawning High fecundity (300–600 by single female at one time) Optical transparency of early stages</p> <p>Swimming begins at hatching (48–72 hpf) and more complex behavior (food seeking) at 5 dpf Very rapid development</p> <p>Fertilization is external</p> <p>Minimal parental care</p> <p>Mutants available, genome sequenced, morpholino knockdowns possible Animal protection laws often less stringent for zebrafish embryos than for mammals Eggs develop in nonsterile, simple buffers Genome has important similarities to human (e.g., nearly all mammalian genes have a zebrafish counterpart; high conservation of key developmental genes with the human) Very small size of early embryos</p> <p>Small egg size and external fertilization Early embryo is permeable to small compounds</p> <p>Disadvantages</p> <p>Last common ancestor with humans was 445 million years ago</p> <p>Exothermic (cold-blooded) Anatomical differences with human (e.g., lack of heart septation, synovial joints, cancellous bone, limbs, and lungs) Genome duplication</p> <p>Presence up to 48 hpf of the chorion</p>	<p>Low housing costs Research can run continuously Low cost per assay Real-time (live) imaging of developmental processes and easy selection of precise developmental stages (in contrast to mammals) Behavioral studies can be made on very early stages Large number of experiments possible in short time period Embryos accessible noninvasively, can be continuously imaged; there is no placental barrier or maternal compartment to influence drug experiments Reduced epigenetic parental influence on experimental outcome Genetic basis of teratogenesis can be investigated</p> <p>Fewer legal restrictions on research</p> <p>Easy to raise and maintain embryos Common molecular pathways can be studied</p> <p>Only very low quantities of expensive test drugs and staining reagents needed; suitable for high throughput screening in 96 and 384 multiwell plates Very precise control of drug delivery and dosage Suitable for drug testing</p> <p>Far more remote from humans than other animal models such as rodents (which have a 96 million year divergence time from humans) Physiology not identical to humans Several human ethanol disorders are difficult or impossible to model in this species (e.g., cardiac septation defects) Many genes present as two copies, creating extra work to determine functional roles Interference with drug diffusion</p>

Including information from Best et al. (2008), Tanguay and Reimers (2008), Grunwald and Eisen (2002), Gerlai et al. (2000), Gerlai (2003); Nei et al. (2001); Kimmel et al. (1995), Dahm and Geisler (2006), and Hisaoka (1958).

Způsob chovu a manipulace

- Chov v komerčně dostupných chovných systémech zajišťující stálou cirkulaci a filtraci vody
- Světelný režim 14:10 (světlo:tma)
- Ideální teplota v chovných tancích: 26-28,5°C
- pH vody: 6,8-7,5
- Krmení: suchá i živá potrava, ad libitum
- Pravidelné čištění chovných nádob a filtrů



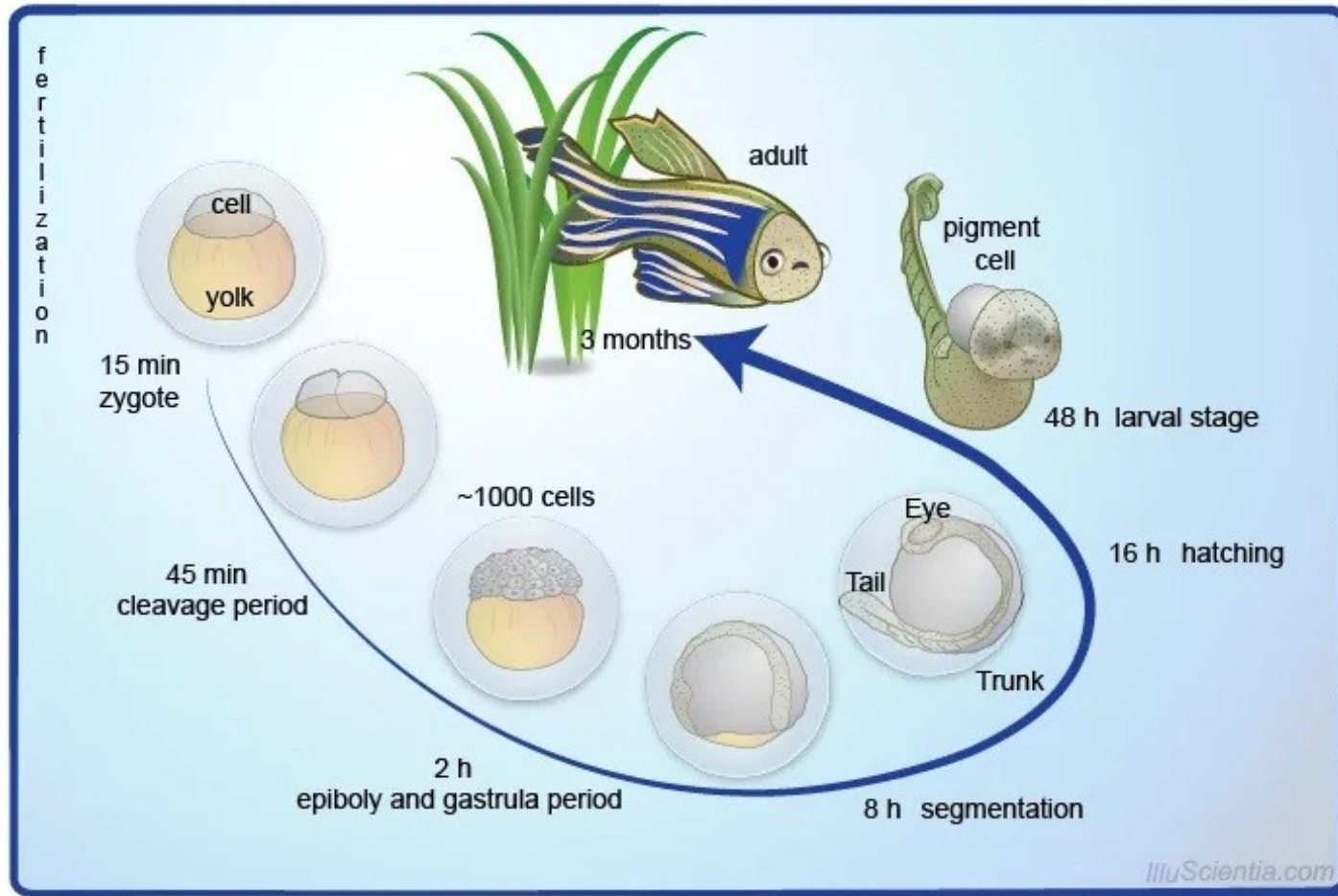
Životní cyklus

- Fertilizace mimo tělo samice při tření (brzo ráno „za úsvitu“), samice při něm vypouští jikry (ve stovkách), samec mlíčí

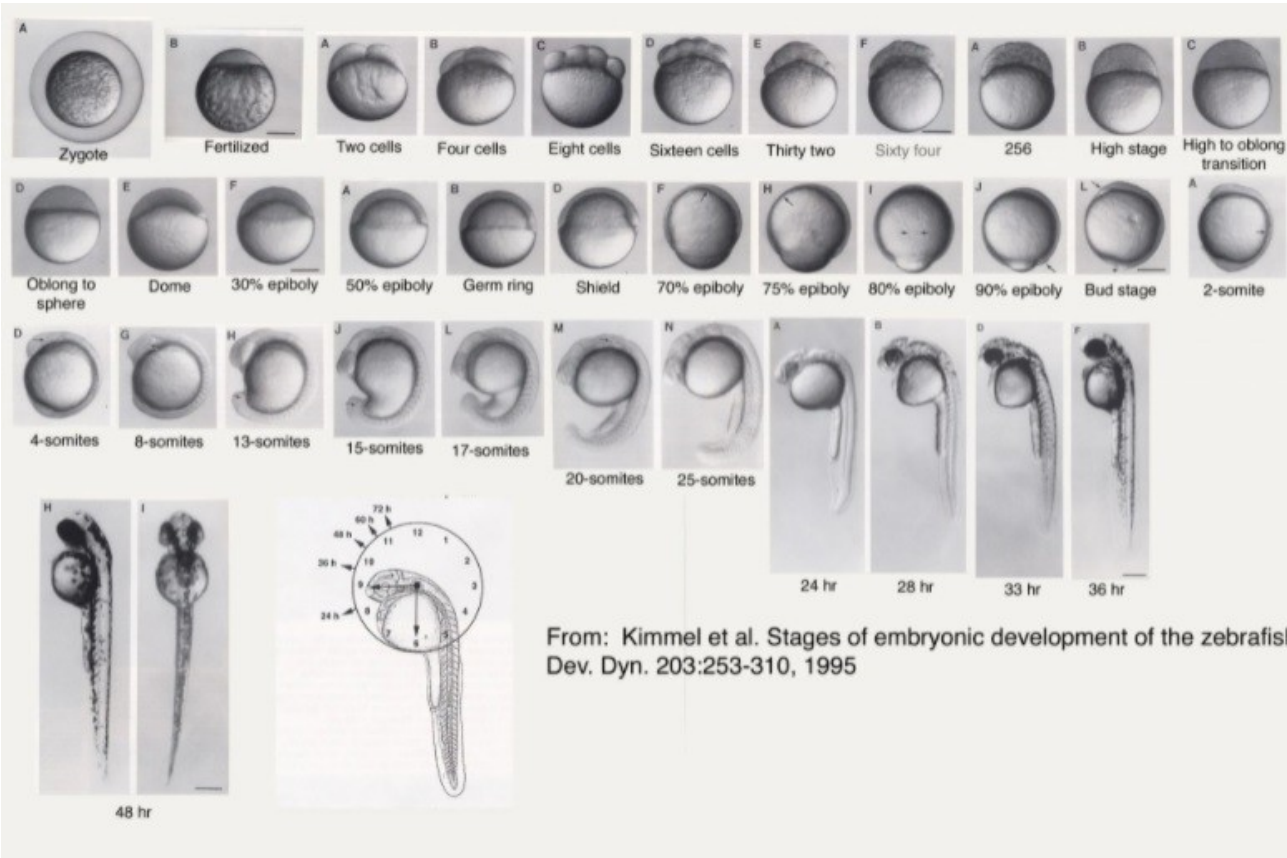


- Z oplozených jiker se líhne po 72 hodinách plůdek (larva), ten po pěti dnech začíná přijímat potravu
- Po dvou týdnech vývoje lze zařadit tank do systému s cirkulující vodou
- Pohlavní zralost po cca 3 měsících života

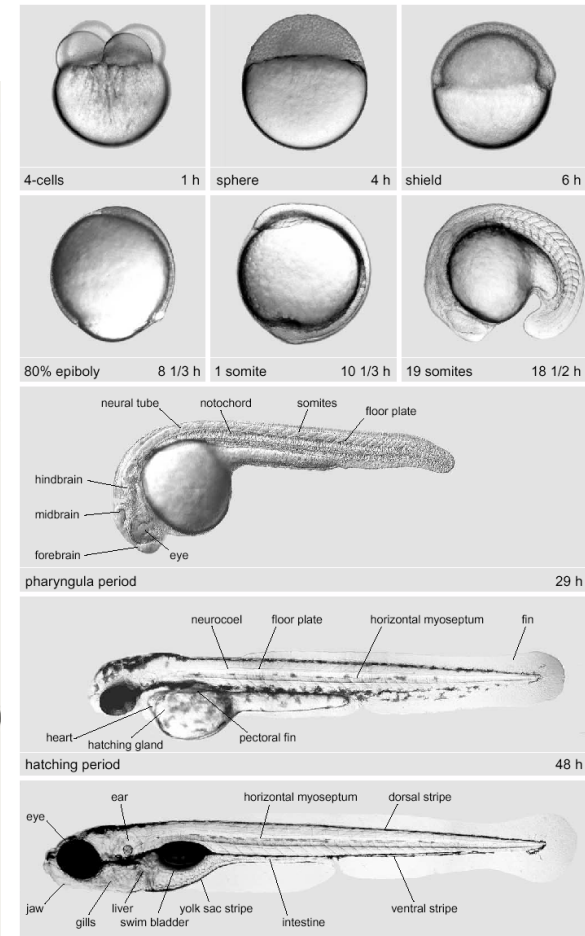
Životní cyklus



Životní cyklus

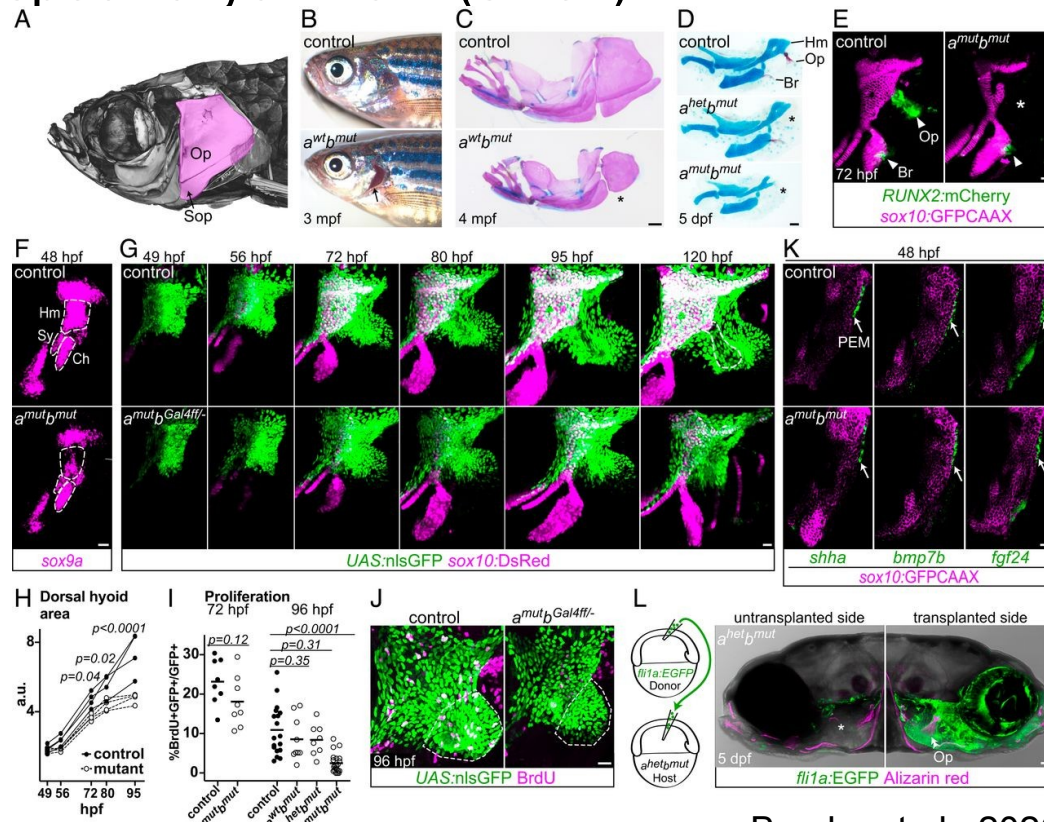


From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish
Dev. Dyn. 203:253-310, 1995



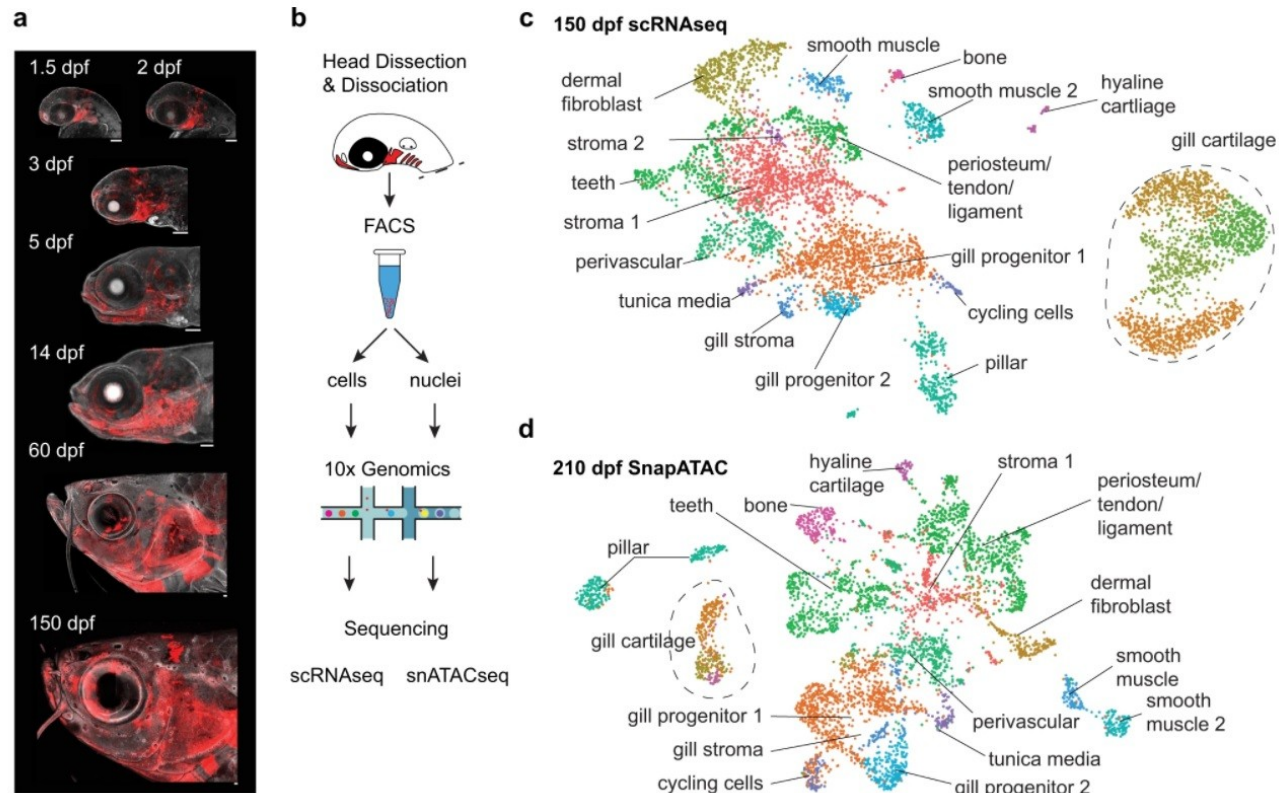
Vývojová biologie I

- Studium funkce genů (knock-out, knock-in genu *Pou3f3*) a jejich role při formování specifických tkání (skřelí)



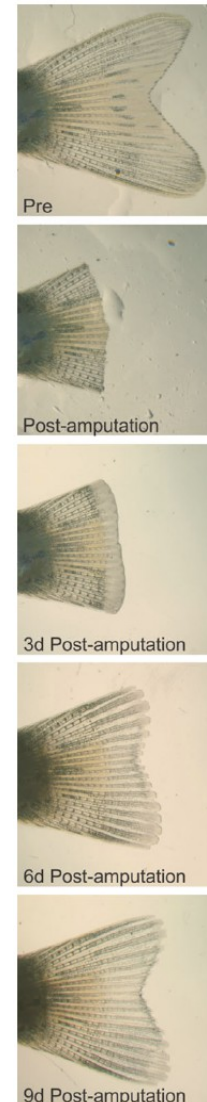
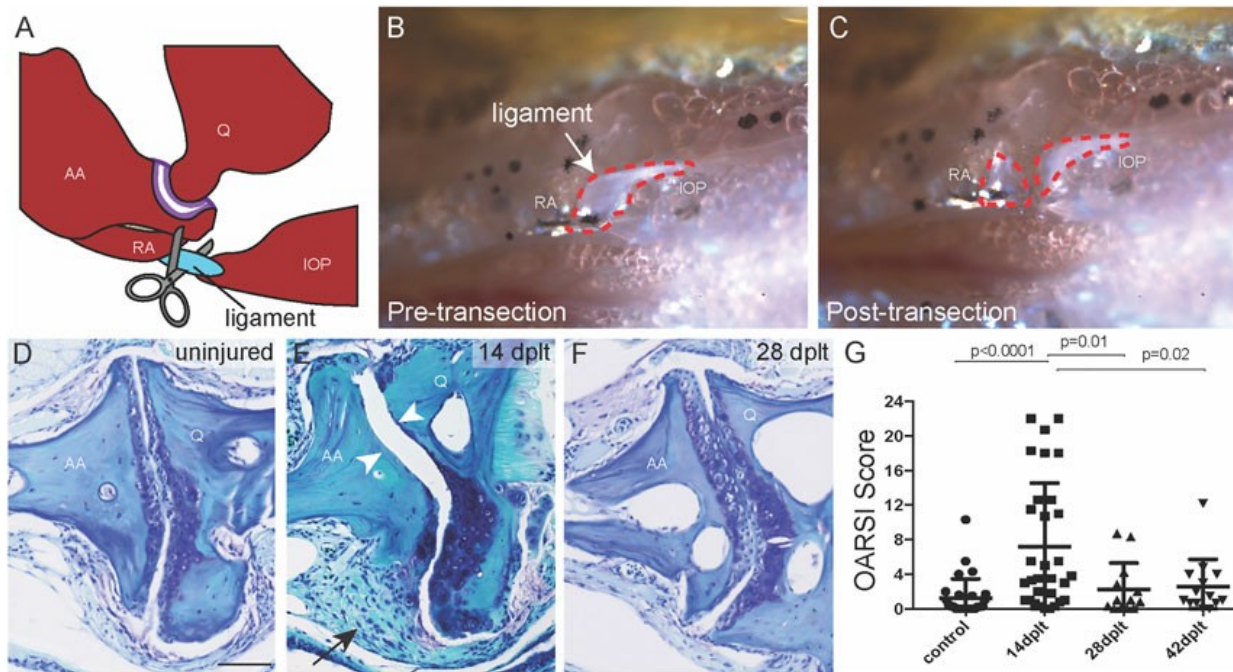
Vývojová biologie II

- Single-cell analýzy odhalující osud buněk neurální lišty a jednotlivé buněčné typy, které se z nich diferencují



Vývojová biologie III

- Studium regeneračního potenciálu rozličných struktur (ploutví, srdce, mozku, retiny, ale třeba i interopekulárního mandibulárního kloubu) a popis doprovodných procesů



Vývojová biologie

- Studium pigmentace (tvorba chromatoforů)
- Toxikologické studie
- Imunologické studie
- Model pro studium: Duschenovy muskulární dystrofie, obezity, diabetu, melanomů, tuberkulózy, epilepsie

Top 25 Subjects in the Area of Zebrafish Research

<i>Rank</i>	<i>Research areas</i>	<i>Publications</i>	<i>Percent</i>
1	Developmental Biology	4662	27.010
2	Biochemistry/Molecular Biology	3058	17.717
3	Cell Biology	2423	14.038
4	Neurosciences/Neurology	1872	10.846
5	Genetics/Heredity	1681	9.739
6	Zoology	1134	6.570
7	Science & Technology Other Topics	1114	6.454
8	Toxicology	995	5.765
9	Life Sciences/Biomedicine Other Topics	699	4.050
10	Anatomy/Morphology	680	3.940
11	Biotechnology/Applied Microbiology	551	3.192
12	Environmental Sciences/Ecology	549	3.181
13	Marine/Freshwater Biology	513	2.972
14	Physiology	505	2.926
15	Hematology	503	2.914
16	Endocrinology/Metabolism	479	2.775
17	Pharmacology/Pharmacy	429	2.486
18	Biophysics	388	2.248
19	Immunology	355	2.057
20	Ophthalmology	326	1.889
21	Evolutionary Biology	318	1.842
22	Fisheries	268	1.553
23	Research/Experimental Medicine	266	1.541
24	Chemistry	251	1.460
25	Veterinary Sciences	245	1.419

Další zástupci ryb využívaných v laboratořích

- Medaka (*Oryzias latipes*), japonská rýžová ryba
 - Výhody oproti daniu:
 - dvakrát menší genom než dánio (snadnější transgeneze)
 - dokáží žít v teplotách v rozmezí 0°C - 40°C
 - nenáročná na chov
 - kratší generační doba
 - dostupné velké množství inbredních linií
 - 1994 – medaky byly první obratlovci pářící se v kosmu



- Halančík (*Nothobranchius furzeri*)
 - Původem z periodických tůní Zimbabwe a Mozambiku
 - Nejrychlejší životní cyklus u obratlovců – pohlavní dospělosti dosahují 14 dnů po vylíhnutí
 - Žijí pouze 1-5 měsíců



Další informace a zajímavosti

- Příručky chovu Zebřiček v laboratorních podmínkách:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916945/>

<https://www.aaalac.org/pub/?id=E9019693-90EC-FC4A-526E-E8236CC13B28>

- Přehled veškerých molekulárně biologických informací, přes expresi genů, dostupné mutanty, protilátky, publikace a mnoho dalšího

<https://zfin.org/>

Axolotl mexický (*Abystoma mexicanum*)



Úvod

- Třída: obojživelníci (Amphibia)
 - Podtřída: ocasatí (Caudata); řád: axolotli (Ambystomatoidea)
 - Čeď: axolotlovití (Ambystomatoidea)
- Původ: mexická jezera (Lago de Xochimilco a Lago de Chalco)
- Délka těla až 30 cm, charakteristické externí keříčkovité žábry okolo hlavy, na ocase patrný kožní lem
- Pohlavní dimorfismus: samice plnější břicho, samci štíhlejší s viditelnými boulemi v oblasti za zadními končetinami



Výhody

vs.

Nevýhody

axolotla jako experimentálního modelu

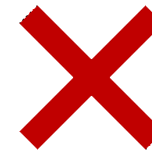


Snadný chov druhu jako takového

Stovky vajíček vyvíjejících se mimo tělo samice

Obrovský regenerační potenciál

Díky absenci pigmentu u některých kmenů možnost přímého pozorování buněk, které jsou díky enormnímu genomu dostatečně velké



Náročný na chov co do prostoru

Dlouhá generační doba (samci rok, samice až rok a půl)

Doba páření omezená jen na určitou část v roce

Genom až příliš velký (10x v porovnání s člověkem) díky namnoženým nekódujícím sekvencím, kódujících pak srovnatelně s jinými obratlovci

Způsob chovu a manipulace

Chov v akváriu:

- pro jednoho axolotla o velikosti 50x40 cm a objemu 40 l
- dno nádrže vystláno štěrkem (štěrk větší než hlava zvířete – hrozí zadušení při pozření)
- na nádrž nesmí dopadat slunce (stínomil)

Voda:

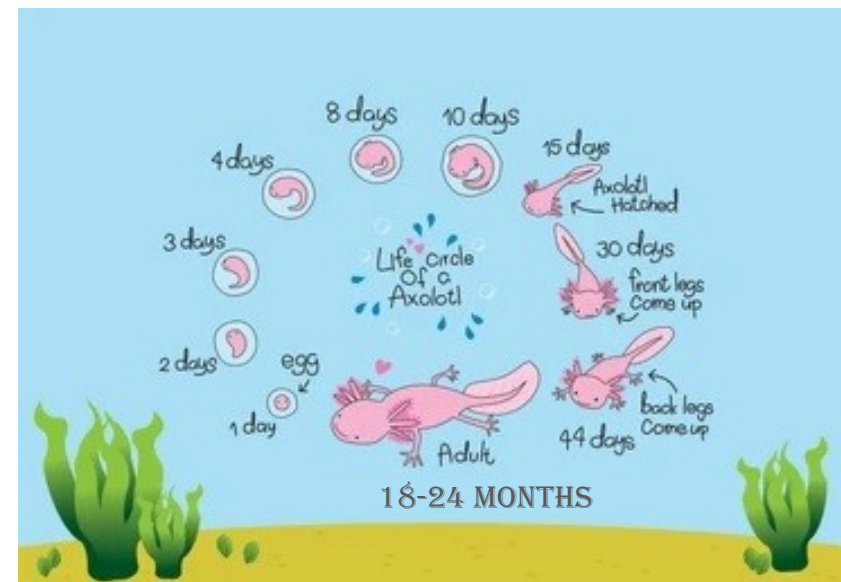
- Sladká, tvrdá, bez chlóru, nutná filtrace, ale bez proudění
- 14-20°C, pH: 6,5-7,7

Krmivo:

- roupice, žížaly, slimáci, nitěnky, měkčí krmný hmyz
- syrové maso teplokrevných zvířat nevhodné

Životní cyklus

- samice pro oplodnění vajíček přijímá kloakou samcův spermatofor (vnitřní oplodnění), následně kladou až 300 vajec
- Axolotlové celý život zůstávají v larválním stádiu, neprocházejí metamorfózou – neotenie
 - Způsobeno nedostatkem hormonu thyroxinu, pro jeho produkci totiž chybí v okolním prostředí základní stavební složka – jóď
 - Umělou aplikací hormonu lze metamorfózu vyvolat
- Pohlavní dospělosti dosaženo mezi 18 a 24 měsíci



Životní cyklus

Stages of *Ambystoma mexicanum* Embryo Development

Cleavage-Blastula

Animal
Lateral

1 2 3 5 6 7 8 9
1-cell 2-cell 4-cell 16-cell 32-cell 64-cell Early Blastula Late Blastula

Gastrula

Dorsal
Veg./Post.

10 10.75 11 12 13

Neurula

Dorsal
Anterior

15 16 17 18 21 22

Early Tailbud

Tailbud

Lateral

24 26 27 28 29 30

Pre-hatched

Lateral

35 36 39 41

Hatched

Dorsal

44 45

Adult

DD

Staging series for *Ambystoma mexicanum*, commonly known as the axolotl, from fertilization through maturation.

Images captured by CD Rogers, PhD & C Christenson of Univ. of Calif., Davis, & N Morrison-Welch of California State Univ., Northridge.

From: *The amazing and anomalous axolotls as scientific models*; Adamson CJ, Morrison-Welch N, Rogers CD. DevDyn 251:6; p. 922-933. DOI:10.1002/dvdy.470

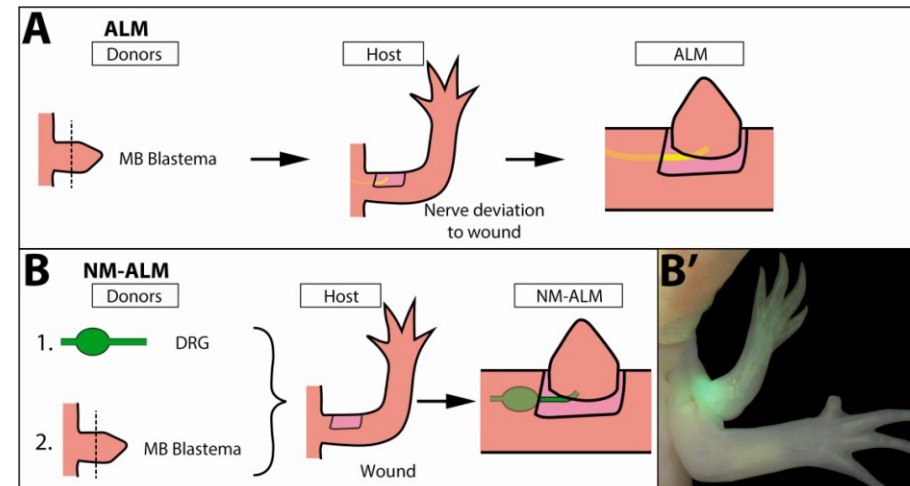
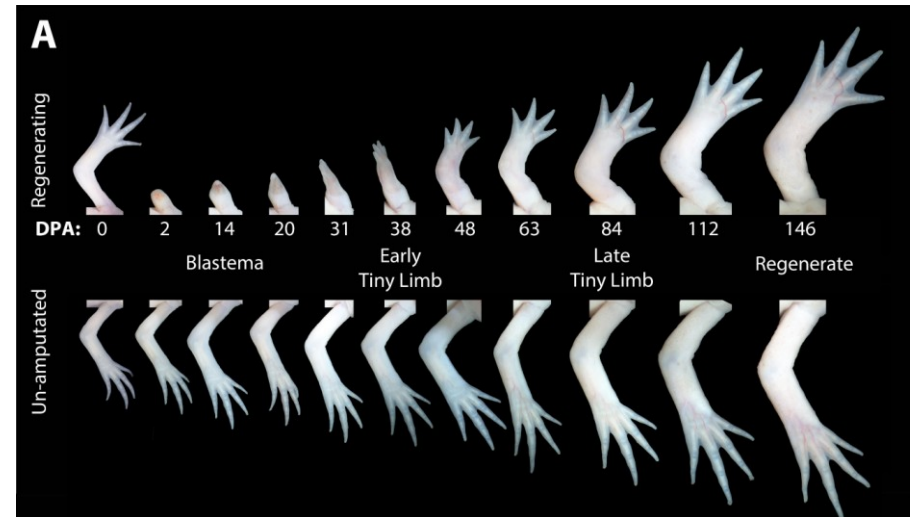
developmentaldynamics.net

WILEY

AAA AMERICAN ASSOCIATION OF ANATOMISTS

Vývojová biologie I

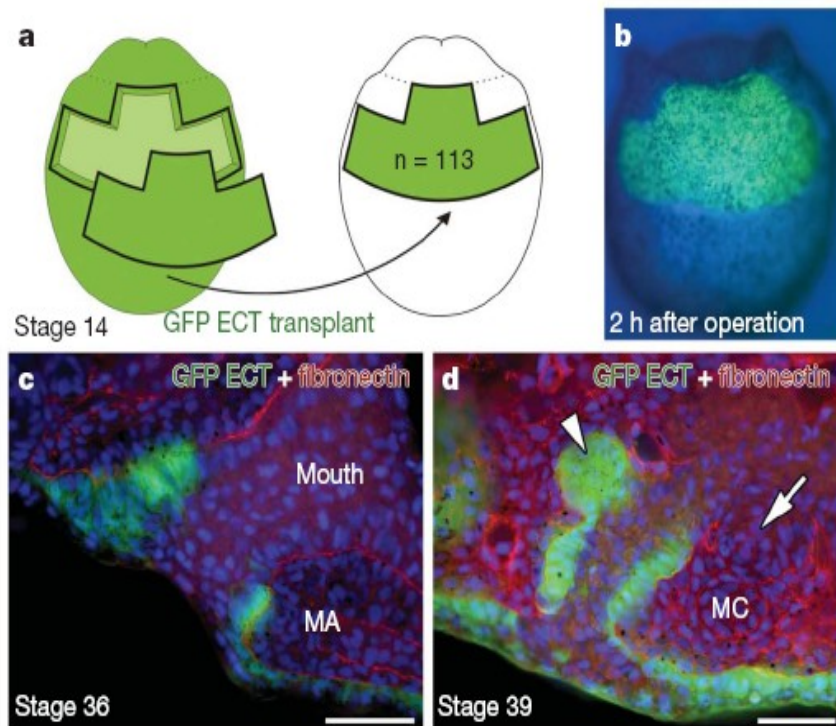
- Studium potenciálu regenerace různých částí těla (ocasů, míchy, končetin, CNS, očí, srdce, mozku) pomocí mnoha experimentálních postupů, včetně transplantací tkáně



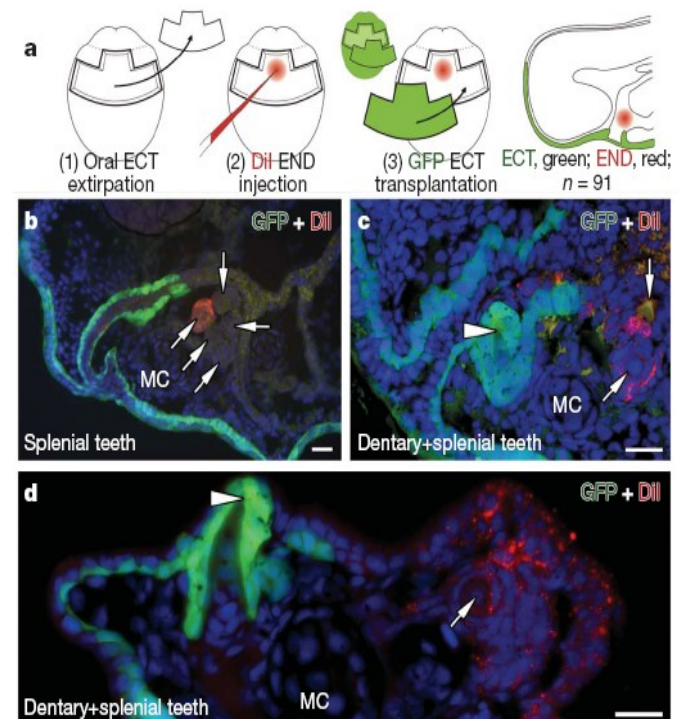
Wells et al., 2021

Vývojová biologie II

- Transplantace tkání transgenních zvířat jako nástroj pro určení původu buněk (fate-mapping)

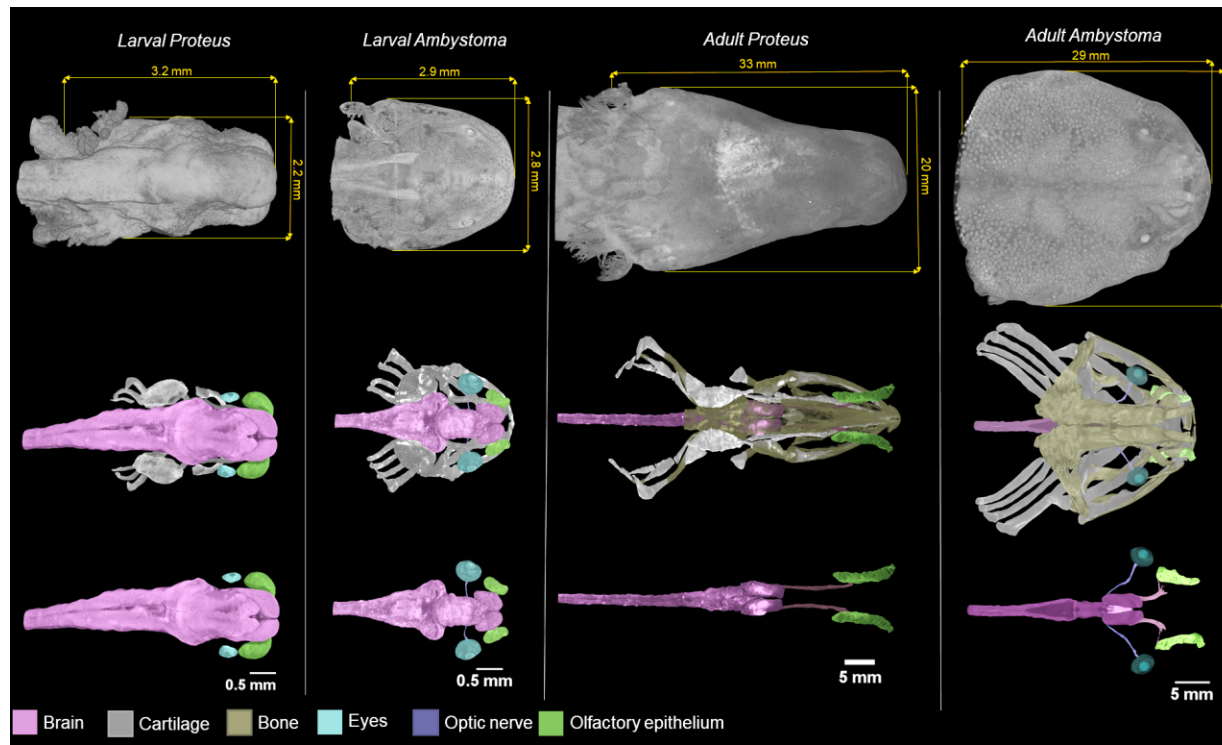


Soukup et al. 2008



Vývojová biologie III

- Studium evo-devo otázek (vývoj larvy macaráta bez očí vs. vývoj axolotla s plně vyvinutým zrakem)



Tesarova et al, 2022

Vývojová biologie III

Proteus anguinus – macarát jeskynní



Další informace a zajímavosti

□ Cesta axolotla do světových laboratoří:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jez.b.22617>

□ Z oficiální webu laboratoře Elly Tanaky:

<http://tanakalab.org/fun/axolotl-poems/>

□ Vše, co jste chtěli vědět o axolotlech, ale báli jste se zeptat:

http://www.axolotl.org/tiger_salamander.htm

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*)



Xenopus

~~Amphibians~~ as a model

1880

In a two-cell stage embryo, each cell has different fate (Wilhelm Roux)

1924

Induction of ectopic tissues through embryonic tissue transplantations (Hans Spemann)

1930

Xenopus laevis females are used for pregnancy tests (South Africa) (Lancelot Hogben)

1940-
1950

Xenopus laevis is the only pregnancy test available

1967

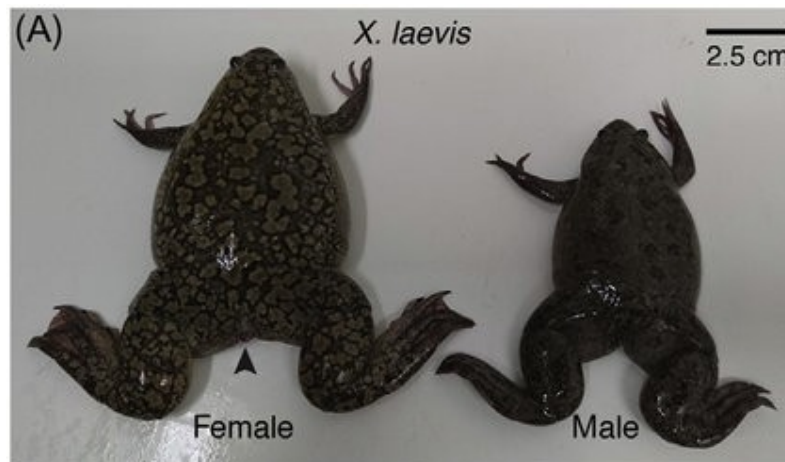
Table of embryonic development of *Xenopus* (Nieuwkoop and Faber)

1980

Molecular biology is crucial to developmental biology (“chemical signals” are actually the “inducing factors” – FGFs , BMPs, Wnts, Shh)

Úvod

- Třída: obojživelníci (Amphibia)
 - Řád: žáby (Anura)
 - Čeď: pipovití (Pipidae)
- Původ: Afrika
- výhradně akvatický druh, zadní nohy (s černými drápkami) jsou proto posunuty až za tělo
- pohlavní dimorfismus: samice větší (10 až 15 cm), samci až o třetinu menší, v době páření pak na předních nohách pářící mozoly, samice pak viditelná kloaka



Výhody

vs.

Nevýhody

drápatky jako experimentálního modelu

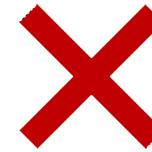


Snadný chov

Možnost uměle indukovat rozmnožování

Vývoj embryí mimo tělo samice a díky jejich velikosti (ø 1mm) snadná manipulace

Rychlý vývoj a velký počet (1500-3000/ samice)



Tetraploidní

Pohlavní zralosti dosahují nejdříve po roce života

Kvalita kladených vajíček s přibývajícím věkem samic klesá

Pro oplodnění samic v laboratorním prostředí nutné zabít samce

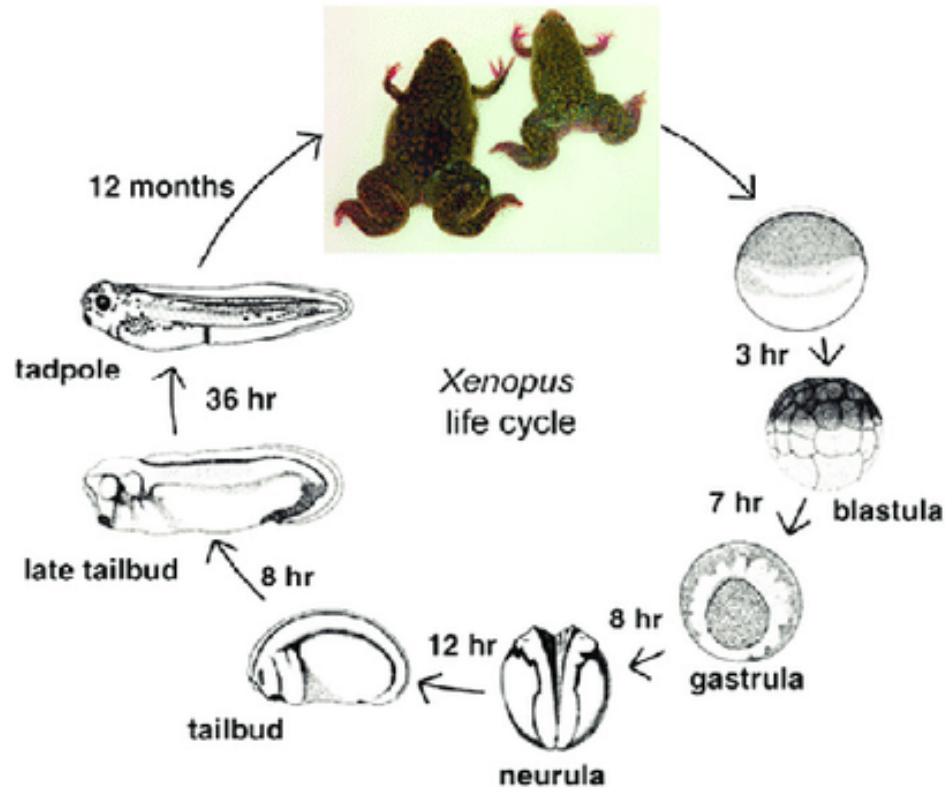
Způsob chovu a manipulace

- Chov v akváriu:
 - Pro chovný pár o velikosti 50x30 (x30) cm
 - Dno nádrže holé nebo s kameny pro úkryt
 - Akvárium je nutné dobře zakrýt – drápatky dobře skáčou

- Voda:
 - Nedoporučuje se používat intenzivní filtrace (přílišné proudění zvířata ruší)
 - 20-24°C, pH: 6-8

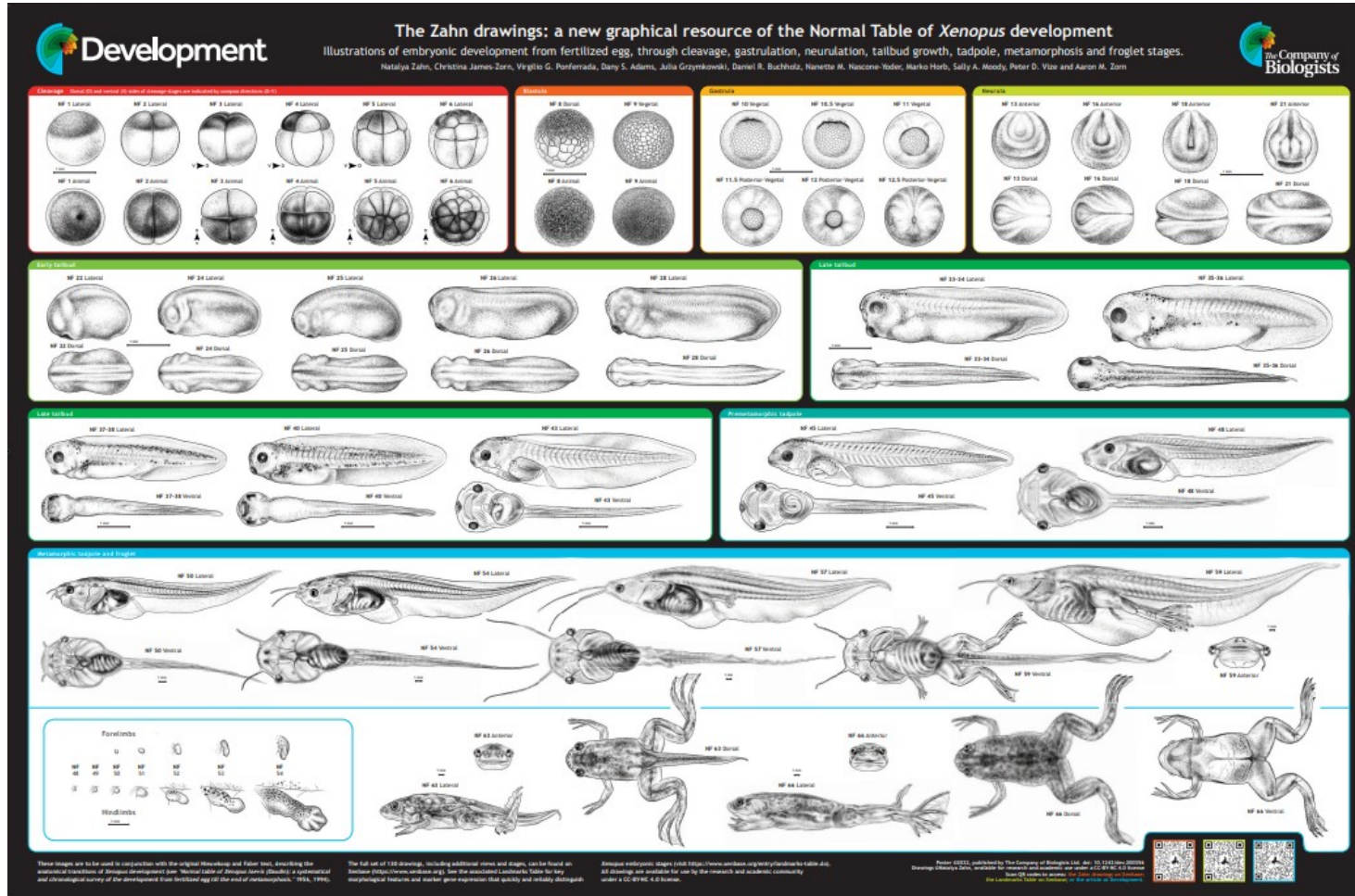
- Krmivo:
 - V přírodě se živí organickými zbytky a hmyzem uvázlým na vodní hladině
 - V zajetí pak krmíme larvami hmyzu, žížalami, drobnými rybkami, rybím file či granulovaným krmivem

Životní cyklus



[This Is How a Tadpole Transforms Into A Frog | The Dodo - YouTube](#)

Životní cyklus

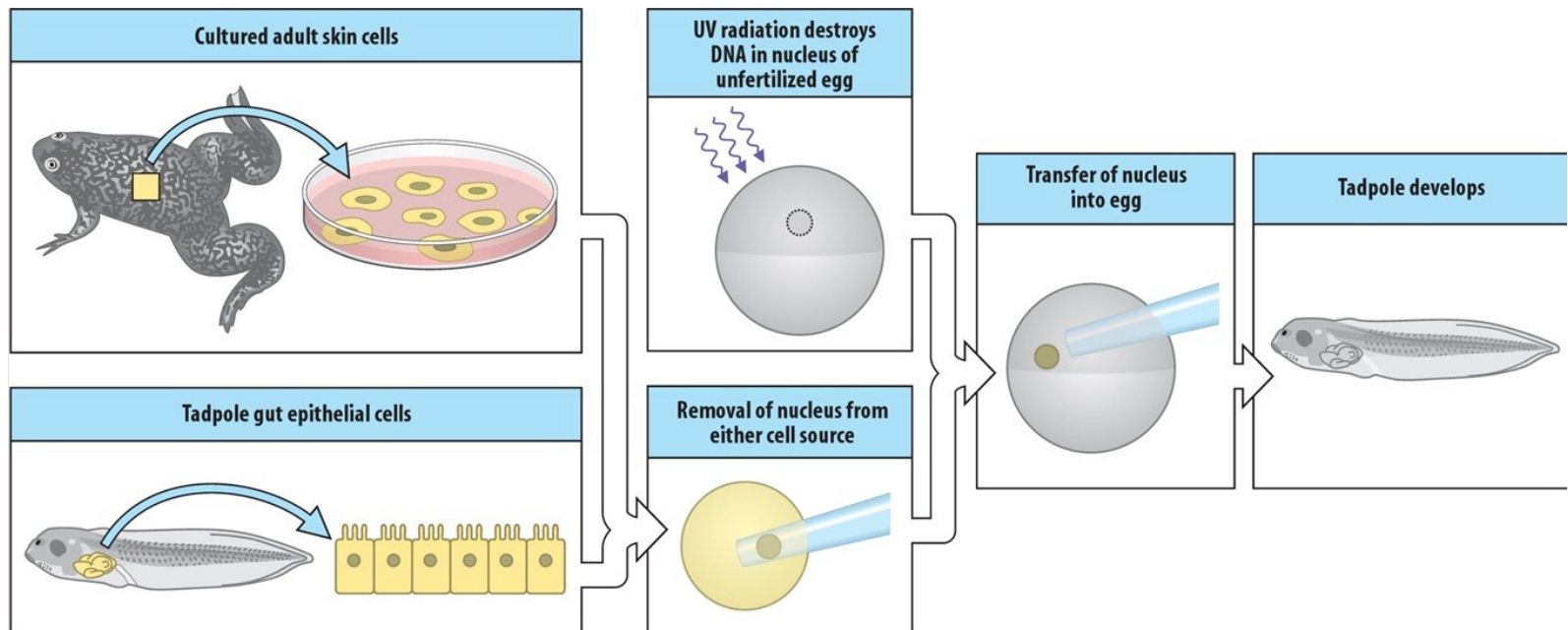


Vývojová biologie

První naklonovaný živočich?

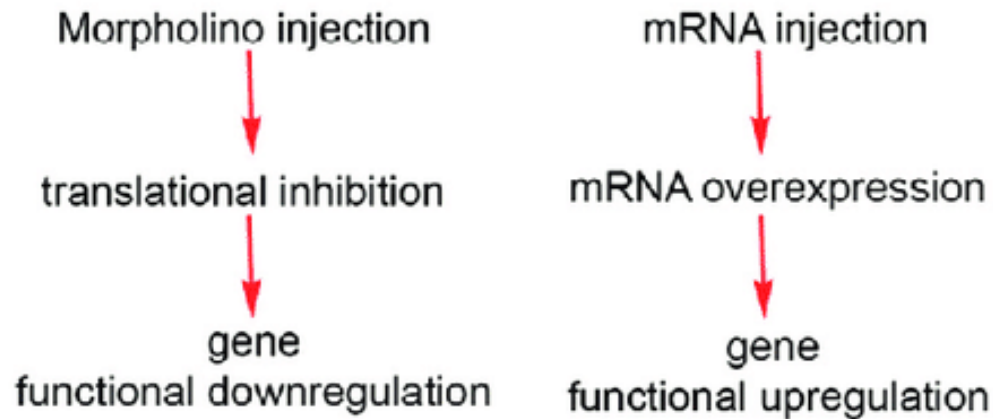
Žába!

□ John Gurdon (1962)

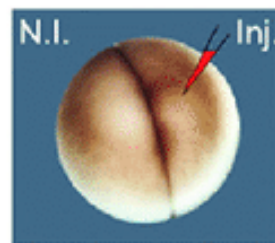


Vývojová biologie

Gene gain- and loss-of-function strategy in *Xenopus*

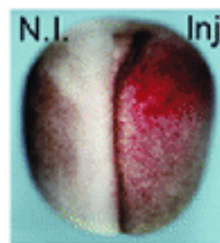


One-side injection



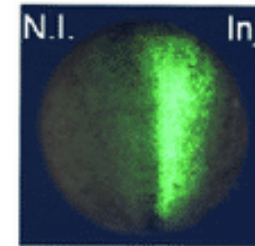
Two cells stage

LacZ



stage 20

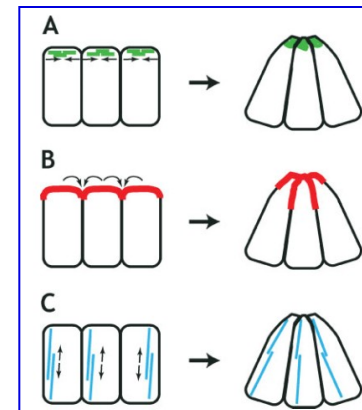
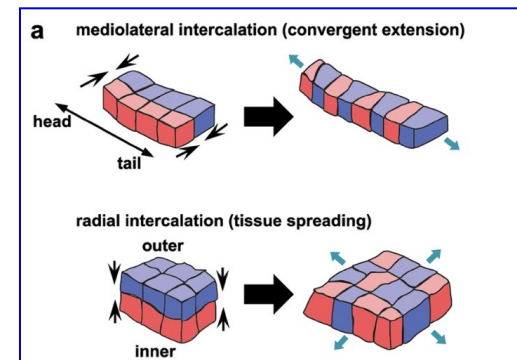
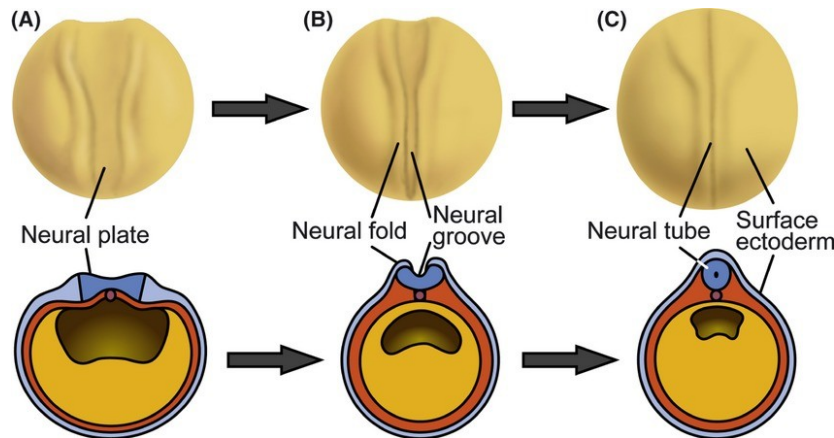
GFP



stage 20

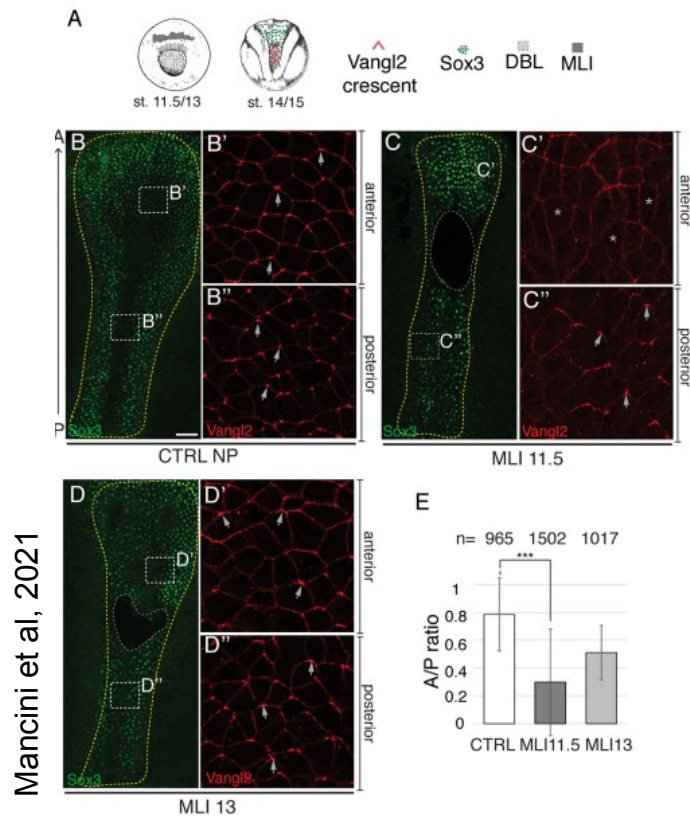
Vývojová biologie

□ Role PCP v raném vývoji embryí obratlovců

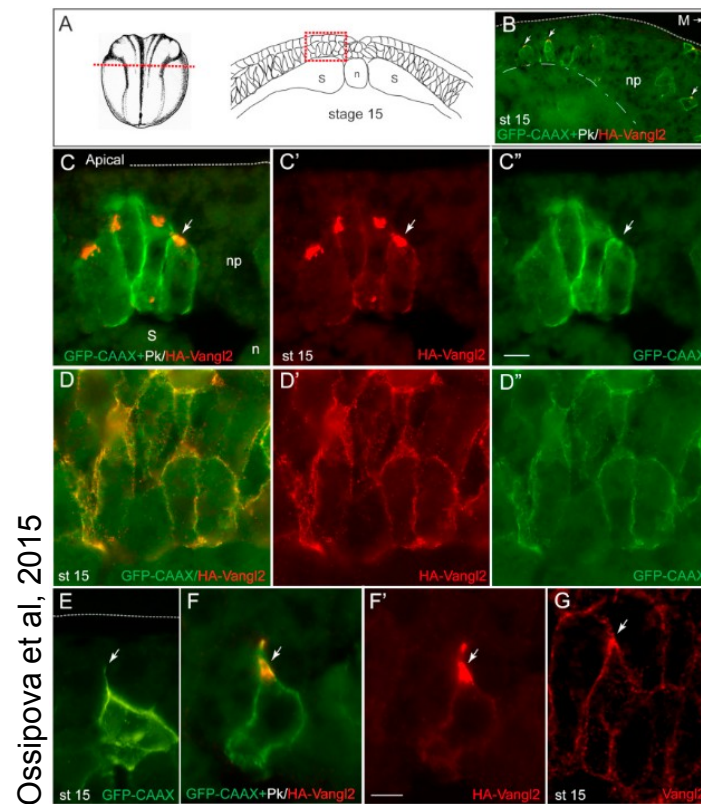


Vývojová biologie

□ Role PCP v raném vývoji embryí obratlovců



Mancini et al., 2021



Ossipova et al., 2015

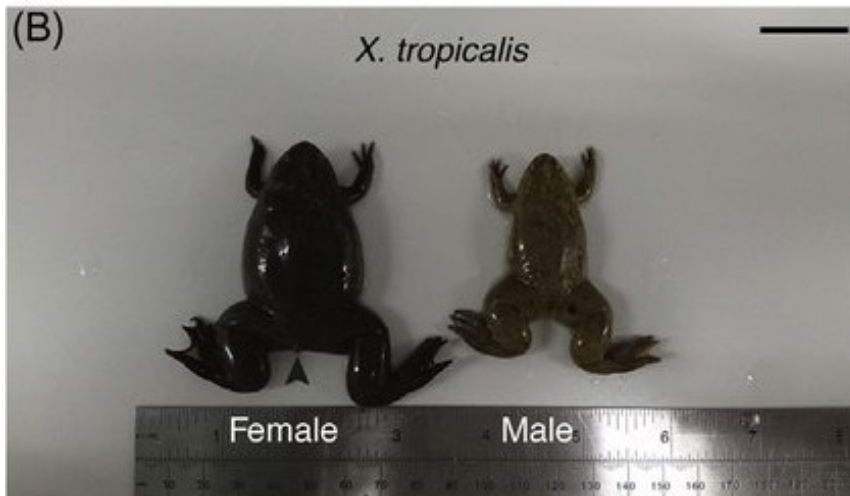
Další informace a zajímavosti

□ Přehled veškerých informací:

<https://www.xenbase.org/entry/>

Další zástupci obojživelníků využívaných v laboratořích

- Drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*)
 - Výhody: diploidní, vzrůstem menší (tedy skladnější), samice kladou více vajíček
 - Nevýhody: až příliš malá (včetně vajíček) – složitější manipulace, teplota vody pro chov vyšší (27-30°C)



	<i>X. laevis</i>	<i>X. tropicalis</i>
Ploidy	Allotetraploid	Diploid
Haploid	18 chromosomes	10 chromosomes
Genome size	3.1×10^9 bp	1.7×10^9 bp
Optimal temp	16–22°C	23–28°C
Adult size	10 cm	4–5 cm
Egg size	1–1.3 mm	0.7–0.8 mm
Brood size	700–2000+	1000–3000+
Generation time	1–2 years	6–12 months

Plazi (*Reptilia*)



Úvod

- Nadřád/Podtřída: Lepidosauria
 - Řád: Squamata (šupinatí plazi – ještěři, hadi)
- Nadřád/Podtřída: Testudines (želvy)
- Nadřád/Podtřída: Archosauria
 - Řád: Crocodylia (krokodýli)

- Heterogenní skupina živočichů, tvoří jednu třetinu všech suchozemských živočichů
- V laboratořích spíše méně obvyklí
- Poikilotermové, tělo kryto šupinami, kladou vejce (vzácně živorodí)
- Pro ještěry a hady typická ekdyze (svlékání), mnozí ještěři jsou pak vybaveni parietálním okem

Výhody

vs.

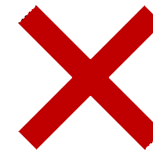
Nevýhody

plazů jako experimentálního modelu



Málo prostudovaní s unikátními vlastnostmi a specifiky

Vývoj *in ovo* mimo tělo samice



Specifické a mnohdy náročné podmínky chovu

Vývoj embryí ve vajíčku enormně dlouhý (půl roku i déle)

Vývoj embryí ve vajíčkách i v rámci jedné snůšky asynchronní

Alligator mississippiensis (Aligátor severoamerický)

- Způsob chovu:
 - Nejčastěji na farmách
 - V případě poklesu teplot se přestávají krmit a jsou schopní hibernace (brumace)
- Životní cyklus:
 - Samice klade až 50 vajec, které se v hnízdě inkubují cca 65 dní
 - Pohlaví mláďat je dáno teplotou v průběhu inkubace
 - Při teplotách nad 34°C a více – samci
 - Při teplotách 30°C a méně - samice
 - Vylíhlá mláďata se zdržují v blízkosti matky až tři roky, pohlavní dospělosti dosahují v osmi letech



Anolis carolinensis (Anolis rudokrký)

- Genom kompletně osekvenován (2014), cca 17 tisíc protein-kódujících genů
- Způsob chovu:
 - Malý, snadno chovatelný (v teráriu se zdrojem světla, tepla a UV zářením), jako potrava drobný hmyz
- Životní cyklus:
 - Samice klade cca 10 vajec měsíc po páření, juvenilové se líhnou po 30-45 dnech inkubace



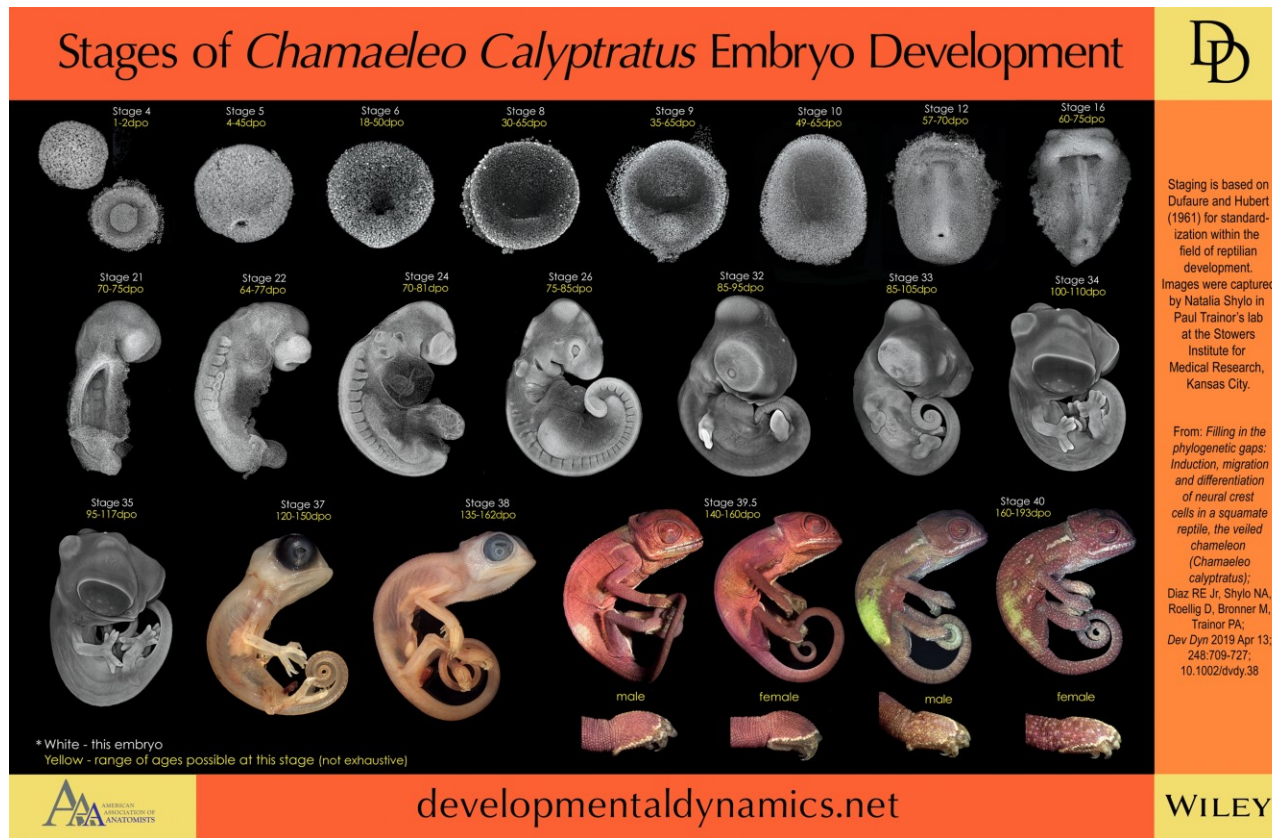
Python sebae (Krajta písmenkovaná)

- Škrtič, v zajetí se dožívá až 20 let, měří až 6 metrů, váhově může dosáhnout i devadesáti kilo
- Pro laboratorní účely méně praktický zástupce hadů
- Způsob chovu a manipulace
 - V teráriu, zdroj světla a tepla, potrava nejčastěji hlodavci
- Životní cyklus:
 - Samice klade jednou do roka 40-100 vajec, ty jsou v době kladení již ve stádiu organogeneze, následuje 80-90 dní inkubace, pak se mláďata líhnou



Další zástupci plazů využívaných v laboratořích

- Chameleon jemenský (*Chamaeleo calyptratus*)



Další zástupci plazů využívaných v laboratořích

- Gekončík noční (*Eublepharis macularius*), Gekon panenský (*Lepidodactylus lugubris*)



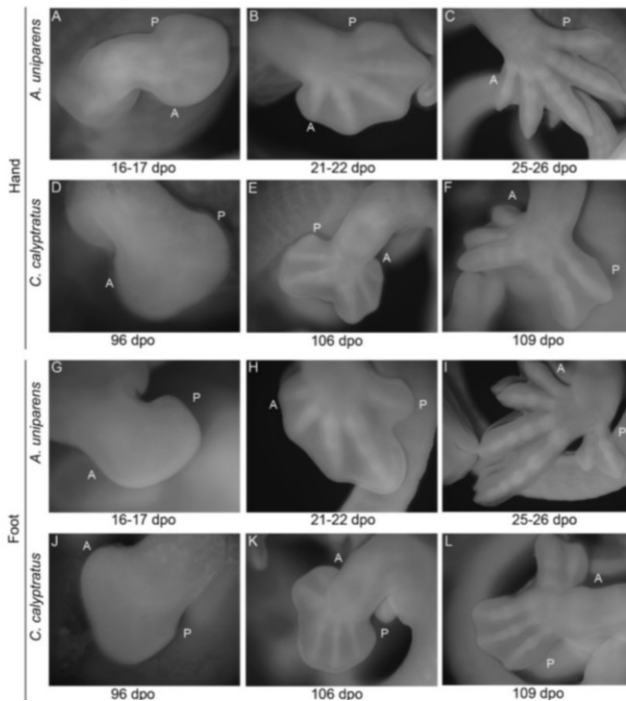
Další zástupci plazů využívaných v laboratořích

- Chameleon jemenský (*Chamaeleo calyptratus*)
- Gekončík noční (*Eublepharis macularius*), Gekon panenský (*Lepidodactylus lugubris*)
- Agama vousatá (*Pogona vitticeps*)
- Užovka červená (*Pantherophis guttatus*)

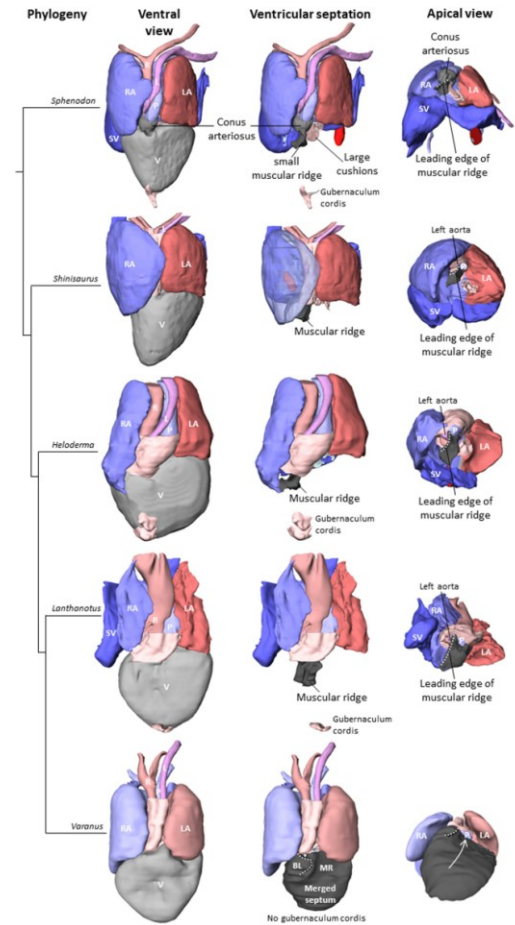
Vývojová biologie I

- Studie popisující mechanismus vzniku morfologických rozdílů (ve velikosti těla, tvaru končetin a orgánů, očí, tvaru a počtu zubů) v rámci evoluce jednotlivých plazích druhů

Diaz et al, 2019



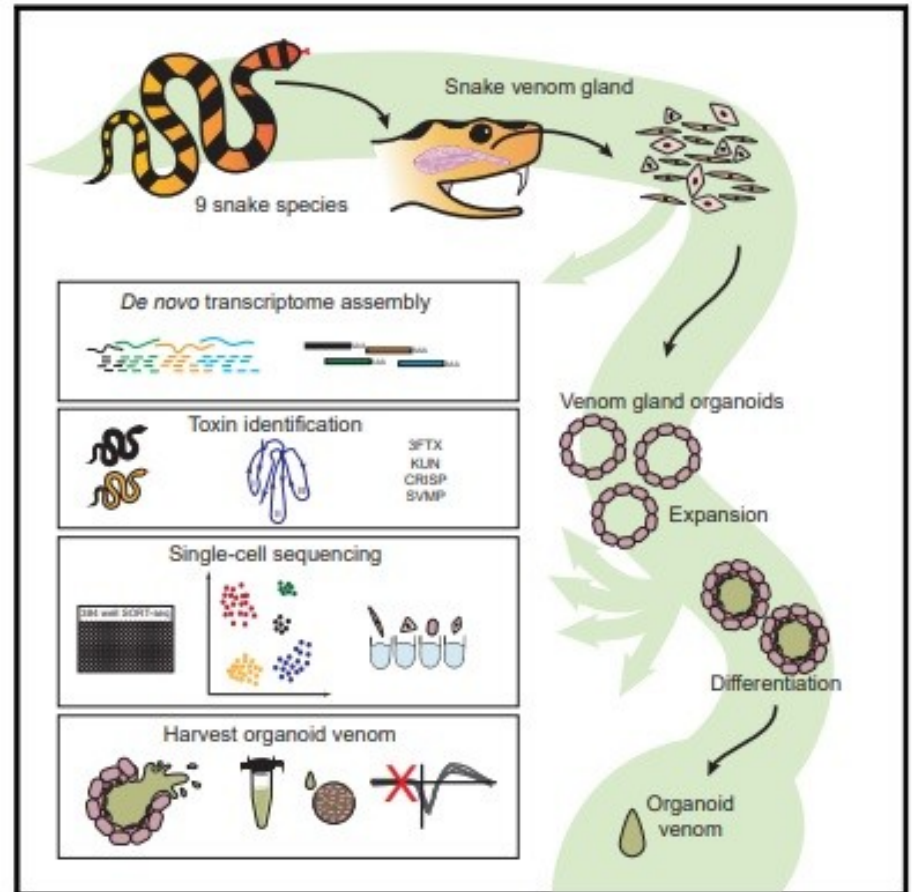
3D models of selected anguimorph species. *Sphenodon* as an outgroup.



Gregorovicova et al, 2022

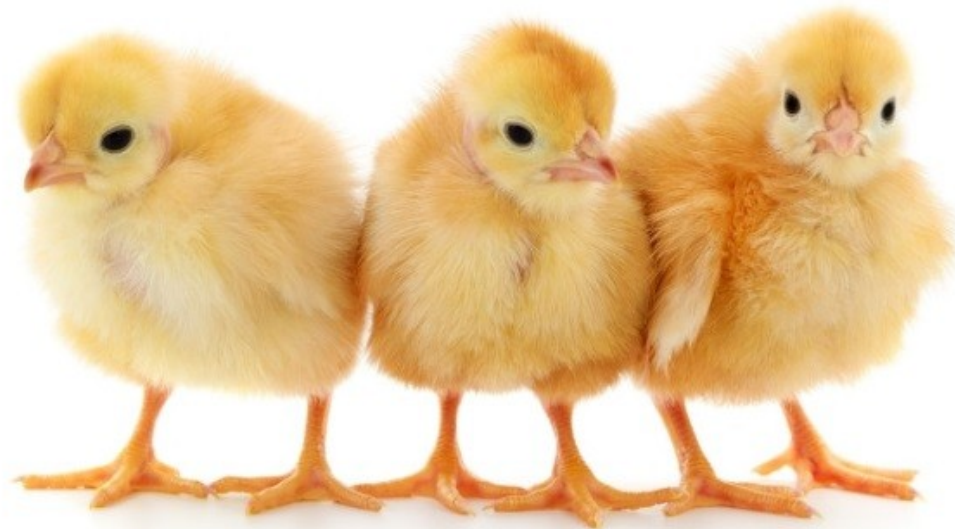
Vývojová biologie III

- Využití přirozených vlastností plazů (jedových žláz hadů a z nich vytvořených organoidů) pro produkci látek potenciálně použitelných v medicíně



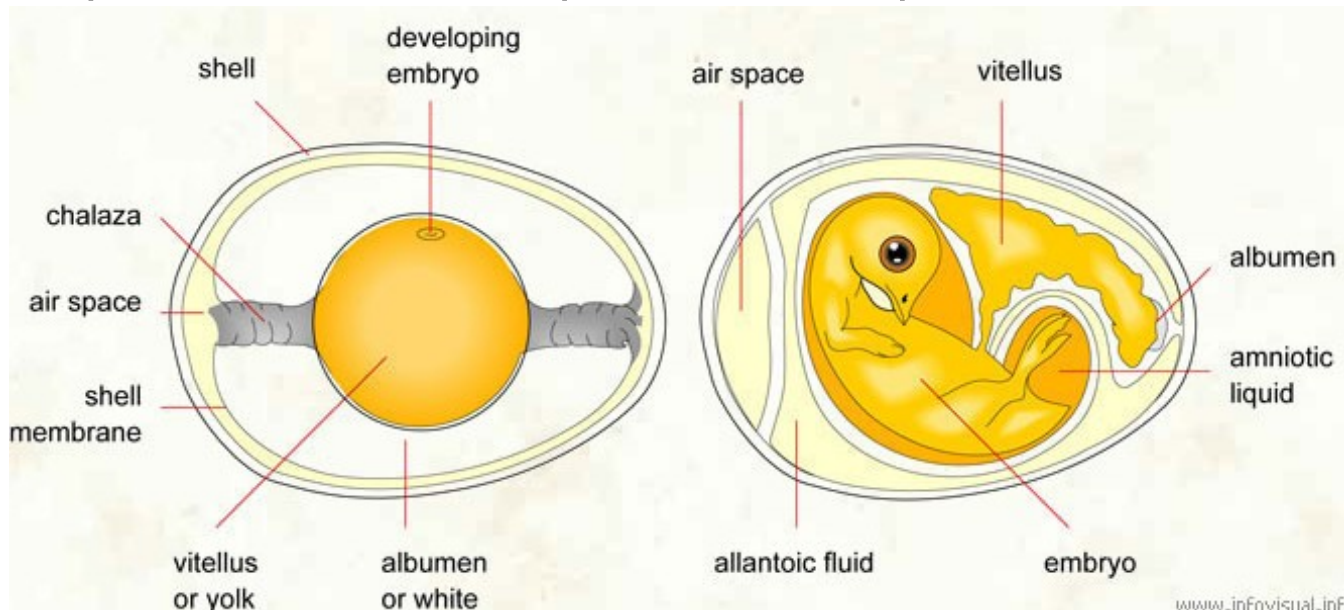
Post et al, 2020

Kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*)



Úvod

- Třída: ptáci (Aves)
 - Podtřída: letci (Neognathae)
 - Řád: hrabaví (Galliformes)
 - Čeď: bažantovití (Phasianidae)
- Pro výzkumné účely se využívá pouze embryí vyvíjejících se uvnitř vajíčka opatřeného tvrdou vápenatou skořápkou



Výhody

vs.

Nevýhody

kura/kuřete jako experimentálního modelu

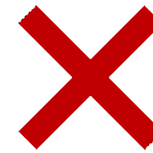


Vývoj embryí in ovo mimo tělo samice

S embryi lze po otevření skořápky manipulovat, po manipulaci lze vývoj průběžně kontrolovat

Embryo lze odebrat v přesně stanoveném stádiu

Kuřecí genom osekvenován (2004)



Samice snáší nižší počet vajíček (cca 5 vajíček/týden)

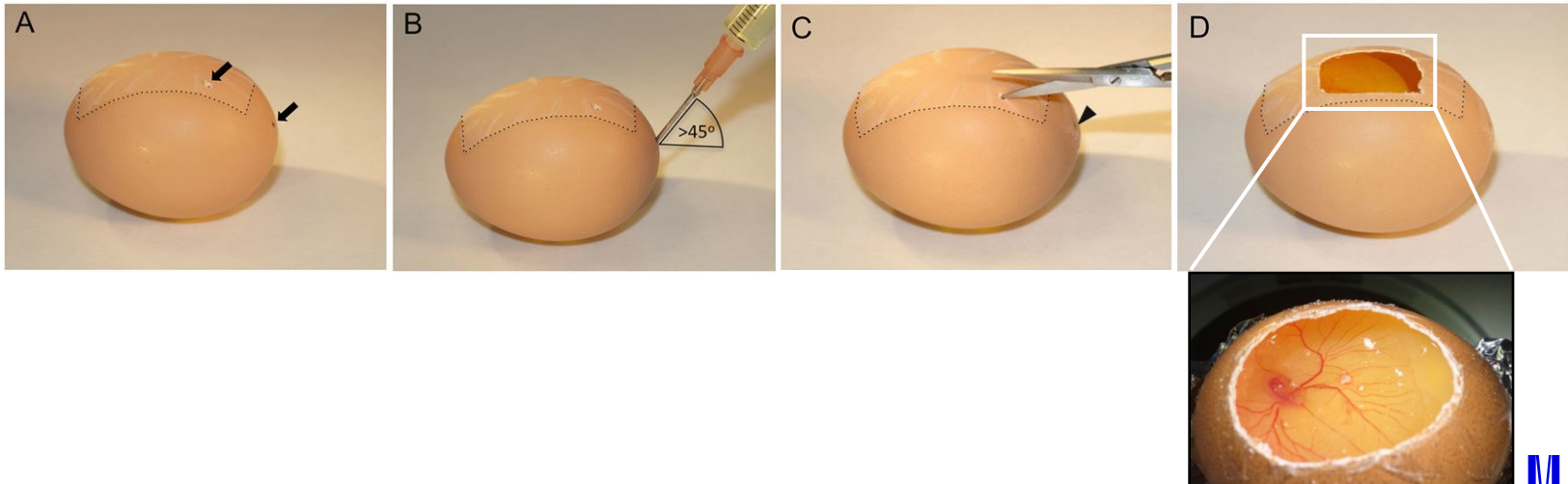
Vysoká úmrtnost embryí po manipulaci

Potenciální chov a generace vlastních (i transgenních) kuřat v laboratorních podmínkách náročný

Práce s kuřecími embryi nesterilní

Způsob chovu (inkubace) a manipulace

- Vývoj embrya v oplodněném vejci v laboratoři začíná vložení vajíček do inkubátoru (38°C, konstantní vlhkost)
 - Vejce musí být položeno na stranu, nesmí stát (A)
 - Po 1,5 dni (cca 36 hodinách = HH 10) odsáváme bílek (embryo klesne) (B), vystříháme drobný otvor do skořápky (C), který následně přelepíme a vejce vracíme zpět do inkubátoru
 - Po cílené manipulaci (injekci, implantaci, transplantaci) přelepíme otvor a inkubujeme do odběru (D)



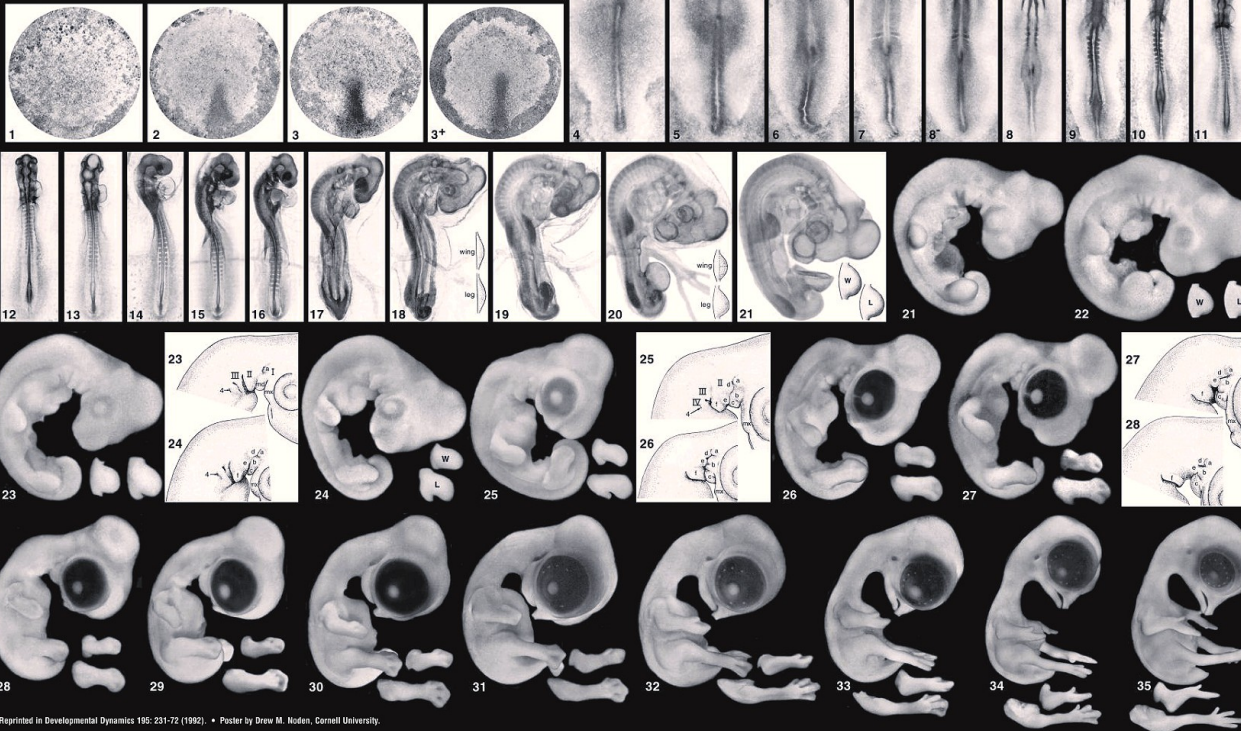
Životní cyklus aka Hamburger Hamilton Stages

Normal Stages of Chick Embryo Development

IN MEMORY OF VIKTOR HAMBURGER: 1900-2001



V. Hamburger and H.L. Hamilton, 1951.
A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49-92.*



Stages*	Age*	Key Features
1	0 hr.	pre-streak
2	6 hr.	triangular streak
3, 3+	12 hr.	mid-streak
4	16 hr.	fully elongated streak
5	19 hr.	head process
6	23 hr.	head fold
7	24 hr.	1 somite
8-8	26 hr.	3 somites, 4 somites
9	29 hr.	7 somites
10	33 hr.	10 somites, optic vesicles
11	42 hr.	13 somites
12	47 hr.	16 somites; head turning
13	50 hr.	18 somites, amnion covers brain
14	52 hr.	22 somites; midbrain flexure 90°
15	56 hr.	optic cup
16	62 hr.	tail bud straight
17	66 hr.	wing and leg buds
18	68 hr.	amnion closing
19	3 d.	somites extend into tail bud
20	3+ d.	allantoic vesicle
21	3.5 d.	maxillary prominence
22	4 d.	eye pigmented
23	4 d.	limb length = width
24	4 d.	2nd is largest pharyngeal arch
25	4+ d.	knee and elbow flexions
26	4.5 d.	rostral and caudal contours of digital regions evident
27	5 d.	dorsal interdigital grooves
28	5.5 d.	beak evident
29	6 d.	mandibular and 2nd arches fused
30	6.5 d.	egg tooth visible
31	7 d.	feather papillae on dorsum and leg
32	7.5 d.	4-6 scleral papillae
33	7.5+ d.	13 scleral papillae
34	8 d.	nictitating membrane visible
35	9 d.	nictitating membrane approaches scleral papillae

*Incubation times vary with poultry strain, incubator temperature, and length of storage.

*Reprinted in *Developmental Dynamics* 195: 231-72 (1992). • Poster by Drew M. Noden, Cornell University.



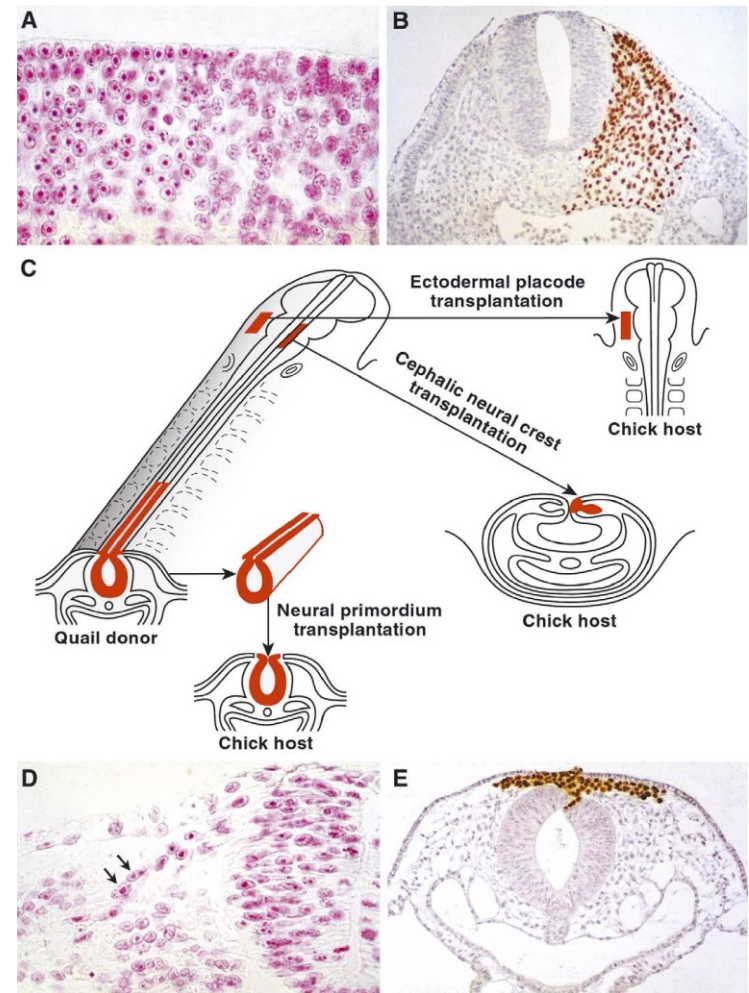
developmentaldynamics.net



MUNI
SCI

Vývojová biologie I

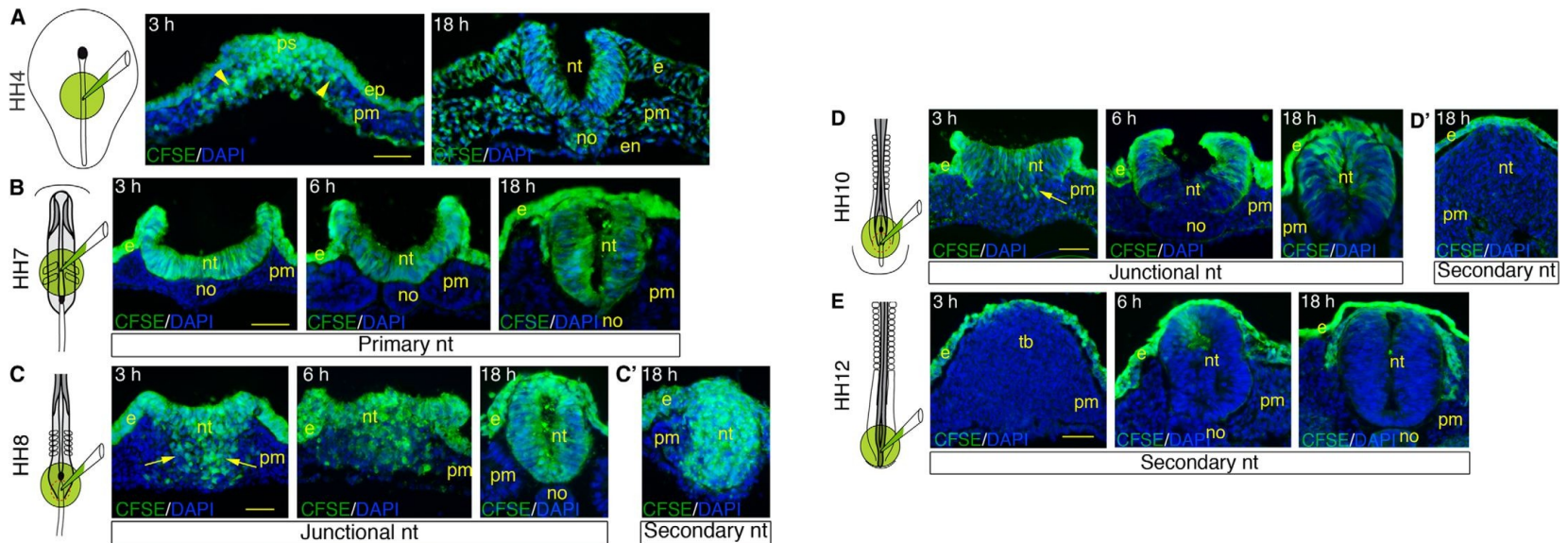
- Tvorba chimér (transplantací části křepelčí neurální lišty na stejné místo stejně starého kuřecího embrya) jako nástroj sledování osudu buněk



Le Douarin et al, 2004/1969

Vývojová biologie II

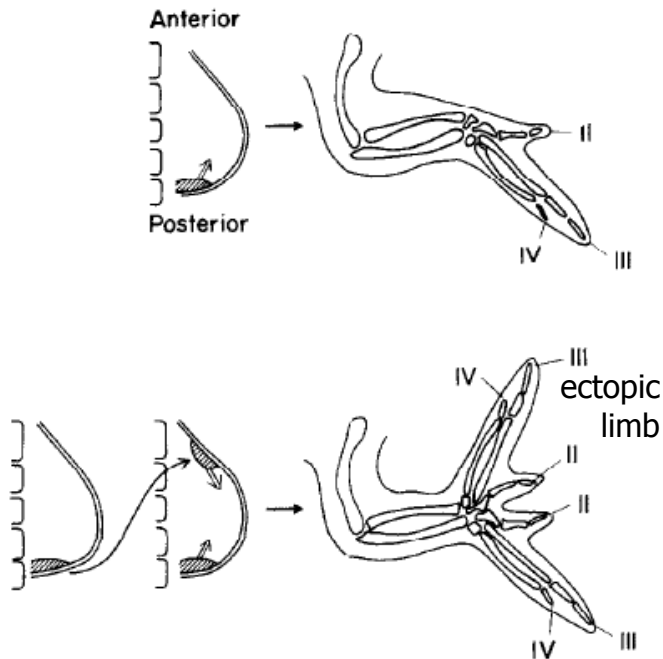
- Využití kuřecího modelu pro studium původu defektů při formování nervové trubice



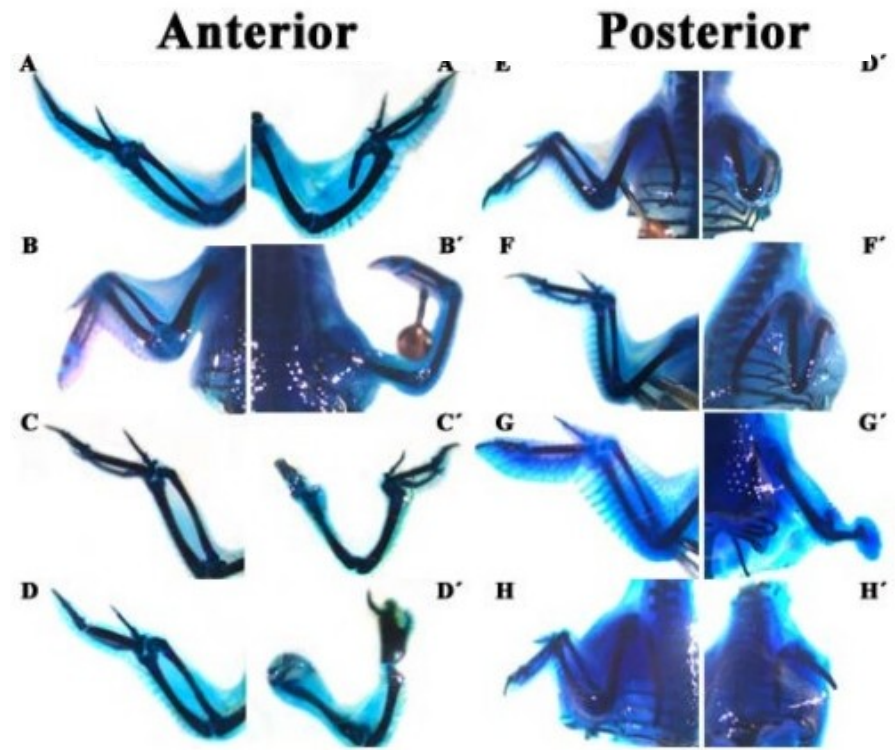
Dady et al, 2014

Vývojová biologie II

- Využití kuřecího modelu pro studium vývoje a formování končetin a využití znalostí tohoto procesu pro studium účinku růstových faktorů či toxikologické studie



Riddle et al, 1993



Killinger, 2018

Další zástupci ptáků využívaných v laboratořích

- Křepelka japonská (*Coturnix japonica*)
- Křepelka polní (*Coturnix coturnix*)

Další informace a zajímavosti

□ Databáze exprese genů ve vyvíjejícím se kuřecím embryu:

<http://geisha.arizona.edu/geisha/>

□ Roslin Institut

<https://www.ed.ac.uk/roslin/national-avian-research-facility>

Myš domácí (*Mus musculus* var. *alba*)



Úvod

- Třída: savci (Mammalia)
 - Řád: hlodavci (Rodentia)
 - Čeď: myšovití (Muridae)
- Pohlavní dimorfismus: samice drobnější, pohlavní otvor blíž análnímu otvoru (cca 5 mm), samci robustnější, pohlavní otvor od análního otvoru cca 15 mm



Výhody

vs.

Nevýhody

myši jako experimentálního modelu



Savec, nejpodobnější člověku (20 párů chromozomů, 99% genů stejných)

„Skladná“, snadný a levný chov

Krátká doba březosti, rychlé dosažení pohlavní zralosti

Možnost vytvoření transgenních myších modelů



Mnoho fyziologických odlišností

Nutnost zabít matku při odběru embryí

Rychlé stárnutí

Některé genetické modifikace embryonálně letální

Způsob chovu a manipulace I

- Nenáročný, v klecích s podestýlkou, granule, čerstvá voda, světelný režim 12/12, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, enrichment, pravidelná výměna steliva a vody (1x týdně)
- Rozlišujeme:
 - **Otevřený (konvenční) chov**: pohyb zvířat, materiálu a pečujících osob volný, pouze se zvýšenými hygienickými opatřeními
 - **Bariérový chov**: prostor s chovem zvířat je oddělen od vnějšího prostředí bariérou, přes kterou prochází jak pracovníci, tak zvířata, veškerý materiál (potrava, podestýlka, apod.) se sterilizují, nutná zvýšená hygiena, zvířata jsou testována na přítomnost patogenů (SPF – specified pathogen free)
 - **Izolátorový chov**: prostor pro zvířata je trvale oddělen bariérou jak od vnějšího prostředí, tak od chovatelů, typicky pro imunodeficientní myši, axenické (germ-free) a gnotobiotické myši (s definovaným složením střevní mikroflóry)

Způsob chovu a manipulace I

- **Isogenní = geneticky definované kmeny** (isogenicita=genetická totožnost všech jedinců)
 - **inbrední kmeny**: vznik příbuzenskou plemenitbou po více než 20 generací (bratr a sestra nebo rodič a potomek), geneticky identičtí jedinci
 - **koizogenní (=mutantní) kmeny**: od původního kmene se liší jen v jednom genu, ve kterém došlo k mutaci
 - **kongenní kmeny**: vznik křížením dvou kmenů a následným zpětným křížením, výskyt specifických genů jednoho kmene na pozadí kmene druhého
- **Neisogenní = geneticky nedefinované kmeny**
 - **outbrední linie**: geneticky heterogenní populace, vyhýbáme se příbuzenskému křížení, tak aby koeficient inbreedingu zůstal co nejnižší, vhodné pro behaviorální pokusy
- Nejčastěji využívané kmeny laboratorních myší: C57BL/6J (inbrední), BALB/c (produkce monoklonálních protilátek), C3H/HeJ, FVB/NJ

Způsob chovu a manipulace



ANO

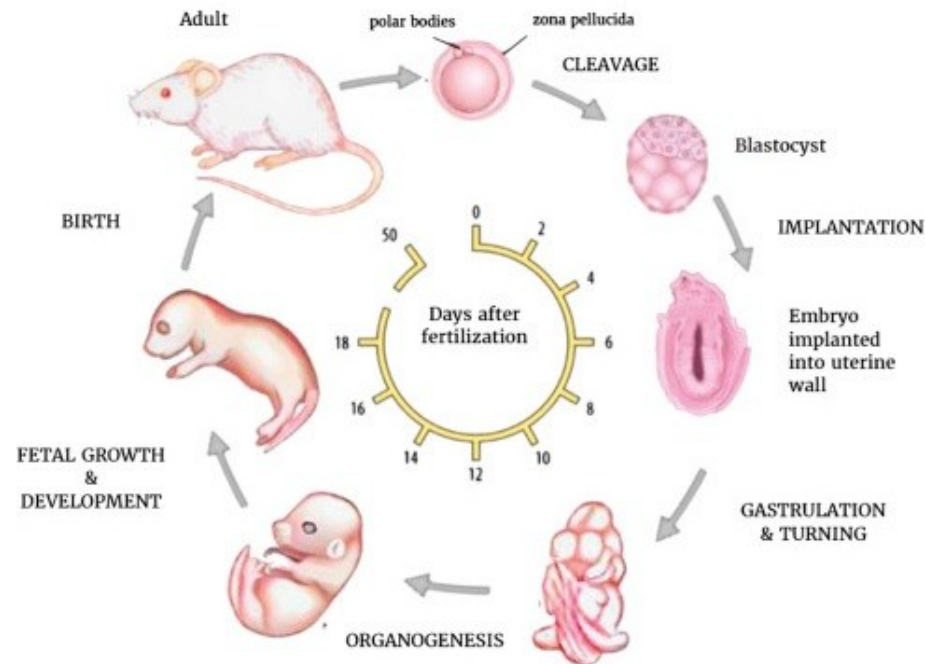


NE

<https://www.youtube.com/watch?v=GsbUnPQEc>

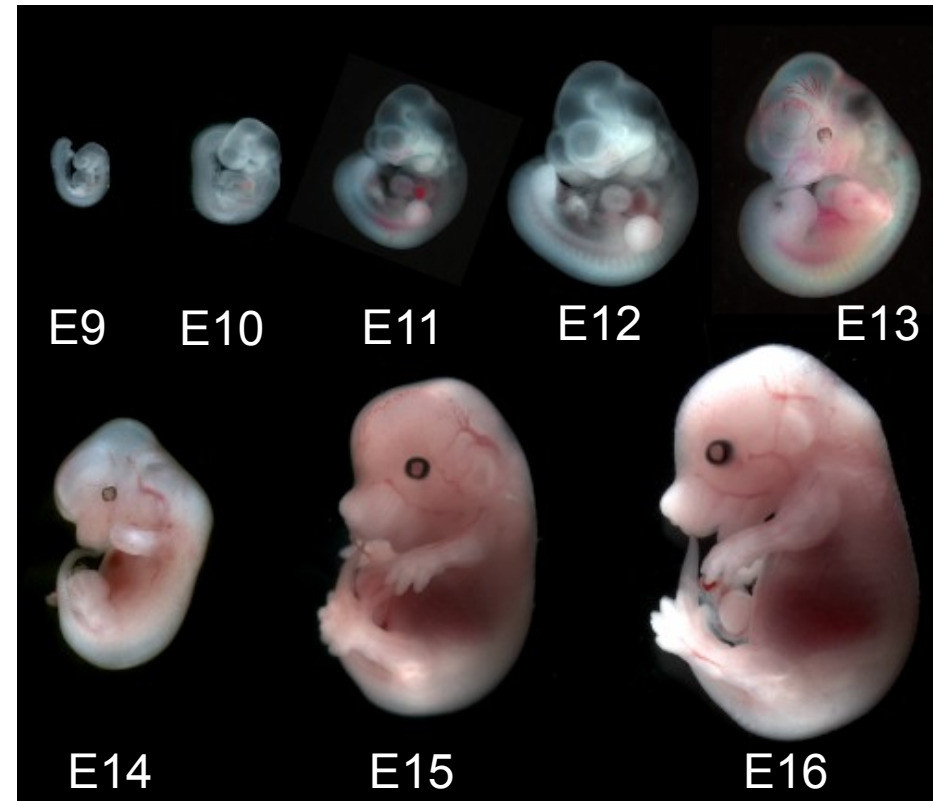
Životní cyklus I

- Gestace – 19-21 dní, odstav mláďat v 3-4 týdny
- Pohlavní dospělost – 6-7 týdnů
- Generační doba – 2-3 měsíce
- Estrus – polyestrální, cyklus se opakuje každých 4-5 dní
- Samice dvojitá děloha (uterus duplex)
- Počet mláďat ve vrhu 4-10
- Průměrná délka života – až 2 roky



Životní cyklus II - embryogeneze

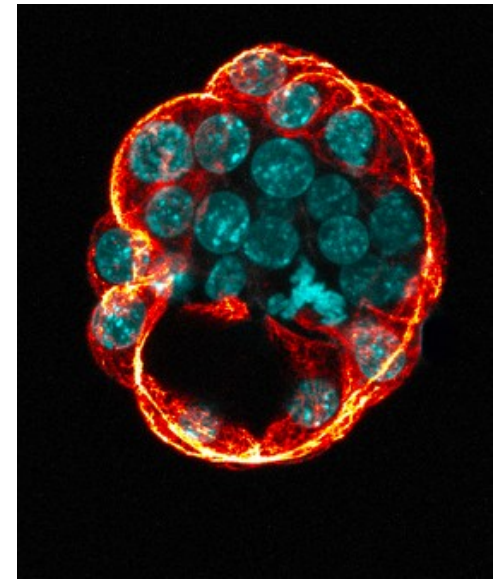
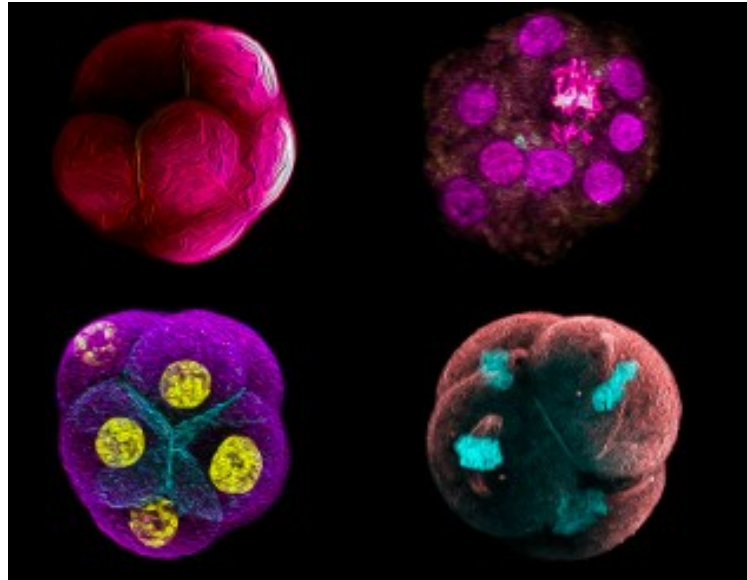
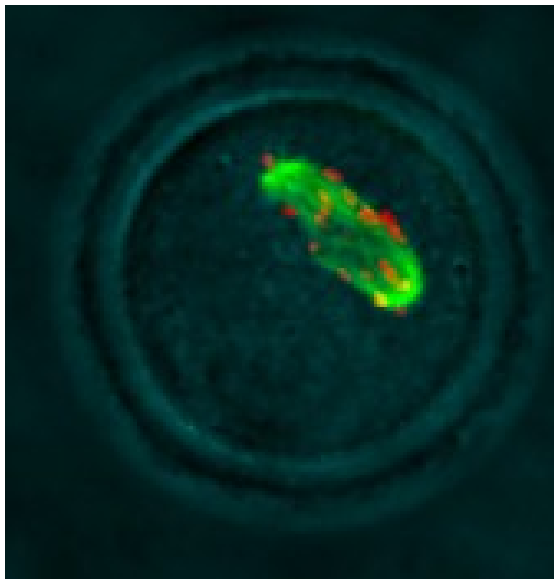
- E9: rozeznatelný hrudní končetinový pupen
- E10: rozeznatelný pánevní a ocasní končetinový pupen, z prvního faryngeálního oblouku vzniká mandibula
- E11: formování základů patrových plotének z výběžku maxily
- E12: lze rozeznat jednotlivé články prstů, ty stále spojeny, formování základů zubů
- E13: rozvětvení plic, apoptóza interdigitálních prostor (mezi prsty)
- E14: patrové ploténky se narovnávají a srůstají
- E15: otevírají se oční víčka
- E16: osifikace, oční víčka i nosní dutina se opět zavírají



Vývojová biologie

Studium preimplantačního vývoje oocytů

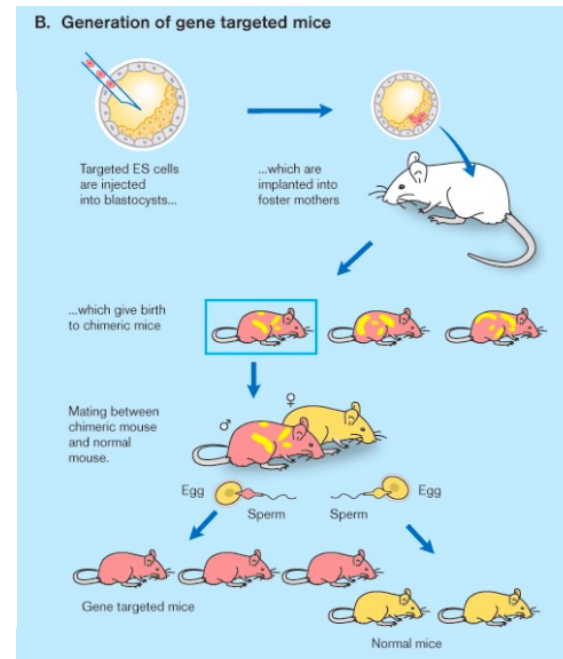
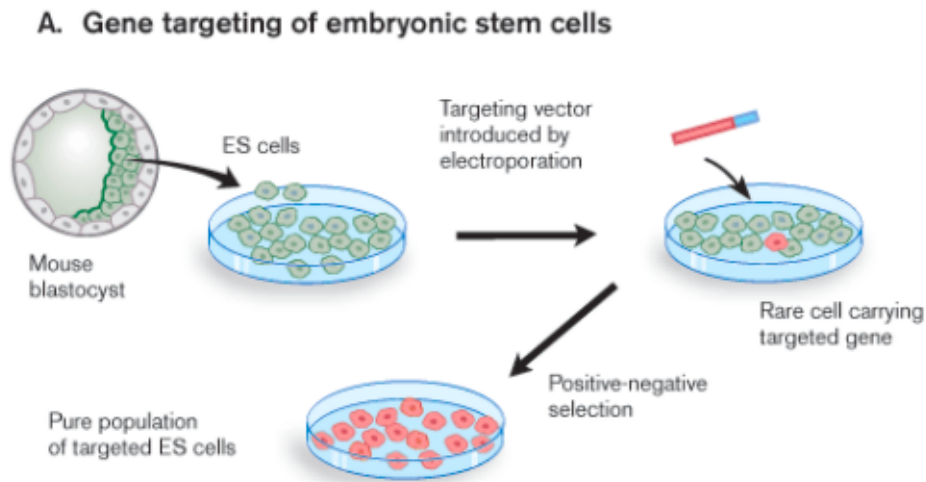
- Různá témata pokrývající jak samotný proces oplození, tak jednotlivé kroky rýhování buněk embrya



Vývojová biologie

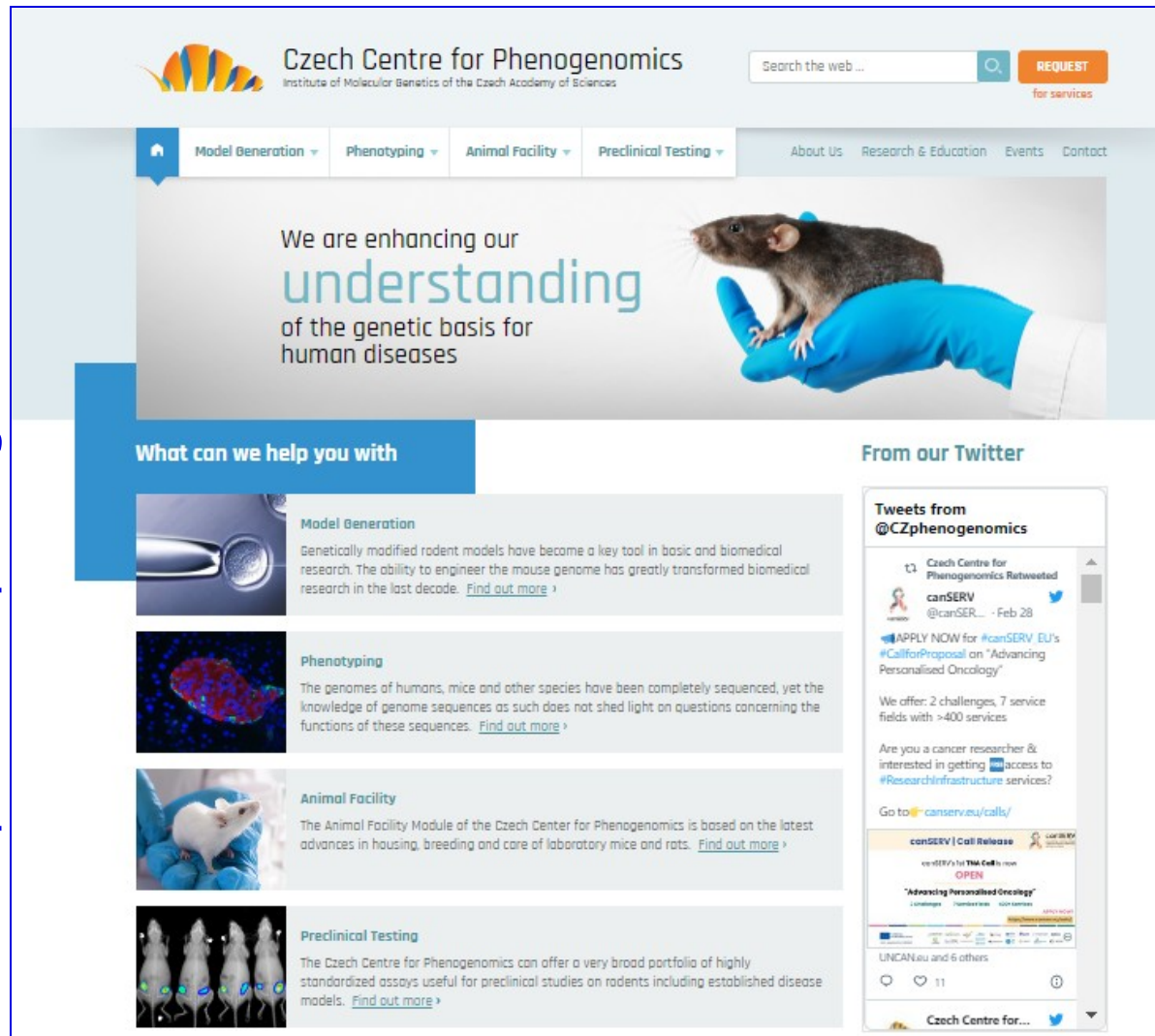
Nobelova cena za fyziologii a medicínu (2007): Capecchi, Evans, Smithies

- objev principů vnesení genových modifikací do myšního modelového organismu s využitím embryonálních kmenových buněk



Vývojová biologie

<https://www.phenogenomics.cz/>



Czech Centre for Phenogenomics
Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences

Search the web... **REQUEST**
for services

Model Generation ▾ Phenotyping ▾ Animal Facility ▾ Preclinical Testing ▾

About Us Research & Education Events Contact

We are enhancing our **understanding** of the genetic basis for human diseases

What can we help you with

- Model Generation**
Genetically modified rodent models have become a key tool in basic and biomedical research. The ability to engineer the mouse genome has greatly transformed biomedical research in the last decade. [Find out more](#) >
- Phenotyping**
The genomes of humans, mice and other species have been completely sequenced, yet the knowledge of genome sequences as such does not shed light on questions concerning the functions of these sequences. [Find out more](#) >
- Animal Facility**
The Animal Facility Module of the Czech Center for Phenogenomics is based on the latest advances in housing, breeding and care of laboratory mice and rats. [Find out more](#) >
- Preclinical Testing**
The Czech Centre for Phenogenomics can offer a very broad portfolio of highly standardized assays useful for preclinical studies on rodents including established disease models. [Find out more](#) >

From our Twitter

Tweets from @CZphenogenomics

Czech Centre for Phenogenomics Retweeted
canSERV
@canSERV... - Feb 28

▶ **APPLY NOW** for #canSERV EU's #CallforProposal on "Advancing Personalised Oncology"

We offer: 2 challenges, 7 service fields with >400 services

Are you a cancer researcher & interested in getting access to #ResearchInfrastructure services?

Go to canserv.eu/calls/

canSERV | Call Release
canSERV's 1st TMA Calls now **OPEN**
"Advancing Personalised Oncology"
2 challenges | 7 service fields | 400 services

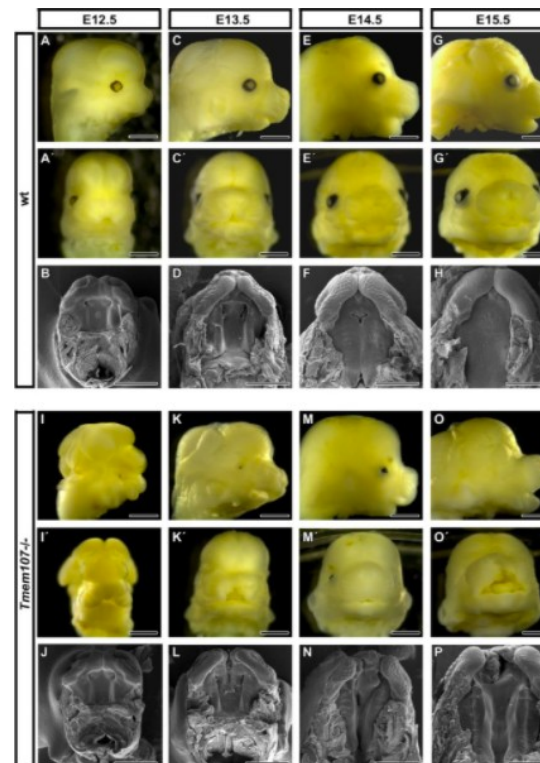
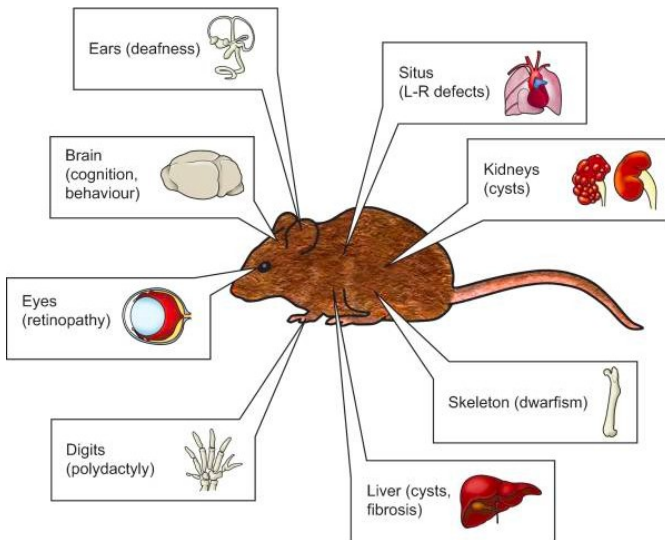
UNICAN.eu and 6 others

Czech Centre for...

Vývojová biologie

Myší modely lidských vývojových onemocnění – ciliopatie

- Vývojové defekty způsobené chybou činností cílů
- Pro studium podstaty těchto defektů a možné léčby vytvořeny transgenní myši nesoucí mutace v různých genech souvisejících s fyziologií cílů



Cela et al, 2018

Další informace a zajímavosti

<https://www.mousephenotype.org/>

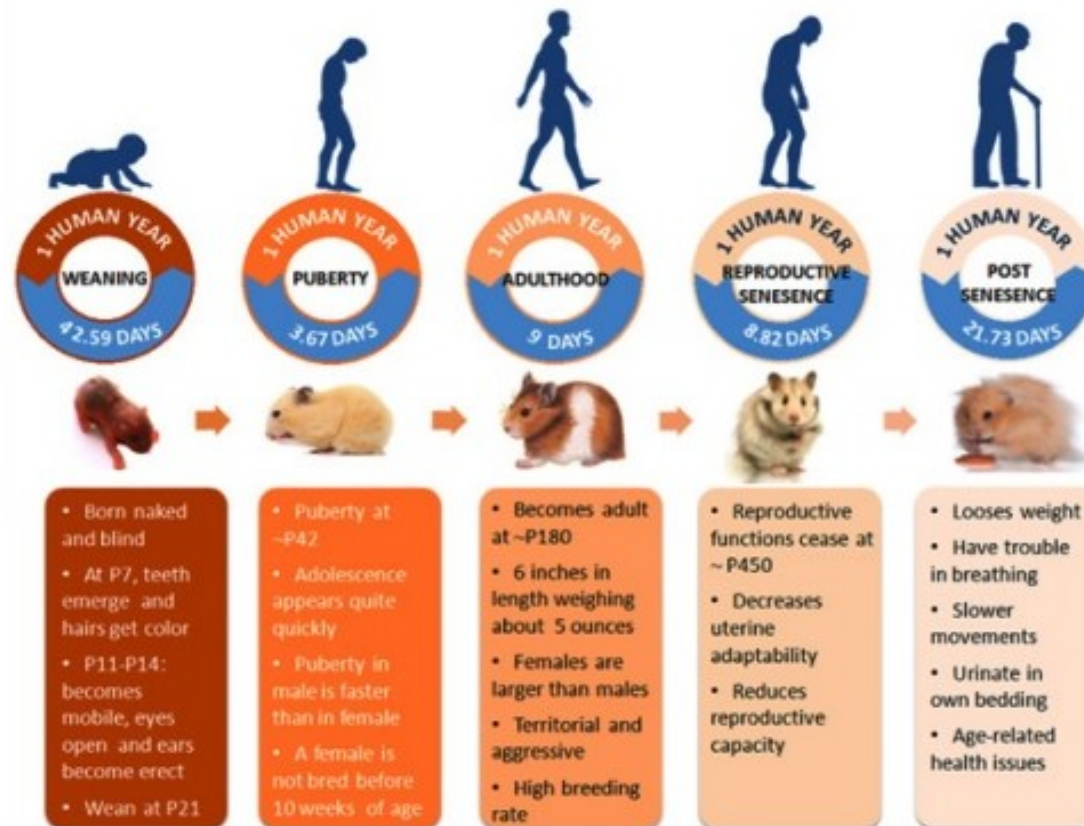
<https://www.jax.org/>

□ Příručka správné manipulace s laboratorními myšmi

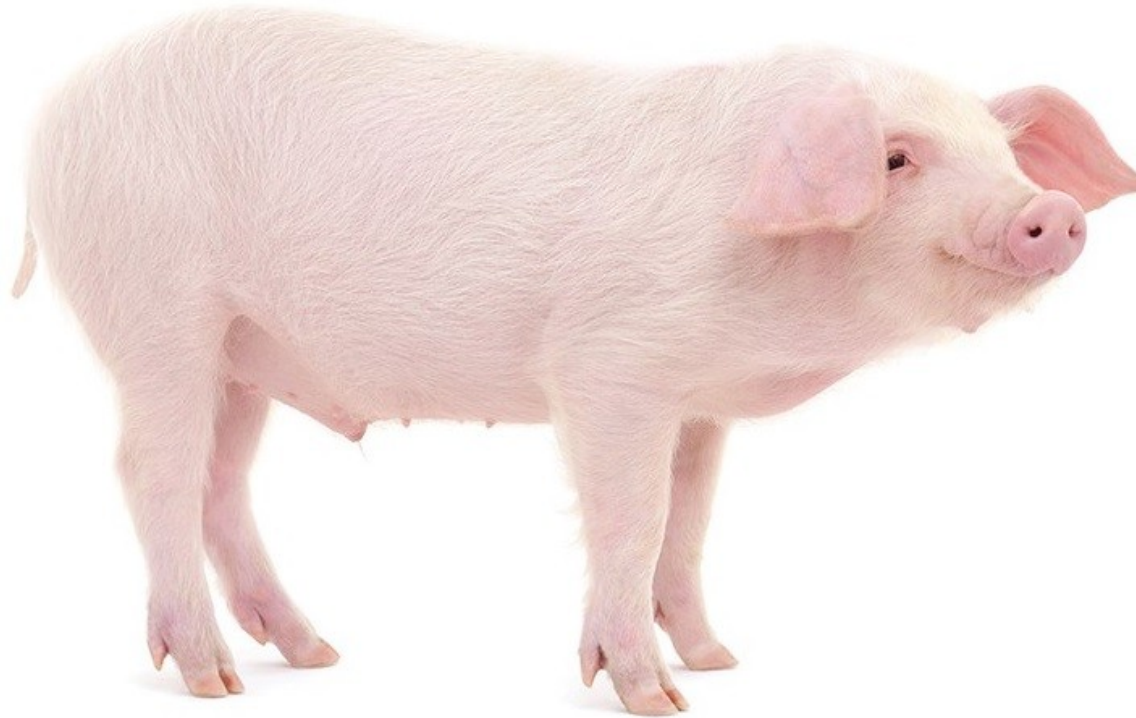
<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Handling-3.pdf>

Další zástupci hlodavců využívaných v laboratořích

□ Křeček zlatý, syrský (*Mesocricetus auratus*)

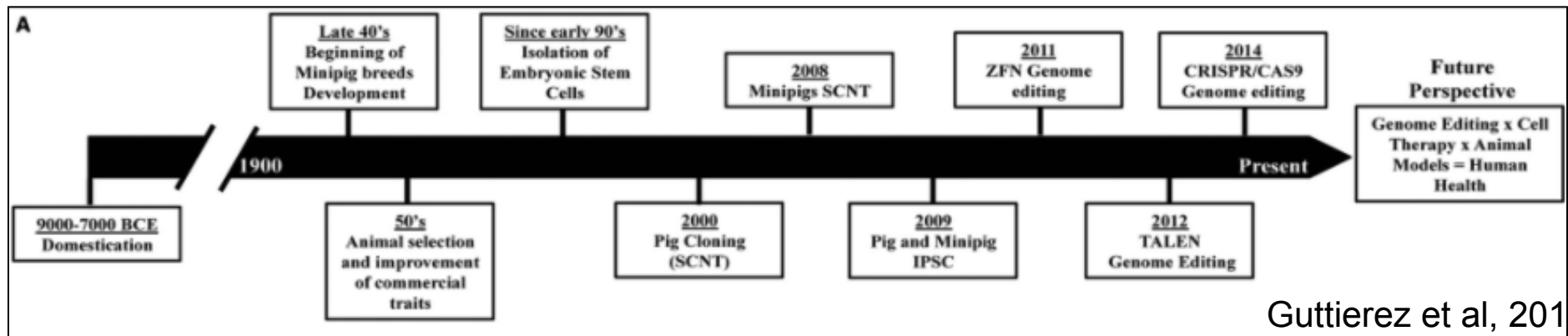


Prase domácí (*Sus scrofa* f. *domestica*)



Úvod

- Třída: savci (Mammalia)
 - Řád: sudokopytníci (Artiodactyla)
 - Čeď: prasatovití (Suidae)
- Domestikováno mezi 9.-7. tisíciletím př.n.l., primárně chováno na maso, jako experimentální zvíře využíváno od čtyřicátých let minulého století



Gutierrez et al, 2015

Úvod

□ Model pro studium mnoha humánních chorob (včetně alkoholismu, melanomů, aterosklerózy, hypertenze apod.), chirurgických postupů a vývojových procesů

Type of investigation	Model	Reference
Heart physiology	Stent design, tissue engineering of blood vessels	Bedoya <i>et al.</i> , 2006; Gyöngyösi <i>et al.</i> , 2006
	Atherosclerosis	Turk and Laughlin, 2004; Turk <i>et al.</i> , 2005
	Myocardial infarction	Ambrose, 2006; Boluyt <i>et al.</i> , 2007
	<i>Ex vivo</i> heart model	Laske <i>et al.</i> , 2005
Reproductive function	Emergency procedures	Casas <i>et al.</i> , 2005; Geddes <i>et al.</i> , 2006
	Maternal–fetal interactions	Green <i>et al.</i> , 2006
Transplantation	Embryo development	Sun and Nagai, 2003; Rohrer <i>et al.</i> , 2006
	Sperm	Strzezek <i>et al.</i> , 2005; Lavitrano <i>et al.</i> , 2006
Skin physiology	Cell and organ transplants	Larsen and Rolin, 2004; Street <i>et al.</i> , 2004
	Xenotransplantation	Cooper <i>et al.</i> , 2002; Ibrahim <i>et al.</i> , 2006
Brain	Percutaneous permeation	Simon and Maibach, 2000; Dalton <i>et al.</i> , 2006
	Contact dermatitis	Stuetz <i>et al.</i> , 2006
	Skin culture model	Huang <i>et al.</i> , 2006
Gut physiology and nutrition	Melanoma	Geffrotin <i>et al.</i> , 2004; Zhi-Qiang <i>et al.</i> , 2007
	Stroke	Imai <i>et al.</i> , 2006
	AIDS, dementia	Tambuyzer and Nouwen, 2005
Biochemical	Drug-binding sites and interactions	Minuzzi, <i>et al.</i> , 2005
	Gut structure and intestinal metabolism	Eubanks <i>et al.</i> , 2006; Qiu <i>et al.</i> , 2006
	Obesity	Brambilla and Cantafora, 2004
Tissue engineering	Probiotics and gut physiology	Reid <i>et al.</i> , 2003; Domeneghini <i>et al.</i> , 2006
	Food allergies	Bailey <i>et al.</i> , 2005; McClain and Bannon, 2006
	Response to injury	Schmitt and Snedecor, 2006
Respiratory function	Imaging techniques	Ellner <i>et al.</i> , 2004; Goldberg <i>et al.</i> , 2004
	Osteoporosis, bone density analysis	Teo <i>et al.</i> , 2006
	Cartilage repair	Chang <i>et al.</i> , 2006
	Spinal fusion	Drespe <i>et al.</i> , 2005
	Organ-specific gene delivery	Kawashita <i>et al.</i> , 2005
	Cataract repair	Lassota <i>et al.</i> , 2006; van Kooten <i>et al.</i> , 2006
Infectious disease	Polymer scaffolds	Brown <i>et al.</i> , 2006; Moroni <i>et al.</i> , 2006
	Tooth development	Hu <i>et al.</i> , 2005
Host response	Neonatal respiratory distress	Miller <i>et al.</i> , 2006
	Asthma	Turner <i>et al.</i> , 2002; Watremez <i>et al.</i> , 2003
	Therapeutics (vaccines, biotherapeutics, drug therapies)	González <i>et al.</i> , 2004; Cheetham <i>et al.</i> , 2006
Developmental interactions	Developmental interactions	Hasslung <i>et al.</i> , 2005; Butler <i>et al.</i> , 2006
	Mucosal tissue responses	Elahi <i>et al.</i> , 2005; Dawson <i>et al.</i> , 2005;
	Host response	Pomeranz <i>et al.</i> , 2005; Dvorak <i>et al.</i> , 2006
		Houdebine, 2005

Kuzmuk and Schook, 2010

Výhody

vs.

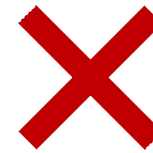
Nevýhody

prasete jako experimentálního modelu



Ze všech modelových organizmů jednoznačně nejpodobnější člověku (anatomicky i co do velikosti genomu)

Možnost vytvoření transgenních modelů



Náročný a nákladný na chov

Nutnost zabít matku při odběru embryí, dlouhá doba březosti (115 dní)

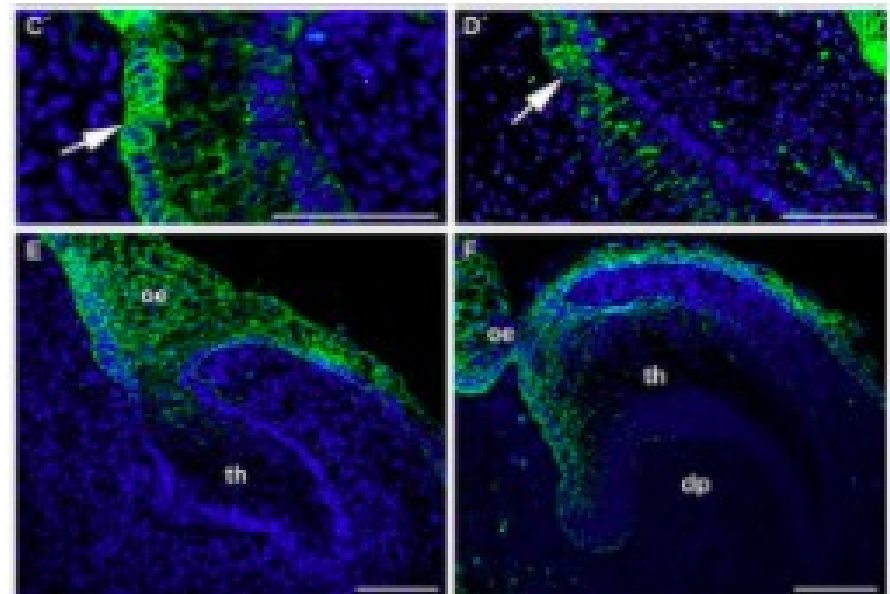
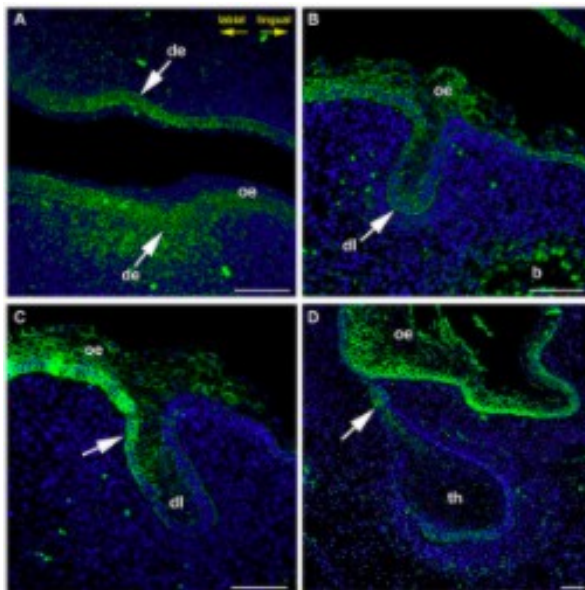
Vývojová biologie

Příprava transgenních prasat

- díky podobnosti s člověkem velký předpoklad testování potenciální léčby (nejen) pro dědičně podmíněná onemocnění
- Transgeneze též umožňuje upravit genom prasat tak, aby bylo možné je použít při xenotransplantacích (snaha o snížení rejekce xenograftu)
- **Huntingtonova choroba**
Centrum Pigmod (ÚŽFG AV ČR) – příprava transgenních mini prasat nesoucích stejné mutace v genu HTT jako pacienti trpící Huntingtonovou chorobou

Vývojová biologie

- Studium dentice prasat – dvě generace zubů (stejně jako člověk)
 - velká podobnost

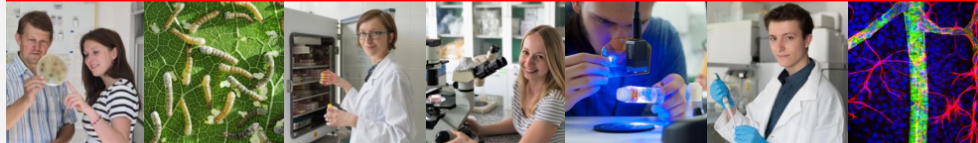


Putnova et al, 2017

Děkujeme Vám za pozornost

MUNI
SCI

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A IMUNOLOGIE
ŽIVOČICHŮ (OFIŽ)



STUDIJNÍ PROGRAM:
EXPERIMENTÁLNÍ A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

SPECIALIZACE:
EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ŽIVOČICHŮ
A IMUNOLOGIE & BUNĚČNÁ BIOLOGIE