ЛЕКЦІЯ № 7

Тема: Види та лінії лабораторних тварин для медико-біологічних досліджень

ПЛАН:

1. Поняття про лабораторні тварини
2. Значення лабораторних тварин у медико-біологічному експерименті
3. Історія використання лабораторних тварин
4. Лабораторні тварини у наукових дослідженнях
5. Історія створення інбредних ліній тварин
6. Конгенні і мутантні лінії й стоки мишей

1. Поняття про лабораторні тварини

Лабораторні тварини служать в лабораторіях різного типу для науково-практичних цілей. Лабораторні тварини повинні легко здобуватися, добре утримуватися або розводитися в лабораторних умовах і бути придатними за своїми властивостями для тих чи інших дослідів і проб.

Склад групи лабораторних тварин за видами є непостійним. За мірою зростання експериментального напряму в біології та в медицині у зв'язку зі спеціальними завданнями нових питань і з відкриттям нових якостей деяких тварин останні також залучаються до сфери лабораторного застосування, як наприклад Drosophila з часу класичних дослідів Моргана.

Розрізняють звичайні та рідкісні лабораторні тварини

До перших відносяться види, що мають широке застосування, наприклад, кролик, білі миші та щури, морська свинка, собака, жаба та ін.

До другої групи належать види тварин, які рідше застосовуються для вирішення спеціальних питань (наприклад, черепахи, риби, тритони), а також мають обмежене поширення у лабораторіях (наприклад, мавпи в помірній смузі).

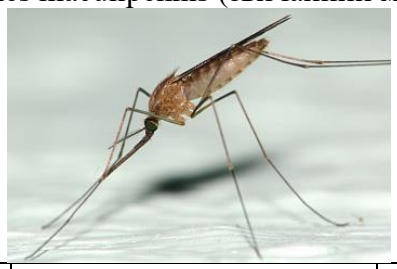
Під лабораторними тваринами зазвичай розуміють **хребетних** тварин, але й різні **безхребетні** також є лабораторними тваринами, як наприклад: інфузорії для фармакологічних дослідів, комарі Anopheles для експериментального зараження малярією хворих, які страждають на прогресивний параліч, плодова муха Drosophila і т.д.

Лабораторні тварин, що використовуються в експериментах

Тип Protozoa (найпростіші). Інфузорії-Paramaecium caudatum (інфузорія черевичок).

Тип Arthropoda (членистоногі). Клас Insecta (комахи).

1) Двокрилі: Anopheles maculipennis (звичайний малярійний комар).



2) Drosophila (плодова муха).	2) Aphaniptera (блохи), різні види.	3) Rhynchota (хоботні): Cimex lectularius (постільний клоп)
5) Pseudorhynchota (Воші роду Pediculus).	Lepidoptera (лускокрилі): Bombyx mori (тутовий шовкопряд), Lymantria dispar (непарний шовкопряд).	

<u>Тип Vertebrata (хребетні).</u>

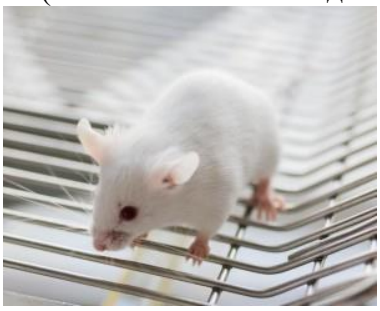
1) Клас Pisces (риби). Різні види риб: окунь, щука та ін.

2) Клас Amphibia (земноводні): Rana temporaria (сіра жаба), Rana esculenta (їстівна жаба), Siredon pisciformis (аксолотль). Різні види тритонів.

3) Клас Reptilia (плазуни). Різні види черепах: Testudo Graeca.

4) Клас Aves (птахи): Gallus domestica (курка), Columba livia (голуб), Dryospiza canaria (канарівка).

4) Клас Mammalia (ссавці).
Загін Rodentia (гризуни):
Mus musculus (біла миша-альбінос домової миші),



Mus decumanus (білий щур—альбінос пасюка),

Cavia cobaya (морська свинка),

Lepus cuniculus (кролик).

- Загін Ungulata (копитні): Bos taurus (бик), Ovis aries (вівця), Capra hircus (коза), Sus scrofa (свиня), Equus caballus (кінь).
- Загін Carnivora (хижі): Felis domestica (кішка домашня), Canis familiaris (собака домашня).
- Загін Insectivora (комахоїдні): Erinaceus europaeus (їжак).

- Загін Primates (примати):
  Мавпи Cercopithecus,

Макаки (Macacus rhesus, Macacus sinicus та ін.),

2. Значення лабораторних тварин у медико-біологічному експерименті

Експеримент з використанням лабораторних тварин та інших живих об'єктів є одним із провідних методів пізнання у сучасній медицині, фармакології, ветеринарії, біології.

Якість лабораторних тварин багато в чому визначає результат експерименту. Постійно зростають вимоги щодо якості лабораторних тварин. Тому найважливішим завданням лабораторного тваринництва є організація їх виробництва та утримання, що забезпечують необхідну якість та стандартність тварин. Проведення експериментів на живих об'єктах має забезпечувати ефективне використання тварин у наукових цілях, зменшення їх кількості, дотримання принципів гуманного поводження.

Виділяється 4 напрями у використанні лабораторних тварин:

1. Експерименти для науково-дослідних цілей, що охоплюють загальну біологію, генетику, психологію, фізіологію, ендокринологію, загальну патологію, патанатомію, паразитологію, медичну зоологію, гігієну, бактеріологію, вчення про інфекційні хвороби, фармакологію з вченням про отруйні речовини, дезінсекцію та ін.
2. Експерименти для діагностичних (прикладних) цілей у приватній патології, бактеріології, серології, паразитології, судовій медицині, токсикології.
3. Використання для виробничих цілей: вироблення вакцин, антитоксичних сироваток, virus fixe (фіксований вірус, не патогенний), різних компонентів імунобіологічних реакцій, сироваток визначення приналежності до груп крові; для добування натурального шлункового соку, вилучення різних ферментів та ін складових частин організму, для екстрагування або хімічного вилучення діючих початків ендокринних органів, отрут деяких тварин та ін.
4. Для спеціальних клінічних цілей (пересадження різних органів внутрішньої секреції, кісток та ін.).

У 2010 році було підраховано, що щорічне використання хребетних тварин – від рибок даніо до нелюдських приматів – коливається від десятків до понад 100 мільйонів. У Європейському Союзі види хребетних становлять 93% тварин, що використовуються в

дослідженнях. У 2011 році там використовувалося 11,5 мільйонів тварин. Згідно з однією оцінкою, кількість мишей і щурів, використовуваних у Сполучених Штатах лише у 2001 році було 80 мільйонів. У 2013 році повідомлялося, що миші, щури, риби, амфібії та рептилії разом становили понад 85% дослідних тварин.

3. Історія використання лабораторних тварин

Найперші згадки про досліди на тваринах зустрічаються в творах стародавніх греків IV і III століття до н. е. Аристотель (384-322 до н. Е..) та Еразістрат (304-258 до н. е.) одними з перших провели досліди на живих тварин. Давньоримський лікар другого століття нашої ери Гален відомий, як «батько вівісекції», практикував розтин свиней і кіз. Арабський лікар Ібн Зухр у XII столітті відпрацьовував методи хірургії на тваринах.

Тварин використовували протягом усієї історії науки. У 1880 році Луї Пастер довів мікробну природу деяких хвороб, штучно викликавши сибірку у вівці. У 1890 р. Іван Павлов використав собак для вивчення умовних рефлексів. Інсулін вперше виділили із собак у 1922 році, що справило революцію в лікуванні цукрового діабету. 3 листопада 1957 року собака Лайка перша з багатьох інших тварин побував на орбіті Землі. У 1970-х з використанням броненосців було розроблено антибіотики та вакцини проти лепри (прокази. У 1974-му році Рудольф Єніш створив перший генетично модифікованого ссавця, інтегрувавши ДНК із вірусу SV40 в геном миші. Ще один прорив у генетиці був зроблений 1996 року, коли народилася овечка Доллі (перше клонований з соматичної клітини ссавець).

У XX столітті стали обов'язковими тести на токсичність ліків. У XIX столітті контроль над ліками був менш суворим. Наприклад, у США ліки могли бути заборонені тільки після того, як завдали шкоди людям. Проте після трагедії «Еліксиру сульфаніламіду» у 1937 році, коли цей препарат убив понад 100 осіб, конгрес США вимагав обов'язкового тестування ліків на тваринах. Інші держави випустили подібні законы.

Сульфаніламідний еліксир був неправильно приготовленим сульфаніламідним антибіотиком, що спричинив масове отруєння в США в 1937 році. Він став причиною смерті понад 100 людей. У 1937 році компанія SE Massengill Compapy, виробник фармацевтичних препаратів, створила пероральний препарат сульфаніламіду з використанням діетиленгліколю (ДЕГ) як розчинник/допоміжну речовину і назвала препарат «Сульфаніламідний еліксир». ДЕГ отруйний для людей та інших ссавців, але Гарольд Уоткінс, головний фармацевт та хімік компанії, не знав про це. Випробування на тваринах не були потрібні за законом, і Массенгілл їх не проводив; на той час не існувало правил, які вимагають передпродажного тестування ліків на безпеку.

Громадський резонанс, викликаний цим інцидентом та іншими подібними лихами, призвів до прийняття в 1938 Федерального закону про харчові продукти, ліки та косметику, який значно розширив повноваження Управління з контролю за продуктами та ліками з регулювання наркотиків.

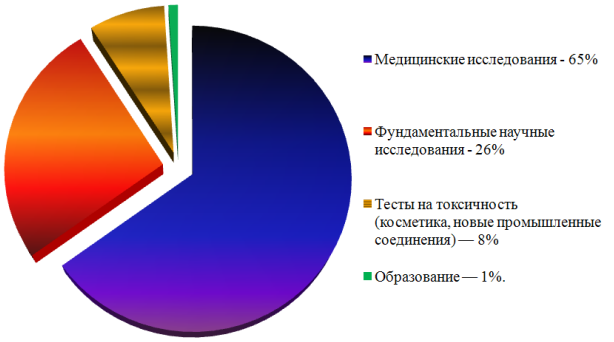
У 1960-х після талідомідової трагедії стало обов'язковим тестування ліків на вагітних тваринах.

4. Лабораторні тварини у наукових дослідженнях

Експеримент з використанням лабораторних тварин та інших живих об'єктів є одним із провідних методів пізнання у сучасній медицині, фармакології, ветеринарії, біології.

Експерименти на тваринах проводяться в багатьох сферах наукових досліджень: медичні, військові, космічні, тестування нових препаратів, косметика, побутова хімія, промислові сполуки в освіті. Загалом у світі в експериментах задіяно понад 100 млн. лабораторних тварин на рік (115,3 млн. у 2005 р. та 118,4 млн. у 2012 р.).

За даними Європейського Союзу, основна частина тварин гине у медичних дослідженнях (65%), фундаментальні наукові дослідження (в т.ч. військові, космічні та ін.) залучають 26% тварин, тести на токсичність (косметика, нові промислові сполуки) – 8 %, освіта – 1%.



При цьому, незважаючи на заяви про зменшення використання тварин в експериментах, у більшості країн світу ці цифри неухильно зростають. Зниження кількості використовуваних в експериментах тварин у 2012 році порівняно з 2005 відзначено лише для США (6%), Німеччини (14%) та Італії (12%)

5. Історія створення інбредних ліній лабораторних тварин

Теоретичною основою створення ліній лабораторних тварин стало вчення Йогансена (W. Johannsen, 1903) про «чисті лінії», згідно з яким будь-яку популяцію можна розчленувати інбридингом на ряд ліній, що відрізняються фено-і гонотипічно. Основна відмінність Лінійних тварин від нелінійних (неінбредних) полягає в тому, що вони гомозиготні та генетично однорідні.

Перші інбредні лінії виведені в США.

Вперше розведення лабораторних щурів було виконано для нейрологічних досліджень у Чикаго. У 1906 р. стік таких щурів поступив до інституту Вістар у Філадельфії, де Х. Кінг та Г. Доналдсоном були отримані 2 лінії щурів: 1-а чиста (інбредна) лінія щурів – *King Albino* (яка потім була перейменована на лінію РА) та комерційний аутбредний стік щурів (згодом названа *Wistar*), який дав початок багатьом аутбредним та інбредним лініям щурів.

До початку 30-х р.р. в біології та медицині в експерименті використовувалися виключно білі лабораторні миші *Mus musculus*. Їх називали «безпорідними або нелінійними», а по закордонній термінології аутбредними мишами.

Формування генетики як науки на початку 20 століття показало непридатність безпорідних мишей для ряду досліджень, і сприяло створенню інбредної лінії тварин як нової моделі в біологічному експерименті.

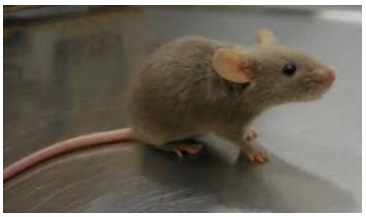
У межах інбредної лінії гомозиготні особини генетично однорідні, подібно однояйцевим близнюкам. При відсутності гальмівних чинників 100%-ва гомозиготність досягається після проведення братсько-сестринського схрещування в перебігу 20 поколінь.

Перші лінії мишей призначалися для дослідження канцерогенезу. Вони походили від невеликої кількості стоків колоній лабораторних мишей Північної Америки і Європи, білих мишей Багга, колонії мишей Ласроп.

Першим цю роботу в 1907 році розпочав **К. Кук Літтл** з Гарвардського університету, який вивчав успадкування забарвлення шерсті. У 1909 голу він отримав пару мишей з послаблено-коричневим забарвленням шерсті, що несли рецесивні гени aa, bb, dd і які лягли в основу назви лінії **dba**.

Протягом наступних 5 років більш ніж 20 поколінь цих мишей Літтл розводив братсько-сестринським схрещуванням із селекцією на виживаємість і наявністю пухлин молочних залоз.

Таким чином, була отримана перша високоракова інбредна лінія мишей, яка з 1950 року позначалася як **DBA**.



Пізніше центром цієї роботи стала заснована Літтлом Джексоновська лабораторія.

У 1913 р. **А. Багг** створив інбредну лінію білих мишей Bagg Albino C, яка з 1932 широко відома під назвою **BALB/c**.

І вже в 1920 р. Дж. Стронг схрещуванням мишей *Bagg albino* з мишами лінії *DBA* отримав нові високоракові лінії, названі ним *A, C, CBA, C3H, C3HA* і т.д.

CBA **C3HA** **C3H** **A**

Починаючи з 1921 р. на основі тривалого інбридингу однопомітних чорних мишей з колонії Ласроп було виведено кілька нових ліній: C57Bl (black), C57Br (brown), C57L (leaden) і C58, що характеризуються низькою частотою виникнення раку молочних залоз або повною його відсутністю схильністю до лейкозів.

C57Bl **C57Bl** **C57L**

На основі мишей лінії А була отримана інша високолійкозна лінія, спочатку позначена як АК, а пізніше - **AKR**.

У 1968 р. Ервін Пантелорис вивів лінію безволосих мишей, позбавлених тимусу, що отримали назву "nude" (голі), або «бестимусних». Вони відрізняються повною відсутністю клітинних факторів імунітету (в їхній крові міститься лише близько 3% Т-лімфоцитів, тоді як у звичайних мишей цей показник досягає 85%).

Зараз у світі існує близько 1 тис. ліній щурів і більше 10 тис. ліній мишей, включаючи не тільки аутбредні та інбредні, але також трансгенні та нокаутні лінії.

Джерела виведення нових інбредних ліній мишей:

1) Спонтанні мутації, що виникли в тій чи іншій інбредній лінії або колонії нелінійних тварин.

Наприклад, інбредних лінія 129 / Re- + *dy* несе мутантний ген *dystrophia muscularis* (*dy*) (м'язова дистрофія), HRS - ген *hairless* (hr) (без шерсті).

2) В результаті селекції серед нелінійних або гібридних мишей на певну ознаку з подальшим братсько-сестринським інбридингом.

Наприклад, на базі аутбредних стоків були отримані дуже цінні інбредні лінії зі спонтанною аутоімунною хворобою: *NZB* і *NZW*.

6. Конгенні і мутантні лінії й стоки мишей

Лінії, генетично ідентичні, та які виключають відмінності за одним локусом, називаються коізогенними. Але практично дійсна коізогенність можлива тільки у разі одиничної мутації в інбредній лінії. Тому лінії, що близькі до цього стану, отримані спеціальними конгенними методами.

Наближення до ізогенного станому може бути досягнуте шляхом уведення гена однієї лінії на генетичну основу іншої за допомогою послідовних зворотних схрещувань. Крос починається з двох ліній, одна з яких дає генетичну основу для конгенної лінії і повинна бути ізогенною, тобто однорідною за всіма генами. Цю лінію називають інбредним партнером. Інша лінія дає локус, за яким конгенні лінії будуть відрізнятися, тому її називають донорською лінією.

До теперішнього часу у лабораторних мишей відомо більше 800 генних мутацій і велика кількість хромосомних. Часто мутантів знаходять серед гібридів або неінбредних тварин, тому деякий час їх розводять на основі неінбредних або частково інбредних стоків.

Існує три напрямки використання наявних в даний час колекцій мутантів:

1) Дослідження мутантних генів, як генетичних маркерів для локалізації нових мутацій і побудови хромосомних карт;
2) використання мутантів в якості природних моделей патологічних станів людини завдяки наявності ряду генів, що обумовлюють порушення розвитку, аналогічні вродженим хворобам людини;
3) застосування хромосомних перебудов як клітинних маркерів або як інструмента дослідження функціонування хромосом в онтогенезі