

**Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Műtéttan Intézet**

## **Állatkísérletek az orvostudományban**

Egyetemi jegyzet

Szeged

2007

## Előszó

Az Európai Unió az állatkísérletek végzését engedélyhez köti, ezért az ilyen irányú képzettség és engedély megszerzésére a Szegedi Tudományegyetemen is szükség van. 2006-ban a Magyar Tudományos Akadémia Osztályközi Állatkísérleti Tudományos Bizottsága (AKTB) országosan egységes oktatási anyagra tett javaslatot, így ennek alapján módosítottuk a Szegedi Tudományegyetem ÁOK Sebészeti Műtéttani Intézete (SMI) által 2004-óta vezetett „Állatkísérletek az orvostudományban” kurzus anyagát. Ma Magyarországon a tárgy oktatásához legkevesebb 15 elméleti óra szükséges (de javasolt a 40 óra), amit - ha állatkísérletekben kíván részt venni a hallgató - ki kell egészíteni 40 óra gyakorlati idővel. A most kézben tartott tananyag a kurzus elméleti részét tartalmazza, harmonizál az MTA AKTB szempontjaival, és az alábbi főbb pontokat tárgyalja:

1. Az állatkísérletek általános elméleti háttere
2. A jogi szabályozás kérdései
3. Állatkísérletes modellek, kísérlettervezés
4. A laborállatok élettani jellegzetességei, viselkedésük, betegségek, zoonózisok
5. Tenyésztés – beltenyésztés és kültenyésztés
6. A laborállatok tartása, állatházak, higiénés fokozatok
7. Fájdalomcsillapítás, altatás, eutanázia
8. Életjelenségek és monitorozásuk
9. *In vitro* módszerek, alternatívák
10. Transzgenikus állatok, klónozás

Az oktatás az előadások és a jegyzet anyagára épített vizsgával zárul; a kurzus teljesítéséről valamint az írásbeli vizsgáról igazolást kap a résztvevő. A megfelelő gyakorlati idővel kiegészített sikeres elméleti tanfolyam állatkísérletek elvégzésére jogosítja fel az illetőt (diákkörös hallgatókat, doktori iskolák hallgatóit, fiatal kutatókat).

Az egyes fejezetek anyagának összeállításában az alábbi egyetemi oktatók vettek részt: Dr. Adamicza Ágnes, Dr. Boros Mihály, Dr. Jánossy Tamás, Dr. Kaszaki József, Dr. Nagy Sándor, Dr. Szabó Andrea és Dr. Torday Csilla, *SZTE ÁOK SMI*, Dr. Gaál Balázs, *SZTE ÁOK Központi Állatház*. A kutatás és a gyakorlat szempontjából fontos, de a tematikához csak közvetetten kapcsolódó anyagrészeket apró betűs szedés jelzi, a kiemelten fontos részeket ▼ jelzéssel láttuk el.

Szeged, 2007 májusa

Dr. Boros Mihály  
(szerkesztő)

## I. Bevezetés - általános háttér

„A tudomány nem próbál magyarázni, alig is próbál interpretálni, a tudomány főként modelleket állít fel.” (Neumann János)

### 1. A tudományos módszer

Bevezetésül ismertetni kell a tudományos módszer fogalmát és kapcsolatát a kísérletekkel, ezen belül az állatkísérletekkel. Leegyszerűsítve azt mondhatjuk, hogy a *tudományos módszer* az igaz és a hamis állítások elkülönítésére szolgáló eszköz, olyan eljárás, ami több, egymásra épülő, egymásból következő lépcsőfokból, folyamatból áll. A kiindulópontunk mindig egy adott kérdés megfogalmazása: mit tudunk, és mit akarunk megtudni? A helyes kérdésfeltevés rendkívül fontos, mivel a legtökéletesebbnek hitt módszer sem ér sokat, ha helytelenül feltett kérdésre keressük a választ. Fontos az is, hogy úgy fogalmazzuk meg kérdésünket, hogy mások eredményeit is összegezze - az ismétlések csakis így lesznek elkerülhetők.

A következő lépés a hipotézis felállítása, majd ennek alapján (vagyis a hipotézis által meghatározott szempontok szerint) javaslatot teszünk a kérdés megválaszolására, azaz *megkíséréljük* a megoldást. A kísérleti-tapasztalati ellenőrzést az új adatok összegzése, a kapott eredmények elemzése, próbája, mérlegelése követi, s mindezek alapján hipotézisünk igaznak, vagy hamisnak bizonyulhat. Ha hamis, akkor elvetjük. Az új, vagy módosított hipotézis után újabb vizsgálatok következnek. Végül az immár helyesnek tartott adatot, információt, felismerést átadjuk másoknak<sup>1</sup>. A hipotézis alapú kutatás alatt megtett gondolati utat tehát a megfigyelés → hipotézis → predikció → tesztelés → elfogadás/elvetés → újabb megfigyelés állomásokkal lehet leginkább jellemezni.

A tudomány a *parszimónia*<sup>2</sup> kritériumát (lásd később is) használja a hipotézisek értékelésére. Követelmény, hogy az elmélet lehetőleg minél kevesebb feltevésre (fogalomra) épüljön, azaz elméletünk ne tartalmazzon több dolgot, mint amennyi feltétlenül szükséges. Célszerű tehát az egyszerűbb hipotézist választani. Nem lehet azt állítani, hogy mindig ez lesz a helyes, csupán arról van szó, hogy ésszerűbb előbb az egyszerűbbet megvizsgálni, igazolni, vagy elvetni. Nagyon fontos további kitétel, hogy hipotézisünk csakis ellenőrizhető lehet. A tudományos elméletek és hipotézisek fontos tulajdonsága a cáfolhatóság, ami annyit jelent, hogy kell lennie olyan kísérletnek vagy felfedezésnek, ami be tudná bizonyítani, ha az elméletünk hamis. A gyakorlat azt mutatja, hogy egy hipotézis sokkal gyakrabban lesz elvethető, mint megerősíthető.

### 2. A modell

A továbbiakban a modellezéssel és a modellezés alapfogalmaival kell foglalkozni. A tudományos módszer alkalmazásakor használt *'modell'* a világ leírásának, megértésének az eszköze, a világra vonatkozó ismereteinknek kifejezője. A modell egy valóságos rendszer egyszerűsített, a vizsgálat szempontjából lényegi tulajdonságait kiemelő mása, és célja a valóság élethű ábrázolása. A modellt összevetjük a forrásául szolgáló valóságos jelenséggel, vagyis *kísérletek* útján végzünk megfigyeléseket. Ezekből a kísérletekből a modell használhatóságára is következtethetünk. Ebből az következik, hogy a modell legfontosabb jellemzője a *'jósága'*.

További fontos jellemző, hogy a modellel *méréseket* lehessen végezni. Definíció szerint a mérés valamilyen mennyiség meghatározása céljából alkalmazott műveletsor; számok hozzárendelése fizikai sajátságokhoz. A mérés az ismeretszerzés legalapvetőbb módszere, minden egzaktásra törekvő tudományterület a modelleken vagy a természet jelenségein végzett mérésekre épít.

A modellalkotás általános érvényű elve a szeparáció (ugyanis a modellezendő rendszert vagy jelenséget el kell különíteni a külső világtól); a szelekció (azaz a modellezés

során a megvalósítandó cél szempontjából szelektálni kell a kölcsönhatások között); és a gazdaságosság (a modellnek, a vizsgálat célkitűzésének megfelelően, a lehetőségek közül a legegyszerűbbnek kell lennie. Itt említhetjük újra Occam borotváját: "*entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem*", azaz szükségtelenül ne szaporítsuk a dolgokat)<sup>2</sup>. A szeparáció és a szelekció elvéből adódóan a modell mindig egyszerűsített, valamennyire hibás képe a valóságnak. Szeparáció és szelekció nélkül azonban elképzelhetetlen a modellalkotás.

A kísérletes vizsgálatok célja tehát a jelenség olyan modelljének felállítása, mely utánozni képes a jelenség tényleges lefolyását. A modell felállításához szükséges információk forrásai alapján *a priori* vagy *a posteriori* ismeretekkel rendelkezünk. Az *a priori* ismeretek a modellezendő jelenségre vonatkozó, a vizsgálat megkezdésekor rendelkezésre álló ismeretek összessége; az *a posteriori* ismeretek a modellezési eljárás befejezésével rendelkezésünkre álló ismeretek (vagyis az előzetes ismeretek és a jelenség megfigyelése során nyert információk összessége). A deduktív modellalkotás kizárólag *a priori* ismereteket használ; általános érvényű törvényszerűségekből kiindulva, természettudományos ismeretanyagra támaszkodva, egy konkrét, ismert jelenség leírására törekszik. Az induktív modellalkotás kizárólag kísérleti adatokra épít; a kísérletek során végzett megfigyelések információt tartalmaznak a jelenség és annak környezete között érvényesülő kölcsönhatásokról, azaz a rendszer bemenő és kimenő jeleiről.

A modellalkotás számos hiba forrása lehet. Ha egy komplex kérdés megközelítéséhez egyszerűsített modelleket alkotunk, számos fontos tényezőt kell elhanyagolni a probléma tanulmányozhatóságának érdekében. Ez természetes és ésszerű megközelítési mód, de a kapott eredmények extrapolálásakor nagyfokú óvatosság szükséges; ilyen esetekben nem szabad általánosítani, generalizálni, és megfedkezni a modellalkotáskor elhanyagolt tényezőkről. Ilyen modellekre példa az *in vitro* kísérlet, melyek érvényessége *in vivo* nem mindig egyértelmű, és hasonlóképpen, a különböző élőlényekben kapott eredmények átvitele egyik fajról a másikra (így az emberre) sem lehet teljesen magától értetődő, vagy zökkenőmentes.

### 3. Modellek az orvos-biológiai gyakorlatban



Az orvosi, orvos-biológiai kutatásokban a tudományos módszer - és ennek részeként a modellalkotás – ma általános érvényű. A modellalkotás két alapvető formája az *in vitro* (mesterséges környezetben, szó szerint „üvegben” vagy lombikban)<sup>3</sup> és az *in vivo* (szó szerint „élőben” vagyis magában az élő szervezetben) kialakított modell. Ma az orvostudományban leggyakrabban alkalmazott *in vitro* modellek közé az alábbiak tartoznak:

- Egész szerv perfúziója (pl. izolált, perfundált szív, az ún. Langendorff-féle preparátum),
- Szövet szuperfúzió,
- Primer sejtenyészet vizsgálata,
- Immortalizált sejtvonalak,
- Szubcelluláris vizsgálatok,
- Molekuláris vizsgálatok, gén, protein expresszió meghatározások.

Az orvostudományban alkalmazott *in vitro* modellek döntő többsége *ex vivo* (azaz „élőből származó”) rendszer (sejt, szövet vagy szerv) és további alcsoportot jelent a számítógépes, adatbázisokra építő „*in silico*” modellalkotás. Fontos, hogy ezek a modellek tökéletesen alkalmasak számos orvosi-biológia kérdés megválaszolására, és értékes adatokat szolgáltathatnak. Ugyanakkor jellegéből következően nem biztos, hogy a modell pontosan reflektálja az élő, integratív természetet.

Az *in vivo* (élőben) modellek közé emberi (humán) és nem humán (pl. állati) vizsgálati elrendezések tartoznak. A jogi, etikai, stb. kérdésektől eltekintve, a humán modell

legfontosabb technikai hátránya, hogy általában nem lehet invazív, és a rendelkezésre álló háttér információ minősége és mennyisége is kérdéses. A nem humán *in vivo* modellek, vizsgálati összeállítások a fenti problémákat megoldják, de az eltérő méretek és a különböző fajok különböző genetikai háttere (ld. később) számos problémát okozhat - vagyis nem biztos, hogy az eredmények alkalmazhatók (vonakoztathatók) lesznek a humán esetekre.

Az *in vivo* alkalmazás időbeli lefutása alapján akut (rövid távú) és időben elhúzódó (krónikus) modellről, vagy vizsgálatról beszélünk. E kísérleti modellek végpontja általában különböző, akut modell esetén általában 24 órán belül, vagy legkésőbb az altatás végén befejeződik a vizsgálat, míg krónikus esetben pl. az ébredést követően tovább folytatódik. Akut modellek esetén az altatás (anaesthesia) hatása mindig kérdéses, és a beavatkozás miatt lényeges eltérések lehetségesek a normális, élettani helyzettől. A krónikus modellek legfontosabb problémáit a tartósan beültetett idegentestek, eszközök, katéterek, stb. hatásai jelenthetik.

A humán modelleket, vagyis a tudományos módszer alkalmazását a klinikumban az úttörő Nürnbergi Kódex (1947) és az Orvosok Világszövetsége (WMA) által elfogadott és többször módosított Helsinki Nyilatkozat (1964, 1975) szabályozta, amelyek elsőként rendelkeztek az emberi alanyon végzett orvosi kutatásokról. Ezek alapján az általánosan érvényes alapelvek (melyek közvetve az állatkísérletekre is vonatkozathatók) a következőkben foglalhatók össze:

- A kutatás feleljen meg az általánosan elfogadott tudományos elveknek.
- A kutatás alapuljon a tudományos irodalom alapos ismeretén.
- A kutatást előzze meg laboratóriumi és állatkísérlet.
- A kutatást meg kell tervezni és világosan megfogalmazott protokoll szerint kell eljárni.

Összegezve az elmondottakat, csakis a fentiek figyelembevételével lehet feltenni a kérdést, hogy „*miért*” végez a tudomány állatkísérleteket. Az emberi szervezet megismerését, működési zavarainak befolyásolását célzó, vagyis az orvosi problémák esetleges megoldását jelentő hipotéziseket számos esetben nem lehet „*in vitro*” vagy humán „*in vivo*” modelleken (élő embereken) vizsgálni. Másképpen fogalmazva: az „*in vivo*” állati modellek nélkülözhetetlenek a mai orvostudományban és - valószínűleg - szükségesek a jövő tudományos fejlődéséhez is. Az *in vivo*, állati modellalkotás ma kiterjed az orvostudomány egészére és minden ágát, területét felöleli:

- Terápia: veszettség (az oltóanyag hatását elsősorban kutyákon és nyulakon vizsgálták); angolkór (kutya); lepra (tatu);
- Megelőzés: diftéria (ló); járványos gyermekbénulás (nyúl, majom); bárányhimlő (majom); kanyaró (majom);
- Felfedezés: inzulin (kutya); modern anaesthesia (kutya); genetika (egér, patkány);
- Fejlesztés: minimálisan invazív sebészet (disznó); nyitott szívműtét (kutya).

Természetesen az állati modellalkotásnak, vagyis az állatkísérletnek számos korlátja van. Ezek közül talán a legfontosabb, hogy az állati modellben kapott adatok nem minden esetben, vagy csak közvetve alkalmazhatók humán körülmények között. Az adatok relevanciája sokszor bizonytalan (kiragadott példa lehet az 50%-os halálos dózis (LD50) eltérő értékei állatokban és embereken) és a fajok közötti összehasonlíthatóság mindig kérdéses lesz. A speciesek között az eredmények használhatóságát befolyásoló, vagy kizáró genetikai különbségek lehetnek (pl. a theobromin toxikus lehet a kutyákra, a kortizon teratogén egerekben, az inzulin toxikus lehet több állatban) - tehát minden esetben (az egyedi modellre vonatkoztatva) alapvető feladat annak a kérdésnek a tisztázása, hogy lehetséges-e az extrapoláció. Sok esetben ma már lehetséges az alternatív modellalkotás is (részletesen ld. később); ma minden kutatónak a „3 R” alapján<sup>4</sup>, vagyis a *refinement* (az állati fájdalom és

szenvedés csökkentése), a *reduction* (a kísérletekben felhasznált állatok számának csökkentése a lehetőségek határáig) és a *replacement* (az állati modellek helyettesítése más modellekkel) elvei szerint kell megtalálni a legalkalmasabb megoldást, a legjobb modellt. A leghevesebb vita természetesen a helyettesítésről (*replacement*), annak mértékéről és feltételeiről szól. A szóba jövő lehetőségek az alábbiak lehetnek:

- (i) *Relatív helyettesítés* esetén olyan kísérletekről van szó, melyek teljesen megszüntetik az állati szenvedést, anélkül hogy mindez kizárná a vizsgálatok további folytatását (ez tulajdonképpen a tökéletes finomítás, az '*absolute refinement*').
- (ii) *Teljes helyettesítés* esetében olyan kísérleteket lehetne elvégezni, melyekhez nem szükséges állati eredetű biológiai anyag.

A fenti ponthoz tartozik pl. az információáramlás fokozásának szükségessége (vagyis pl. a szükségtelen ismétlések számának csökkentése) valamint az alábbi lehetőségek is:

- Számítógépes (*in silico*) rendszerek, matematikai modellezés alkalmazása,
- Fiziko-kémiai technikák alkalmazása (pl. a kemikáliák irritációs hatását előrejelző Eytex rendszer az ún. Draize teszt helyettesítésére),
- Alacsonyabb rendű élőlények (baktériumok, gombák, pl. az ún. Ames teszt) *in vitro* vizsgálatok (pl. sejt, szövet és szerv kultúrák) kiterjedtebb alkalmazása.
- Emberi vizsgálatok (pl. önkéntesek, populációk) alkalmazása,

### 3.1. Az állatkísérletes modellalkotás célja



Alapvető cél, szempont és igény, hogy világos következtetések levonására alkalmas, egyszerű modellekre van szükség:

- Magának a fajnak, reakcióinak tanulmányozása (pl. állatorvosi kutatás),
- Állati viselkedés kutatása,
- Nem gyógyszerészeti készítmények tesztelése (pl. toxicitási vizsgálatok),
- Gyógyszerek kipróbálása (pl. *in vivo* tesztek új gyógyszerek, vakcinák hatékonyságának kipróbálására, ún. fázis 2 vizsgálatok),
- Oktatási cél (pl. egyetemi hallgatók szakmai gyakorlatszerzése),
- Általános orvostudományi cél (pl. AIDS, rosszindulatú daganatok kialakulásának kutatása, xenotranszplantáció lehetősége). E kategóriában a legtöbb modell extrapolációs (állatokat tanulmányozva, megfigyelve, a kapott eredményekből következtetve humán mechanizmusokra) és az alábbi csoportok egyikébe tartozik:
  - Terápiás célú "preklinikai" vizsgálatok,
  - Toxikológia modellek / beavatkozások biztonságának meghatározása,
  - Anatómiai, sebészeti kutatások,
  - Fertőzések és immunitás vizsgálata,
  - Daganatos mechanizmusok (kutatás, diagnózis) vizsgálata,
  - Viselkedés / pszichológia.
- Biológiai, nem közvetlenül orvosi célú kutatás. Ide tartozik az általános biológiai mechanizmusok tanulmányozása, következtetések humán biológiai mechanizmusokra, vagyis az alapkutatás. Az alapkutatói tevékenység főbb modell csoportja az alábbiak lehetnek:
  - Leíró vizsgálatok (élettani, kórtani, etológiai, stb. modellek, melyeknél nincs hipotézis, vagyis nincs tervezhető kísérletes tevékenység - így a minőségbiztosítás nehéz).

- Válaszreakció valamilyen intervenciót követően (pl. élettani, kórtani, viselkedéstani, stb. modellek, melyeknél a kísérleti tervezés meghatározó fontosságú).

### 3.2. Az állati modellek főbb csoportjai

**1. Táblázat** „Spontán” modellek (itt lényegében hasonló, vagy teljesen azonos mechanizmusok működnek emberben és állatban).

| Vizsgált faj     | Defektus / érzékenység  | Humán megfelelője                           | Miért alkalmazzák     |
|------------------|-------------------------|---------------------------------------------|-----------------------|
| Min egér         | Mutáns apc gén          | Familiaris adenomatosus polyposis (daganat) | Azonos emberi végpont |
| Macska           | Asztma                  | Asztma                                      | Azonos patológia      |
| Ír szetter       | VIII faktor hiánya      | Hemophilia A                                | Terápiás vizsgálatok  |
| Mormota          | Hepatitis B érzékenység | Hepatitis B                                 | Infekció vizsgálat    |
| Tatu (armadillo) | Lepra                   | Lepra                                       | Terápiás vizsgálatok  |

**2. Táblázat** „Indukált” modellek (ahol valamilyen manipulációra van szükség).

| Cél                                                                                         | Kérdés                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Viselkedéskutatás                                                                           | Stressz, tanulás, stb. folyamata (további kérdés, hogy alkalmas-e a modell következtetések levonására - azonos-e pl. az emberi és állati stressz?) |
| Sebészi, biokémiai beavatkozások (pl. idegek átmetése, erek elzárása, enzimek gátlása)      | Emberi kórfolyamatok megismerése és gyógyítása (kérdés, hogy a modell alkalmas-e következtetések levonására?)                                      |
| Genetikai manipulációk (transzgén, <i>knock-out</i> , <i>knock-in</i> modellek, ld. később) | Emberi kórfolyamatok megismerése és gyógyítása (kérdés, hogy alkalmas-e következtetések levonására, pl. kezelés-e vagy előkezelés?)                |

**3. Táblázat** „Negatív” modellek (“miért nem?” modellek).

| Species | Kérdés                                                           |
|---------|------------------------------------------------------------------|
| Kutya   | Miért nem kapnak atherosclerosist?                               |
| Majom   | Miért nem lesznek AIDS-esek a HIV vírussal fertőzött csimpánzok? |

**4. Táblázat** “Árva” modellek (olyan jellegzetességek, melyeknek fontos biológiai jelentőségük lehet - a mutáció indukció itt fontos kutatási terület).

| Species               | Jellegzetesség                                      |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| Sertés                | Sok CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-sejtjük van |
| Kérődzők              | Sok $\gamma\delta$ T-sejtjük van                    |
| Madarak, szarvasmarha | A leukosis fertőző                                  |

### 3.3. Az állati biológia ismerete



Az orvostudományi modellalkotás alapfeltétele az állati biológia, a jellegzetességek, eltérések ismerete. Lényeges szem előtt tartani a *per definitionem* meglevő különbségeket, a specifikumokat, a kisebb-nagyobb anatómiai, élettani variációkat, melyek a kísérletes eredmények interpretálásakor vagy extrapolálásakor döntő jelentőségűek lehetnek. Az alábbiakban a laboratóriumi patkány törzsek összességére vonatkoztatva soroljuk fel legfontosabb eltéréseket, de a modell és valóság közötti összehasonlítás természetesen minden más species esetében is szükséges.

### 5. Táblázat Az állati (patkány) és az emberi modell közötti eltérések

| Jellegzetesség               | Ember      | Patkány                                                                                                                                                                  |
|------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Plazma protein kötés         | ++         | Alacsony - ez befolyásolja a xenobiotikumok (streptomycin, clindamycin, klórpromazin, nikotin, pilocarpin, szerotonin, adrenalin, noradrenalin, dopamin, stb.) reakcióit |
| Légzés                       | Orr-száj   | Orr típusú                                                                                                                                                               |
| Bélflóra/anatómiai eltérések | Kis coecum | Nagy coecum (coecotropok és koprofágia jelentősége)                                                                                                                      |
| Bőr                          | Szőrtelen  | Szőrös (borotválás – hőszabályozás)                                                                                                                                      |
| Albinizmus                   | Ritka      | 95% (tirozináz hiány, ami idegrendszeri eltéréseket, fényérzékenységet, retina károsodást, halláscsökkenést okoz)                                                        |
| Epehólyag                    | +          | -                                                                                                                                                                        |
| Szövettani eltérések         |            | Alacsony P450 aktivitás                                                                                                                                                  |



|                            |              |                                                                                                             |
|----------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Viselkedési eltérések      | Nappal aktív | Éjszakai aktivitás (fordított fény ciklus?)                                                                 |
| Szociális rangsor          | -            | +                                                                                                           |
| Természetes viselkedés     | +            | Túlzsúfoltság (tenyésztés alatt)                                                                            |
| Emésztőrendszer            | ?            | Fogak jellegzetességei<br>Gyomor (üres vagy sem)<br>Táplálék rosttartalma                                   |
| Speciális jellegzetességek | ?            | Tigmotropizmus (egymáshoz tapadás),<br>Harder mirigy (porfirin kiválasztás - nyomok az orrnyílás környékén) |
| Betegségek jelei, tünetei  | +            | Gyakran hiányoznak (láz, hipotermia) vagy nehezen megítélhetők                                              |

Lényeges itt kiemelni azt is, hogy a gyógyszerek metabolizmusa hőmérsékletfüggő (és a testhőmérsékletben is species különbségek lehetnek), s emellett a reakciók összefüggnek a testfelszínnel is. A fajok közötti összehasonlítást elősegítő dózis-skálázási faktorokat a testsúlyhoz és a felszínhez is viszonyíthatjuk<sup>5</sup>, de az egyes gyógyszerek reakciói eltérnek emberben és az egyes fajokban, ezért a species választásnak döntő jelentősége van a farmakológiában, és a toxikológiában is.

**6. Táblázat** A fajok közötti összehasonlítást elősegítő dózis-skálázási faktorok a testsúlyhoz viszonyítva

|         | Testsúly (kg) | Skálázási faktor |
|---------|---------------|------------------|
| Ember   | 60            | 1                |
| Kutya   | 8             | 2                |
| Majom   | 6             | 2                |
| Nyúl    | 2             | 3                |
| Patkány | 0.2           | 5                |
| Egér    | 0.02          | 8                |

## II. Modellek a gyakorlatban

A következőben két, igen gyakori humán kórkép kapcsán mutatjuk be a modell és a valóság közötti összefüggés fontosságát - és az esetleges eltérések jelentőségét.

### 1.Szeepszis

A szeepszis súlyos, gyakran halálos megbetegedés, melynek kórtana, a pathomechanizmus számos részlete még tisztázatlan. A kérdéskör vizsgálatára főképp rágcsáló modelleket alkalmaznak:

**7. Táblázat** Rágcsáló modellek a humán szeepszis tanulmányozására

| Beavatkozás | Előny                            | Hátrány                         |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
|             | Egyszerű (pl. intraperitoneális) | Egyszerű (a klinikai szeepszis) |

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                             |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Endotoxin injekció              | injekciót követően 4-6 órán belül shock alakul ki), alacsony dózisban hiperdinámiás, nagy dózisban hipodinámiás keringési reakció                                                                                                                                            | több tényezőbből áll - anti-endotoxin kezelés hatékony állatokban, de emberekben, a klinikumban hatástalan) |
| Coecum lekötés és punkció (CLP) | Az emberi appendicitishez vagy diverticulitishez mérhető trauma, coecum necrosissal (hasonlít a klinikai helyzethez). Időbeni lefutása hasonlóvá tehető a klinikumhoz, a citokin válasz hasonló a klinikai szepszishez, folyadékterápia, etc. jól alkalmazható, vizsgálható) | Standardizálása nehéz, invazivitást, műtetet igényel (behatolást, zárást, felépülést)                       |
| Faecalis inoculum               | Standard, konzisztens modell, alkalmazása egyszerű (i.p. injekció), polimikróbás                                                                                                                                                                                             | Nincs jelentős trauma                                                                                       |
| Agar baktériummal               | Lassú baktérium kiáramlás a gócból                                                                                                                                                                                                                                           | Rendszerint csak egy baktérium törzs                                                                        |
| Intravénás baktérium            | Könnyű dozírozni, az időbeni lefutást kontrollálni lehet a dózissal, Szisztémás infekció                                                                                                                                                                                     | Rendszerint csak egy törzs, szérum szenzitív, gyorsan elpusztul, befolyásolja a gazdaszervezet immunitását  |
| Pneumonia modellek              | Egyszerű beadni a preparátumot a tracheába vagy az orrba; gyakori fertőzés humán körülmények között, a dózis ellenőrizhető, a gyulladásos infiltrátum, a károsodás nagysága mérhető                                                                                          | Esetenként csak helyi reakció (nincs szisztémás hatás, gyulladás)                                           |

Amennyiben összehasonlítjuk a fenti modelleket és klinikai valóságot, még számos, további eltérésre figyelhetünk fel<sup>6,7,8</sup>.

#### 8. Táblázat    Eltérések a modell (kísérletes szepszis) és a valóság (humán szepszis) között.

| Kísérletes szepszis                                              | Klinikai (humán) szepszis                            |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Homogén genetikai háttér, általában egy nem                      | Heterogén, mindig két nemet érint                    |
| Beltenyészet                                                     | Nem beltenyészet                                     |
| Eltérő fajok (patkány, kutya, sertés, stb)                       | Kizárólag <i>homo sapiens</i>                        |
| Egészségesek                                                     | Társbetegségek lehetségesek                          |
| Fiatal felnőttek                                                 | Rendszerint újszülöttek vagy idősek                  |
| Koprofágia, szennyezett környezet (endotoxin érzékenység eltérő) | Rendszerint tiszta környezet                         |
| Általában előkezelés                                             | Addig nem lehet kezelni, amíg a betegség nincs jelen |
| Nincs adjuváns kezelés                                           | Aktív terápia (folyadék, antibiotikum,               |

|                                                                                       |                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                                                                                       | inotróp szerek, stb.)                                    |
| Nincs lélegeztetés                                                                    | Lélegeztetés gyakori                                     |
| A fertőzés leggyakrabban mesterséges – pl. hematogén, intraperitoneális injekció      | Fertőzéses góc ("nidus") gyakori                         |
| Alvadásgátlás, altatás, fájdalomcsillapítás (heparin, anaesthesia, analgesia hatásai) | Optimális kezelés                                        |
| Uniform inzultus                                                                      | A kiváltó ok helye és mértéke változó                    |
| Gyors kialakulás                                                                      | Rendszerint lassú                                        |
| A vizsgálat ideje standardizált                                                       | Egyedi lefutás                                           |
| Különféle végpontok megfigyelése, rendszerint nem cél a letális kimenet               | Klinikailag fontos végpontok (szervfunkciók, mortalitás) |
| Legtöbbször gyorsan vezet halálhoz                                                    | A halál rendszerint napok, hetek alatt következik be     |

## 2. A vérzéses shock

Vérvesztés esetén vérzéses shock alakulhat ki. Ebben a súlyos klinikai kórképben (számos kórtani kérdés mellett) az optimális kezelési stratégia, a legmegfelelőbb kezelés kérdése még ma is tisztázatlan. A fontosabb terápiás lehetőségek között – többek között - pl. a hipotenziós újraélesztést, krisztalloid oldatok, hipertóniás oldatok, hemoglobin szubsztitúció, teljes vér adását, a friss fagyasztott plazma, vagy vörösvérsejt massa alkalmazását lehet említeni.

Az 1980-as évekig kísérletes körülmények között az állandó nyomás és az állandó térfogatú vérzéses modellekben (ld. alább) a kiindulási (kontroll) vérnyomásig (kontroll szintig) történő reszuszcitáció (újraélesztés) során tapasztalták a legjobb eredményeket. Ugyanakkor az 1990-es években egyre általánosabbá váló vélekedés szerint az „agresszív” (vagyis a kontroll szintet elérő vagy meghaladó) reszuszcitáció káros lehet, mivel az ún. ellenőrizetlen vérzéses modellben a kontroll szintnél alacsonyabb vérnyomásig történő kezelés (hipotenzio) sokkal jobb eredményeket adott. Meg kell itt jegyezni, hogy ez a lehetőség már az 1990-es évek elején (!) felmerült.<sup>9</sup>

## 9. Táblázat Állatkísérletes modellek a vérzéses shock tanulmányozására

| Modell                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Tanulságok                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Állandó nyomású (ún. Wiggers)<sup>10</sup> modell</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérzés (pl. az arteria femoralisból) egy nyitott reservoir-ba.</li> <li>• Az érpálya hidrosztatikai nyomását az előre meghatározott artériás középnyomás (MAP) értékre állítjuk (pl. MAP=40 Hgmm)</li> <li>• Újraélesztés (reszuszcitáció) meghatározott időben (pl. 60 perckor) - vagy az elvesztett vér adott %-ának autotranszfúziójakor (ami a keringés károsodás jele)</li> </ul> | <p>A legtöbb vizsgálatra csakis hímeket használnak, de vérzés esetén (is) döntő lehet a nem szerepe: a nőstények jobban tolerálják a traumás vérzést és a szepszist.<sup>11</sup></p> |
| Állandó térfogatú vérzés modell                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Patkányok esetében a vértérfogat/testsúly aránya 100 és 400 g között a testsúly                                                                                                       |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérzés az előre kiszámított vértérfogatig a testsúly % alapján (~60 ml vér/tskg).</li> <li>• Vérzés (pl. az arteria femoralisból 1 ml/perc sebességgel) a 40% vértérfogat eléréséig;</li> <li>• Reszuszcitáció (pl. 60 perckor)</li> </ul>  | <p>növekedésével lineárisan csökken – s ez vérvesztés esetén döntően befolyásolja az eredményeket! Rágcsálónál a csoportok közötti esetleges 20-30 g súlykülönbséget nem könnyű felismerni. Arra következtethetünk, hogy a kezelés hatékony, pedig csupán az állatok súlya kissé alacsonyabb a kezeletlen kontrollokhoz képest. A kísérletes protokoll állandó, fontos része a testsúly szigorú ellenőrzése.<sup>12</sup></p> |
| <p>Ellenőrizetlen (altatott vagy éber) vérzéses modell</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Egy adott pillanatban nagyér sérülés, standardizált értrauma (pl. az arteria ilica communis átmérőjének %-ban meghatározott érsérülés, majd kontroll nélküli vérzés).</li> </ul> | <p>A klinikai helyzetnek ez felel meg a leginkább (!). Az anaesthesia jelentősen befolyásolja a központi idegrendszer által irányított autonóm reflexeket, általában jelentősen befolyásolja (deprimálja) a légzést; bizonyos anaesthetikumok jelentősen befolyásolják (csökkentik) a gyulladást.<sup>13,14</sup></p>                                                                                                         |

Nyilvánvaló tehát, hogy az azonos klinikai háttér (vérzés = valóság) mellett eltérő következtetésekhez vezető újraélesztési-kezelési stratégiák magyarázata a modellekkel kapcsolatos, vagyis az ellentmondásos eredmények oka a modell és a valóság közti eltérés.

#### A bevezető fejezet összefoglalása



- Az orvostudományi kutatás és az experimentális biológia lényege a releváns, jó modell.
- Ismerni kell a modell és a valóság közötti eltéréseket és a modellt mindig a valósághoz kell viszonyítani: a „jó” tudomány feltétele a jó modell.
- Minden állatkísérlet legfontosabb eleme, eredményeit és következtetéseit leginkább befolyásoló tényezője a megfelelő kontroll csoport (ld. a későbbekben is).
- A hatékony kutatómunkához alapos tervezésre, a modellek előnyeinek és korlátainak ismeretére van szükség.
- Klinikailag irreleváns, nem megfelelő, vagy a hipotézis megválaszolására alkalmatlan modellek csakis rossz eredményt adhatnak, és hibás következtetésekhez vezetnek.

## II. Az állatkísérletek etikai vonatkozásai és törvényi szabályozása (Dr. Nagy Sándor)

### 1. Az állatkísérletek jelentősége

Az állatkísérletek jelentősége a tudományban igen nagy. Különösen vonatkozik ez az orvostudományi kutatásokra. Erről a területről azonban igen sok téves, félrevezető, hamis és káros információ van forgalomban. A következőkben a tudományos álláspontot ismertetjük, amely saját belső logikáján kívül erkölcsfilozófiai alapokon is nyugszik.

Az emberiség saját érdekében több célra használ fel állatokat. Ezek közül legalább kettő fennmaradásunkhoz elengedhetetlenül szükséges. Táplálkozásunkra szolgál az összes célra felhasznált állat több mint 95%-a, míg tudományos kutatások céljára csupán kevesebb mint 0.3%-a. Mint minden élőlény, az ember is elsősorban saját fájának érdekében cselekszik. Az evolúció folyamán azok a fajok maradtak fenn, amelyek a változó környezethez a legjobban tudtak alkalmazkodni. Az emberi faj egyedülálló, abban a tekintetben, hogy legfőbb adaptációs előnyünk a tudásunk és annak rendszerezett és ellenőrzött formája, a tudomány. A többi fajhoz hasonlóan, mi is fenn akarunk maradni. Ezért nem mondhatunk le legfőbb eszközünkről, tudásunk növeléséről: a tudományról. Legfontosabb kötelezettségünk ugyanis nekünk is saját fajunk irányában van.

A környező világ aktív megismerése az emberi léttől elválaszthatatlan tevékenység. Ennek egyik különösen fontos területe az élet és az élővilág kutatása. Az élettudományok által feltárt ismeretek egyaránt szolgálják az emberi egészség és életminőség javítását, az emberi faj és a bioszféra kölcsönhatásának megértését, a bioszféra egyéb fajainak a megismerését. Tekintve, hogy az életjelenségek csak élő szervezetekben tanulmányozhatók, az élettudományok nem nélkülözhetik az állatkísérletes módszert.

A továbbiakban az állatkísérleteknek elsősorban az orvostudományban betöltött szerepével foglalkozunk. Az orvostudomány az élettudományoknak olyan ága, amelynek célja az emberi egészség védelme, az emberi élet minőségének a javítása. E célt azáltal éri el, hogy tudományos alapját szolgáltatja az orvosi gyógyító és megelőző munkának. Az orvostudományt azonban korlátozza az az erkölcsi elv, hogy emberen *kísérleteket* nem, *vizsgálatokat* is csak korlátozottan, indokolt esetben és körültekintően lehet végezni. Az Orvosi Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat értelmében az emberen végzett klinikai orvostudományi kutatásokat, így például új gyógyszerek kipróbálását előzetesen állatkísérletekben nyert adatokra kell alapozni.<sup>15</sup>

Állatok felhasználására szükség van az ugyancsak az emberi egészséget védő toxikológiai vizsgálatokban is. Környezetünkbe folyamatosan nagyszámú anyag kerül, amelyeket emberi szükségletek kielégítésére az ipar állít elő. Az új vegyületek kibocsátás előtti toxikológiai tesztelése elengedhetetlenül szükséges a társadalom védelme szempontjából.

Állatokon végzett kísérletek nemcsak közvetlen gyakorlati (például gyógyító, vagy mérgezést megelőző) célokat szolgálnak. Alap kutatások eredményei, amelynek révén megismerjük az élő szervezetek működését és az élőlényekben található anyagok jellemzőit, gyakran csak hosszabb idő múlva hasznosíthatók a gyakorlatban. Ez igaz a tudományos alap kutatások bármely területére. Nyilvánvaló azonban ilyen kutatások szükségessége, mert ezek alapozzák meg az alkalmazások lehetőségét.

Mozart, az emberiség ismert történetének valószínűleg legnagyobb gényusa 1791-ben halt meg. A neves történelmi személyiség Nagy Sándor macedón uralkodó 2114 évvel korábban. Mindketten idő előtt harmincas éveikben. Kevesen gondolnának arra, hogy e két ember halála között párhuzamot lehet állítani. Ma úgy látjuk, hogy betegségük nagy valószínűséggel megelőzhető, gyógyítható, de legalábbis kezelhető lenne, ha ma élnének. Témánk szempontjából azonban fontosabb, hogy ezek a lehetőségek mind a két férfi esetében haláluk idején egyformán korlátozottak voltak, vagyis két évezred alatt a gyógyítás és az

alapját képező orvostudomány szinte semmit sem fejlődött. Ez a fejlődés lényegében csak a 19. században kezdődött el és mai tudásunk mintegy 80%-át csak 1800 után szereztük, több mint 50%-át pedig 1900 óta.<sup>16</sup>

Ennek a tudásnak jelentős részét állatkísérletes kutatásoknak köszönhetjük, amelyek tulajdonképpen a 19. században kezdődtek el. Itt egy figyelemre méltó párhuzam, sőt oki összefüggés állapítható meg. Az orvosok felismerték, hogy kevés remény van hatékony gyógyító eljárások alkalmazására, ameddig meg nem ismerjük az egészséges és a kóros élő szervezet működését. Elindultak tehát az állatkísérletes kutatások, amelyek igen nagy eredményeket hoztak. Kevesen tudják például, hogy a gyermekágyi szepszis racionális megelőzését kidolgozó Semmelweis Ignác maga is végzett állatkísérleteket. 1850 után a mikrobiológia kialakulásában nélkülözhetetlen volt állatok felhasználása.

Talán legszemléletesebben az mutatja az állatkísérletek jelentőségét, hogy napjainkig az először 1901-ben kiadott orvosi Nobel díjak mintegy 75%-át ilyen kísérleteket alkalmazó kutatásoknak ítélték oda. Néhány, korántsem teljességre törekvő, példát a következőkben sorolunk fel (zárójelben a felhasznált állatok faja).

1901 Behring: a diftéria elleni védőoltás kidolgozása (tengerimalac).

1902 Ross: a malária kórokozója életciklusának megértése (galamb).

1912 Carrel: az érsebészeti és szerv transzplantációs sebészeti technikák kifejlesztése (kutya).

1923 Banting és MacLeod az inzulin és a cukorbetegség mechanizmusának felfedezése (kutya, nyúl, hal).

1939 Domagk: az első hatásos antibakteriális szer előállítás (egér, nyúl).

1945 Fleming, Chain és Florey: a penicillin felfedezése (egér).

1952 Waksman a streptomycin, a tuberkulózis első gyógyszerének felfedezése (tengerimalac).

1954 Enders, Weller és Robbins a járványos gyermekbénulás (poliomyelitis) vírusa tenyésztésének megoldása, ami elvezetett a védőoltáshoz. (majom, egér).

1987 Tonegawa: az ellenanyag szintézis alapvető mechanizmusainak megértése (egér embrió).

1999 Furchgott, Ignarro és Murad: a nitrogén monoxid keringési rendszerben játszott alapvető szerepének felfedezése (nyúl, tengerimalac, szarvasmarha).

## **2. Állatvédő - tudományellenes mozgalmak**

Ezeknek a mozgalmaknak a kezdete egybeesik az állatkísérletes kutatásoknak a 19. században való elterjedésével. Az első ilyen mozgalom megalapítása Frances Power Cobbe (1. ábra) egy idősebb angol hajadon nevéhez fűződik. Ő turistaként 1863.-ban Olaszországban tartózkodva tudomást szerzett Maurice Schiff professzor kutyákon végzett élettani kísérleteiről Firenzében és egy petíciót szerkesztett, amelyben a professzort felszólította a kísérletek abbahagyására és amelyet aláíratott az akkor a városban élő angol közösség több tagjával. A tudománytörténészek ezt az eseményt tartják az állatkísérletes kutatások elleni első szervezett tiltakozásnak.



**1. ábra** Frances Power Cobbe

Cobbe Angliába visszatérve írásokat kezdett publikálni és támogatókat próbált szerezni befolyásos emberek között, egyebek között a parlamentben is. 1875-ben megalapította az első „antivivisekciós” társaságot, amely ma is létezik és Lord Caernarvon támogatásával elérte, hogy a parlament elfogadta az első állatvédelmi törvényt. Londoni orvosok és fiziológusok egy csoportja lobbit alakított a törvény megváltoztatására, amelyhez megnyerték tekintélyes szervezetek támogatását, ezek között volt a British Medical Association és a General Medical Council is. Sikerült módosítani a törvény szövegét, amelyet végső formájában 1876-ban fogadtak el és amely kilenc lényeges korlátozást tartalmazott az állatkísérletekkel kapcsolatban, de ezek közül hat alól felmentést lehetett kapni.

Az angol példa nyomán más országokban is alakultak állatvédő egyesületek, amelyek váltakozó intenzitással működtek a következő évtizedekben, tevékenységük azonban az 1960-as évektől jelentősen felerősödött. Sajnálatos módon jelentős részüknél már a 19. századi megalakulásuk óta észlelhető egy összefonódás a tudományellenes irányzatokkal. 1875-ben egy bizonyos Sir George Duckett a következő kijelentést tette Angliában: "Az orvostudomány valószínűleg elérkezett végső határáig és semmit sem tudhat meg és semmit sem nyerhet élő állatokon való kísérletek megismétlésével". Azóta az állatkísérleteket alkalmazó orvostudomány az antibiotikumokat, a védőoltásokat, a szervek átültetését, a cukorbetegség kezelésére szolgáló inzulint, a szívsebészetet és hatékony gyógyszerek sokaságát adta az emberiségnek, hogy csak a legfontosabbakat említsük. Duckett kijelentésének értékét ezek fényében kell vizsgálni.

A tudományellenesség, amely egyike az irracionális irányzatoknak, a 20. században egyes filozófusok kedvenc játékává vált, akik az emberiség problémáiért a tudományt próbálták felelőssé tenni. Ez természetesen nincs így és végképpen nincs így az orvostudomány esetében, amely a betegségek, a szenvedés és a halál ellen küzd. Nem volna szükség szerű ezért, hogy az ugyancsak humánus indíttatású állatvédő mozgalmak a tudományellenességgel társuljanak. Annál is kevésbé kellene, hogy ez így legyen, mert az élettudományokkal foglalkozó kutatók hivatásukból következően tisztelnek minden életet és szeretik az állatokat, még akkor is, ha az emberek - de hozzátehetjük, sok esetben az állatok - érdekében is végzett kutatásaikban állatok feláldozására kényszerülnek. Több mint 70 olyan gyógyszer ismeretes, amelyet emberek és állatok gyógyítására egyaránt alkalmaznak. A poliomyelitis, vagyis járványos gyermekbénulás néhány évtizeddel ezelőtt még rettenetes betegség volt. A legyőzését lehetővé tevő védőoltás kifejlesztéséhez majmokat kellett felhasználni. Amikor azonban a védőoltás elkészült, vele nemcsak ezt a szülők rémét jelentő

betegséget sikerült szinte teljesen kiküszöbölni, de az Afrikában élő ismert állatvédő Jane Goodall csimpánzeit is ezzel oltották be, amikor a majomkolóniát poliomyelitis fenyegette.

Az állatkísérletes kutatások ellenzői két érvrendszert használnak éspedig egymás mellett: egy utilitarista más néven haszonelvű, valójában azonban filozófiailag itt vulgáris utilitarista érvelést; (magáról a valódi utilitarista filozófiáról l. a 4. részt) és egy morális (vagy erkölcsi alapú) érvelést. Érdekes módon sokan nem veszik észre, hogy a kettő egyszerre nem alkalmazható. A vulgáris utilitarista alapon ellenzők szerint az ember és az állatok közötti különbségek olyan nagyok, hogy az állatokon nyert eredmények nem alkalmazhatók az emberre. A tudomány története számtalanszor megcáfolta már ezt az állítást. Valójában az emberi és az állati szervezet lényegileg nagyon hasonló. Ezért lehetséges állatokon nyert eredményeket emberen alkalmazni. Azt feltételezni, hogy a szerte a világban dolgozó sok ezer kutató munkája értelmetlen és például az orvosi Nobel díjak közel háromnegyedét hiábavalóságokért adták ki, enyhén szólva naivitás.

A morális alapon érvelők azt mondják, hogy állatok felhasználása a tudományban egyszerűen erkölcsileg rossz, mert nincs jogunk állati életek elvételére az emberek érdekében. Ennek az érvelésnek az erkölcsi alapjánál azonban nem gyengébb, sőt erősebb az az erkölcsi alap, amelyen az orvostudomány áll, amely azt a hatalmas emberi szenvedést igyekszik enyhíteni, amit a betegségek jelentenek az emberiség számára. Az orvostudomány fejlődéséhez pedig az állatkísérletes kutatások nélkülözhetetlenek. Figyelembe veendő, hogy ezekre a kutatásokra az emberiség által felhasznált összes állat töredékszázalékát fordítják csupán világszerte.

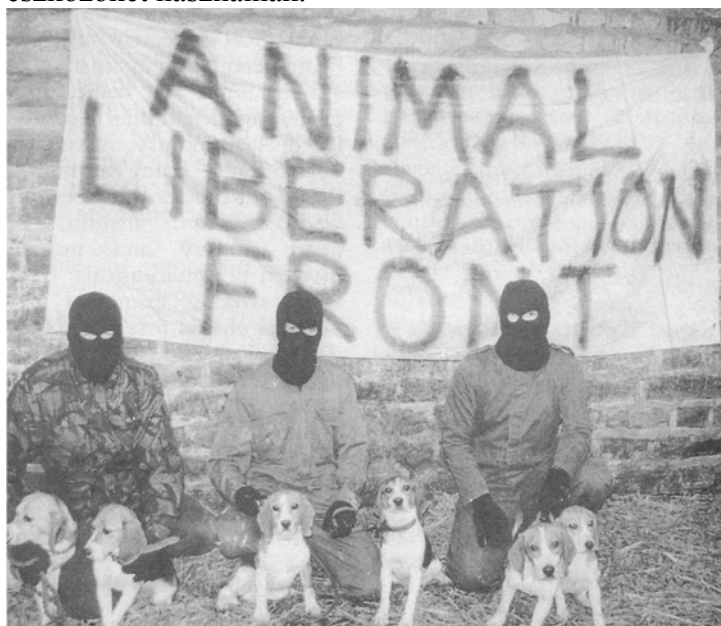
A vulgáris utilitarista ellenző érvelést gyakran morális érvekkel egészítik ki elfeledkezve arról, hogy a kettő egymással nem egyeztethető össze. Elvileg ez a fajta utilitarista érvelés azt állítja, hogy ez ilyen tevékenység (tudniillik az állatkísérletes kutatás) haszontalan, ezért abba kell hagyni. Ha bebizonyosodna, hogy ez nincs így, akkor erkölcsi alapon elvileg nem ellenezné. Ha viszont erkölcsi alapról bírál valaki, akkor vulgár-utilitarista (vagyis haszonelvű) érvelésre nincs szükség, mivel az erkölcsi elvek magasabbrendűek. Egy hipotetikus példával megvilágítva: ha valaki az embereken végzett kísérleteket propagálná (mint ahogy azok a náci Németországban meg is történtek), az teljesen nyilvánvalóan erkölcsi alapon elfogadhatatlan volna, annak ellenére, hogy tisztán vulgár-utilitarista alapon ez ellen semmi kifogást nem lehetne emelni. Nyilvánvaló, hogy a két érvelést nem lehet összekapcsolni.

Az állatvédő mozgalmakra kezdettől fogva az volt jellemző, hogy aránytalanul nagy figyelmet fordítottak a tudományos célra felhasznált állatok sorsára és ehhez képest sokkal kevesebbet az egyéb célokra használt állatokéra annak ellenére, hogy utóbbiak száma több nagyságrenddel magasabb az előbbiekéénél. Ezt az aránytalanságot mutatja be az a tanulmány, amelyben a kutatók az Egyesült Államok földművelésügyi minisztériumának állatok éves felhasználására vonatkozó hivatalos statisztikai adataira támaszkodva megvizsgálták, hogy az állatvédők által publikált irodalom milyen viszonylagos terjedelemben foglalkozik az egyes állatfelhasználási területekkel. A vizsgálat módszere az volt, hogy az állatvédők által legfontosabbnak tartott 25 könyv minden egyes oldalára vonatkozóan megállapították, hogy az melyik területtel kapcsolatban fejez ki aggályt, illetve tiltakozást. Az eredmény röviden a következő volt. Az 1989. évben az USA állatfelhasználási arányai (az összesen felhasznált állatszám százalékában) a következők voltak: emberi élelmezésre 96.5%, vadászat 2.6%, gyepmesteri telepeken megölt 0.4%, tudományos és oktatási célra 0.3%, prémruházat 0.2%. Ezek a hivatalos statisztikai adatok. Ezzel szemben az állatvédő publikációkban az aggályt-tiltakozást kifejező oldalak aránya a következő volt: emberi élelmezés 30.6%, vadászat 2.3%, gyepmesteri telepeken kiírtott 2.3%, prémruházat 0.8%, tudományos és oktatási cél 63.3%. Az aggály-tiltakozás %-ot a tényleges felhasználás %-kal osztva a következő (aggály) hányadosokat kapjuk: élelmezés 0.32, tudományos cél 211.00.<sup>17</sup> Látható tehát az óriási



aránytalanság, amely a ráfordított figyelem és a tényleges tevékenység méretei között fennáll. Ennek háttérében az állatkísérletekkel kapcsolatos hiteles tájékoztatás elégtelenségén alapuló érzelmi tényezők állnak.

Ma a különböző országokban számos állatvédő mozgalom létezik. Ezeknek a spektruma a mérsékelttől a szélsőségesig (állatvédő terrorizmus) terjed (**2. 3. 4. ábra**). Egy tekintetben megegyeznek: valamennyi korlátozni, vagy betiltatni kívánja az állatkísérletes kutatásokat. A mérsékelték a törvényi úton való korlátozást kívánják elérni, ezekkel a kutatói társadalom lehetségesnek tartja az együttműködést egy ésszerű szabályozás keretében. A szélsőséges csoportokkal nem lehetséges az együttműködés, mivel azok törvénytelen eszközöket használnak.



**2. ábra.** Az Állatfelszabadító Front



**3. ábra** Kutató bombamerényletben megsérült autója



4. ábra Állatkísérletek ellen tüntetők

Az állatvédők számának növekedése az utóbbi évtizedekben kapcsolatban van a televíziós csatornák szaporodásával, mivel számos csatorna kizárólag az állatokkal foglalkozik, bemutatva sok faj valóban különleges képességeit. A város lakó emberek egy része kizárólag ezekből szerzi állatokra vonatkozó információit, mivel saját tapasztalata nincs, illetve akiknek van, az túlnyomórészt házi kedvenceikre főleg kutyájukra, esetleg macskájukra korlátozódik. Ezekkel kapcsolatban igen erős érzelmi kötődések jöhetnek létre. Különösen jelentősek lehetnek ezek a kötődések, magányos vagy emberi kapcsolataikban frusztrált, sok esetben mizantróp egyének esetében. Idézet Ingrid Newkirk ismert aktivistától: „Nem vagyok morózus ember, de legszívesebben nem volnék itt. Nem tisztelem az életet, csak annak egyedeit. Legszívesebben egy üres helyet látnék ott, ahol vagyok. Ez csak dumának tűnik, de legalább nem okoznék kárt semmiben”.<sup>18</sup> Az állatvédők között számos ilyen ember található. Egy másik jelentős tényező az ún. „Walt Disney effektus” ami a rajzfilmek kedves, antropomorf megjelenésű és emberi érzelmeket mutató, de a valós helyzettől távol álló állatfiguráinak tulajdonítható.

Az érzelmi tényezőkön alapuló aktivitás azután különböző formákat ölthet különböző egyéneknél. Sajnálatos, ha ez erőszakos cselekedetekben nyilvánul meg. Hazánkban ez szerencsére még nem történt meg (fenyegetések már voltak), de más országokban már igen. Néhány évvel ezelőtt az Egyesült Államok szenátusa által elrendelt vizsgálat több százmillió dolláros kárt mutatott ki állatokat használó létesítményekben, köztük kutató laboratóriumokban való betörések, az ezekben történt rombolások, gyűjtogatások következtében. Több ezerszámmal engedtek szabadon laboratóriumi állatokat, bizarr módon olyanokat is, amelyek a szabadban való életre nem alkalmasak és hamarosan elpusztultak.

Néhány példa szélsőséges kijelentéseikre. Ingrid Newkirk (alapító, *People For The Ethical Treatment of Animals* = PETA, Magyarországon is működő szervezet): „Csodálom, hogy az összes laboratórium még nem égett földig. Ha bátrabb volnék, meggyújtanék egy gyufát”.<sup>19</sup> Ugyancsak ő: „Az állatfelszabadítók szerint nincs ésszerű alapja azt mondani, hogy az embernek különleges jogai vannak. Egy patkány, egy sertés, egy kutya és egy fiú egyenlők. Mind állatok”.<sup>20</sup> Michael Fox (alelnök, *The Humane Society*): „Egy hangya és az én gyermekem élete egyforma megfontolást érdemel”.<sup>21</sup> Alex Pacheco (elnök, PETA): „Gyűjtogatás, rombolás, betörés és lopás elfogadható bűnök, ha az állatok érdekében történik”.<sup>22</sup> Dan Matthews (szóvivő, PETA, arra a kérdésre, hogy milyen következményei lennének, ha abbahagynák az állatkísérleteket): „Először is ne légy beteg hapsikám” (finomított fordítás).<sup>23</sup> Jerry Vlasak (*Animal Liberation Press Officer*): „Nem hiszem, hogy

túl sok kutatót kellene megölni, 5, 10, 15 emberi életért cserébe megmenthetnénk 1, 2, 10 millió állati életet”.<sup>24</sup>

Az állatvédő mozgalmak aktivistái nagy általánosságban három irányban fejtik ki tevékenységüket az állatkísérletes kutatásokkal szemben (egyéb, sokszor jogos, állatvédelmi tevékenységük nem tárgya ennek a fejezetnek). Ezek a következők: **a.)** erkölcsfilozófiai érvelések, **b.)** az állatkísérletekkel kapcsolatos tények hamis beállítása és **c.)** vandalizmus, megfélemlítés és terrorcselekmények. A mérsékelt, a kutatói közösséggel való együttműködésre alkalmas csoport kizárólag az **a.)** csoportba tartozó módszereket alkalmaz. A továbbiakban csak ezzel a területtel foglalkozunk.

### 3. Vannak-e jogaik az állatoknak?

Erkölcsfilozófiai alapokra hivatkozó, állatkísérleteket elítélő nézeteknek két irányzata van. Az egyik szerint az állatkísérletek helytelenek, mert megsértik az állatok *jogait*.<sup>25</sup> A másik nézet szerint azért, mert érző lényeknek sok, elkerülhető szenvedést okoznak.<sup>26</sup> Egyik érvelés sem helytálló. Az első a jogok hibás felfogásán alapul, a második a következmények hibás kiszámításán.

Ahhoz, hogy megérthessük, hogy vannak-e jogaik az állatoknak foglalkoznunk kell azzal a kérdéssel, hogy valójában mi is a jog? A jog, helyesen értelmezve, egy követelés (igény), amelyet az egyik fél a másikkal szemben támaszt. Akivel szemben támasztják az lehet egy személy, egy közösség, vagy (esetleg) az egész emberiség. A jogok tartalma igen változatos lehet: kölcsönök visszafizetése, munkavállalók diszkriminációmentes foglalkoztatása, a szólásszabadságba való be nem avatkozás az állam részéről stb. Ahhoz, hogy bármilyen jogot helyesen értelmezhesünk tudnunk kell, hogy *ki* támasztja azt, *kivel szemben* és *mi a tartalma*?

Bonyolítja a helyzetet, hogy a jognak különböző forrásai lehetségesek. Egyes jogok az alkotmányból és a törvényből származnak (pl. egy megvádoltnak joga van bírósági tárgyalásra), más jogok az erkölcsben gyökereznek, de törvényi igényt nem támaszthatnak (pl. jogom arra, hogy megtartsad a nekem tett ígéretedet), ismét más jogok mind az erkölcsből, mind a törvényből erednek (pl. az a jogom, hogy ne lopjanak meg, vagy fizikailag ne támadjanak meg).

A jogok különböző forrása és tartalma valamint az, hogy ki támasztja kivel szemben szövevényes hálót alkot. Az azonban világos, hogy a jog végső soron az erkölcsön alapul és minden esetben olyan követelésről van szó, amely morális cselekvők (morális ágensek) közösségében keletkezik. Jogok csak olyan lények között támadnak és védhetők meg, akik morális követeléseket támasztanak, vagy támaszthatnak a másikkal szemben. A jogok birtokosai ezért személyek, emberi lények.

Csupán emberek számára merülnek fel tisztán erkölcsi döntések, csak ők – és semmiképpen sem patkányok, macskák vagy egerek – fektetnek le erkölcsi törvényeket a maguk és mások számára. Az állatoknak nincs meg a képességük a morális mérlegelésre. Nem olyan lények, amelyek morális követeléseket támaszthatnának, vagy ilyenekre reagálnának. Az állatoknak tehát nincs és nem is lehet joguk. A jogok birtokosainak fel kell ismerniük az esetleges konfliktusokat, amelyek a saját érdekeik és a között állnak fenn, ami helyes. Amikor tehát kísérleteket végzünk állatokon nem sértjük meg jogaikat, mert ilyenek nincsenek (bár nem tartozik tárgykörünkbe, de ugyanez a helyzet, ha állatokat táplálékként fogyasztunk el).

Ebből azonban semmiképpen sem következik az, hogy erkölcsileg szabadok vagyunk abban, hogy bármit megtehesünk az állatokkal. Távolról sem. Az állatokkal való kapcsolatunkban, mint ahogy más emberekkel való kapcsolatunkban is vannak kötelezettségeink, amelyek nem származnak velünk szembeni, jogra alapozott követelésekből. A jogok kötelezettségekkel járnak, de sok dolog, amit meg kell tennünk nem kapcsolatos

mások feljogosítottságával. A jogok és a kötelezettségek nem egymás fordítottjai, ezt feltételezni súlyos hiba volna.

Néhány példa segít megérteni az előzőeket. Belső elkötelezettségből erednek például orvosok kötelezettségei betegeik iránt, ami nem csupán a betegek jogaiból következik. Tanároknak is vannak ilyen kötelezettségei tanítványaik iránt. Felnőtteknek különös gondosságot kell tanúsítani, ha gyermekekkel játszanak (pl. futballoznak). Még kisgyermeknek is vannak kötelezettségeik ajándékba kapott kedvenc állataik iránt. Szülőknek gyermekeikhez fűződő kapcsolatából eredhet elkötelezettségük arra, hogy fizessék azok egyetemi tanulásának költségeit, vagy nyelvi, zenei stb. különóráik díját, ha erre képesek, még ha a gyermeknek formálisan nincs is joga ezt követelni. Kötelezettséget érezhetek valaki iránt, aki nagy jót tett velem.

Kevesen tagadják azt a kötelezettségünket, hogy az állatokkal emberségesen viselkedjünk. Az, hogy emberségesen viselkedünk velük szemben, nem jelenti azonban azt, hogy az állatokat emberként kezeljük. Emberek között is vannak olyanok, akik erkölcsi mérlegelésre képtelenek (pl. agykárosodottak, kómában levők, szenilisek) ők mégsem vesztik el jogukat. Az erkölcsi mérlegelésre való képesség, amely az embert az állattól megkülönbözteti nem egy szűrő, amellyel egyenként osztályozzuk az embereket. Az olyan személyeket, akik valamilyen kórállapot miatt nem tudják teljesen gyakorolni erkölcsi funkcióikat nem vetjük ki a morális ágensek (emberek) közösségéből. Itt embervoltunk lényegéről van szó. Embervoltunk lényegéből következik, hogy emberen kísérleteket nem lehet végezni, vizsgálatokat is csak önkéntes beleegyezéssel. Állatok lényegi mivoltukból eredően nem adhatnak vagy nem tagadhatnak meg önkéntes beleegyezést és nem hozhatnak erkölcsi döntéseket. Amit a magatehetetlen beteg emberek elvesztettek azt az állatok sohasem birtokolták.

Állatok néha bámulatos képességeket mutatnak. Tanulás, ösztönök, intelligencia hozzájárulnak egy faj túléléséhez. Erkölcsi közösségekben való tagság azonban lehetetlen számukra. Erkölcsi cselekményekben megkülönböztetünk egy belső és egy külső dimenziót. A törvény csak akkor beszél büntényről, ha a bűnös cselekedet, *actus reus* bűnös szándékkal (elmével) párosul, *mens rea*. Állat ezért bünt sem követhet el, állatokat bíróság elé állítani (a középkorban előfordult) primitív tudatlanság jele. Van-e joga az oroszlánnak megenni egy zebracsikót? Van-e joga egy zebracsikónak ahhoz, hogy az oroszlán ne egye meg? Ezek értelmetlen kérdések. Az ilyen kérdések hibásan a jogra hivatkoznak ott, ahova az nem tartozik. Akik az állatkísérletes orvosi kutatásokat az „állati jogokra” hivatkozva ítélik el, ugyanezt a hibát követik el.

#### 4. Van-e erkölcsi alapunk állatok felhasználására a tudományban?

Az állatkísérletek egyes ellenzői, elhagyva az állatok jogaira való hivatkozást, az állatok által érzett fájdalomra és stresszre hivatkoznak. Ők azt mondják, hogy tartózkodnunk kell, amennyire lehetséges, hogy fájdalmat okozzunk. Ez tulajdonképpen Jeremy Bentham 18. századi angol filozófus nézeteire támaszkodik<sup>27</sup> (5. ábra). Szerinte a világban jelenlevő összes szenvedést („*pains*”) csökkenteni, az örömet, jólétet („*pleasures*”) pedig növelni kell. Ez az általa alapított filozófiai utilitarizmus alaptétele. Az állatkísérletekre alkalmazva, azok ellenzői gyakran idézik azon kijelentését (lovakkal, kutyákkal kapcsolatban), mely szerint „Nem az a kérdés, hogy tudnak-e gondolkodni, tudnak-e beszélni, hanem az, hogy tudnak-e szenvedni?” Az állatok tudnak szenvedni és kétségkívül nem szabad, hogy szükségtelenül szenvedjenek. Az a kritika azonban, amely ezekből a kétségbevonhatatlan premisszákból kiindulva kétségbe vonja az állatkísérletek helyességét két súlyos hibát követ el: egyformán ítéli meg az állati és az emberi szenvedést és hibásan számítja ki az állatkísérletek abbahagyásának következményeit.



**5. ábra**      Jeremy Bentham

Az első hiba, amelyet ezen nézet terjesztői elkövetnek az, hogy minden érző lénynek egyforma morális státust tulajdonítanak. Ezen kritikusok szerint morális szempontból nincs különbség állatok és emberek által elszenvedett fájdalom között. Szerintük, aki tagadja ezeket a különbségeket és jogosulatlanul előnyt biztosít egyik fajnak a másik felett, az „szpecieszista”. Ennek a nézetnek prominens képviselője Peter Singer.<sup>26</sup> Szerinte a „szpecieszista” a rasszistához, vagy az ún. ’szexistához’ hasonlítható. A rasszista saját rasszának érdekeit más rasszoké elé helyezi, a szexista pedig a nemek egyenlőségének elvét sérti meg.

Ez az érvelés alapvetően rossz és elutasítandó. A rasszizmusnak semmiféle racionális alapja sincsen. Az, hogy emberek különböző fokú tiszteletet érdemelnének pusztán azért, mert egyik vagy másik rasszhoz tartoznak alapvetően igazságtalan és nagy erkölcsi rombolást jelentő téves eszme, amely már szörnyűségekhez vezetett. Elítélendő az ún. ’szexizmus’ is.

A fajok között azonban, pl. az embert a macskával vagy patkánnyal szembeállítva, a morálisan értékelhető különbségek óriásiak. Az ember foglalkozik morális mérlegeléssel, az ember morálisan *autonóm* (Kant), tagja morális közösségeknek, amelyek jogos követeléseket elismernek saját érdekeikkel szemben. Az embereknek vannak jogaik, erkölcsi státusuk nagyban különbözik a macskák vagy a patkányokétól.

A „szpecieszista” jelző önmagában még elfogadható lenne is, de a rasszizmushoz való hasonlítása alattomos és botrányos. Minden erkölcsi megítélésnél szükséges figyelembe venni azon élőlények alapvető jellegét, akikre kötelezettségeink vonatkoznak. Ha mindenfajta (gerinces) élőlényt egyformán kell kezelnünk, akkor, egy hipotetikus példában egy kutatási program elbírálásánál abból kiindulva, hogy egy rágcsáló és egy ember által érzett fájdalom egyformán számít, arra kellene következtetnünk, hogy vagy (1) sem az emberek, sem a rágcsálók nem rendelkeznek jogokkal, vagy (2) a rágcsálóknak ugyanazok a jogaik, mint az embereknek. Mindkét alternatíva abszurd. Mégis, ha a fajok morális egyenlőségének álláspontjára helyezkednénk egyiket vagy a másikat el kellene fogadnunk.

Embernek, más emberek iránt egy bizonyos morális tisztelettel (elismeréssel) tartoznak, amelyet állatoknak nem adhatnak meg. Egyes embereknek (orvosok és kutatók) fő elkötelezettsége életükben az, hogy más embereket meggyógyítsanak, a betegségek, a szenvedés és a halál ellen küzdjenek a tudományra alapozott tevékenységükkel. Ezen kötelezettségük teljesítése sok állat feláldozásával járhat.



Ha a kutatóorvosok, élettudományi kutatók abbahagynák munkájukat azért, mert arra a meggyőződésre jutnának, hogy nem tehetik meg az állatokkal azt, amit az emberek szolgálata megkíván tőlük, akkor valójában nem teljesítenék hivatásukat. Ez óriási szerencsétlenség lenne. Ekkor megvalósulna Ingrid Newkirk-nek a korábbiakban idézett kijelentése („...a rat is a pig is a boy...”). Még ha igaz volna is – ahogyan biztosan nem az – hogy minden élőlény fájdalmát egyformán kell számba venni, egy következetes utilitarista számítás megköveteli, hogy mérlegeljük az összes következményét annak, ha használunk és annak is, ha nem használunk állatokat a kutatásokban. Láttuk, hogy azok az ellenzők, akik az ú.n. állati jogokra hivatkozva azt állítják, hogy a kutatások jótékony eredményei ellenére is a jogok elsőbbséget élveznek az érdekekkel és az előnnyel szemben, hibás úton járnak. De az utilitarista alapon érvelőknek is – amely elmélet a mindenki számára hosszú távon megvalósítható legtöbb jó és legnagyobb érdek alapján áll – figyelembe kell venni, az állatkísérletes kutatások abbahagyásának káros következményeit, valamint az ezekkel elért és a csak ezekkel elérhető előnyöket. Az előnyök óriásiak. Rettenetes betegségek kiküszöbölése, az élettartam megnövelése, szörnyű fájdalmak enyhítése, az életminőség javítása (emberek és állatok számára) olyan hatalmas jótétemények, amelyek, ha következetesen figyelembe vesszük őket, nemhogy alátámasztanak ezen ellenzők következtetéseit, hanem éppenséggel azok fordítottjához vezetnek bennünket, vagyis: *nem használni állatokat az élettudományi kutatásokban utilitarista filozófiai alapon erkölcsileg helytelen.*<sup>28</sup>

Ha Bentham terminológiáját alkalmazva mérlegeljük az összes hasznot (jóléte: „pleasures”) és az összes szenvedést („pains”) ami az állatkísérletekkel kapcsolatos, nem szabad elfelejtenünk a mérleg serpenyőjébe helyezni mindazt a szörnyű szenvedést, ami a múltban létrejött volna, ami a jelenben sújtana, és ami a jövőben jelentkezne, ha nem történtek volna állatkísérletek. A mérlegelésben nem hagyhatjuk figyelmen kívül azokat a megjósolható előnyöket az emberi és állati jólét vonatkozásában, amelyeket nagy valószínűséggel elérünk a jövőben, de amelyeket nem érnénk el, ha most abbahagynánk a kísérleteket.

A kutatók ritkán érzéketlenek az iránt a szenvedés iránt, amit kísérleti állataik éreznek, sőt ezeket minden eszközzel (a kísérletek eredményessége érdekében is) minimalizálni igyekeznek. A kutatások ellenzői gyakran érzéketlenek az általuk elérni kívánt (egészen a betiltásig terjedhető) korlátozások kegyetlen következményei iránt. Mérhetetlen számú ember szenvedne súlyosan a jövőben eme jószándékú, de rövidlátó könyörületesség miatt. Ha az emberek és az állatok közötti morálisan értékelhető különbségeket, valamint az összes hosszú távú következményt figyelembe véve mérlegelünk, a mérleg nyelve igen nagymértékben a kutatások javára billen.

## 5. Az állatvédelmi törvény

Magyarországon állatvédelmi, állatkínzást tiltó jogszabályok a 19. század vége óta léteztek. Átfogó, számos területet magába foglaló állatvédelmi törvény azonban csak 1998. óta. Ez az 1998. évi XXVIII. törvény, „Az állatok védelméről és kíméletéről”, amely kiemelt terjedelemben foglalkozik az állatkísérletekkel. Számos kapcsolódó jogszabálya közül ehhez a területhez köthető a 243/1998 (XII.31.) kormányrendelet, „Az állatkísérletek végzéséről”; a 36/1999 (IV.2.) FVM-KÖM-GM rendelet, „A kísérleti állatok tenyésztésének, tartásának, szállításának stb. szabályairól” valamint a 10/1999 (I.27.) FVM rendelet, „Az állatvédelmi tanácsadó testületről”.

A magyar törvény még hazánknak az Európai Unióhoz (EU) való csatlakozása előtt lépett hatályba, de elkészítésében figyelembe vették az EU vonatkozó ajánlását. Ezt az Európa Tanács 1986-ban hozott, azóta módosított 123. konvenciója tartalmazza.<sup>29</sup>

Az állatkísérletek szempontjából a törvény lényege, hogy azokat csak engedéllyel szabad végezni. Engedéllyel kell rendelkeznie annak az intézménynek, ahol az állatkísérlet

történik. Ilyen intézményekben Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságot (MÁB) kell alakítani. Engedéllyel kell rendelkezni a kutatási programnak, valamint az abban résztvevőknek. Az engedélyek határozott időre szólnak. Az engedélyeztetési folyamat láncolata a következő. A kutatási program vezetője a MÁB-nak nyújtja be kérelmét, amely azt elbírálja, majd ha alkalmasnak találja, *jóváhagyja*. A jóváhagyott kérelem az országos jellegű Állatvédelmi Tanácsadó Testület (ÁTT) tagjaiból választott Állatkísérleti Tudományos Etika Tanács (ÁTET) elé kerül, amely azt engedélyezésre *javasolja*, módosításra visszaküldi, vagy elutasítja. Az engedélyezésre javasolt programot a területileg illetékes Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás, mint hatóság *engedélyezi*. Ugyanez a hatóság végzi az állatkísérleti intézmények, létesítmények és programok *ellenőrzését* is.

A törvény értelmében állatkísérlet kizárólag a következő célból végezhető: *a)* az ember, a gerinctelen és gerinces állatok vagy növények betegségének, kóros egészségi állapotának, rendellenességének megelőzése, felismerése és gyógyítása, ideértve a gyógyszerek, vegyi anyagok és más termékek termelését, minősítését, hatékonyságának, illetve ártalmatlanságának vizsgálatát; *b)* az ember, a gerinctelen és gerinces állatok vagy növények élettani állapotának feltárása, vizsgálata, szabályozása vagy módosítása; *c)* a környezet védelme; *d)* tudományos kutatás; *e)* oktatás és gyakorlati képzés; *f)* igazságügyi orvostani vizsgálatok; *g)* speciális kísérleti állatok tenyésztése.

Állatkísérlet kizárólag olyan felelős személy vezetésével végezhető, aki külön jogszabályban meghatározott végzettséggel és gyakorlattal rendelkezik, és ismeri az állatkísérletek etikai elveit, jogi szabályait.

Állatkísérletet az végezhet, a kísérleti állatot az gondozhatja, felügyelheti, aki erre képesítő oktatásban részesült.

## **6. Állatvédelem a Szegedi Tudományegyetemen**

Az egyetem egyike az állatkísérletek végzésére jogosult intézményeknek. Küldetésének megfelelően nagy jelentőséget tulajdonít a tudományos kutatásoknak és ezeken belül az állatkísérletes kutatásoknak. Ez utóbbiakra vonatkozó álláspontja megtalálható az SZTE honlapján a <http://www.u-szeged.hu/object.3fa73d37-277e-469b-886c-658a796f16c8.ivy> helyen. Ugyanitt más, hasznos dokumentumok is elérhetők, így többek között az **MTA osztályközi Állatkísérleti Tudományos Bizottságának álláspontja az állatok tudományos célra történő felhasználásáról** valamint az SZTE MÁB működési szabályzata és kísérletek engedélyezéséhez szükséges, letölthető űrlapok.

A Szegedi Tudományegyetem hivatása humánus elveinek megfelelően fontosnak tartja az itt folyó állatkísérletes munkában az állatvédelem szempontjainak érvényesítését. Orvosi karán már 1992-ben, saját kezdeményezésből, az országban először Állatvédő Tudományetikai Bizottságot hozott létre, amely a mai MÁB elődjének tekinthető. Az egyetemen folyó állatkísérletes kutatásokra vonatkozóan kötelező érvényű etikai kódex van érvényben.

## **7. A Szegedi Tudományegyetem állatkísérleti etikai kódexe**

Az SZTE álláspontja szerint az állatkísérletek társadalmi hasznossága, nélkülözhetetlensége és erkölcsi alapjai megkérdőjelezhetetlenek. Fontosnak tartjuk ugyanakkor, hogy az állatokon folytatott kutatásokban érvényesüljenek az alábbi elvek.

1. Az állatok szállítása, gondozása, tartása, takarmányozása és felhasználása legyen összhangban az állatvédelmi törvény előírásaival.
2. Állatok felhasználásával járó kutatásokat úgy kell tervezni és végrehajtani, hogy azok az emberi vagy állati egészség és a társadalom javára szolgáló tudást gyarapítsák.
3. A kutatónak erkölcsi kötelessége minden kísérletet állatkíméleti szempontból is végiggondolni.

4. A kutatóknak és a személyzetnek megfelelően képzettnek kell lenniük élő állatokon végzett beavatkozásokban. Képzésükről megfelelő formában gondoskodni kell. A képzés foglalja magában az állatok helyes gondozásának, a velük való humánus bánásmódnak és az alapvető beavatkozási módszereknek az elsajátítását.
5. Az állatok tartása fajuknak megfelelő legyen. Tartásukat, táplálásukat és gondozásukat állatorvos, vagy olyan kutató felügyelje, aki kellően képzett és tapasztalt a tartott, vagy tanulmányozott faj megfelelő gondozásában és a vele való bánásmódban. Szükség esetén állatorvosi ellátásban kell részesíteni az állatokat.
6. Tudományos célra a megfelelő fajú állatokat kell alkalmazni. Számuk a statisztikailag értékelhető eredményekhez szükséges minimum legyen, ugyanakkor kerülni kell az ennél kisebb számú egyed felhasználását is (ez nyilvánvalóan állati életek pazarlása lenne). Ahol lehetséges és észszerű, alkalmazandóak a kiegészítő módszerek, pl. matematikai modellek, *in vitro* rendszerek, stb.
7. Amennyiben az állatkísérlet tudományos megfontolásaival nem összeegyeztethetetlen, a következő szabályokat kell betartani. Az állatok felhasználása során el kell kerülni, vagy minimalizálni kell kényelmetlenség- ("diszkomfort") és fájdalomérzetüket. Hacsak az ellenkezőjét nem bizonyítják az adott esetben, a kutatóknak abból kell kiindulni, hogy olyan eljárások, amelyek fájdalmat okoznak emberben, ugyanezt idézik elő állatokban is. Az állatokon végzett olyan eljárásokat, amelyek több mint pillanatnyi, vagy több mint csekély fájdalommal járnak, megfelelő nyugtatás, fájdalomcsillapítás, vagy érzéstelenítés alkalmazásával kell végezni. Sebészi, vagy más fájdalmas beavatkozást nem érzéstelenített, izomrelaxánssal kezelt állaton nem szabad végezni.
8. Ha a kísérlet során az állatot hosszantartó és káros hatás éri, azt újabb vizsgálatra felhasználni nem szabad. Az olyan állatok életét, amelyek egyébként súlyos vagy tartós, nem csillapítható fájdalmat éreznének, humánus módon ki kell oltani.
9. Állatok felhasználásával folyó kutatások a Szegedi Tudományegyetemen kizárólag a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság hozzájárulásával az állategészségügyi hatóság engedélyével folyhatnak.
10. Az SZTE kutatói nem kötnek olyan kutatási szerződést, továbbá nem támogatnak olyan közleményt, amely ezeknek az etikai elveknek nem felel meg.



### III. A kísérleti állatok tartásának és gondozásának alapvető kérdései (Dr. Gaál Balázs)

A kísérleti állat az emberi szervezet működését akkor modellezheti, ha a funkciók esetében teljes, vagy nagymértékű a hasonlóság (tehát a modell egyben mérőeszköz is). A kísérleti eredmények csak akkor fogadhatók el, ha a mérés pontos, hiteles és megismételhető. Ezek az elvárások leginkább akkor valósulnak meg, ha a kísérleti és a kontroll csoport csak egyetlen vonásban, mégpedig a vizsgált tényező tekintetében tér el egymástól. Az állatok érzékenységeiben (egyes reakciókban megmutatkozó válaszadó képességükben) genetikai okokból jelentős különbségek vannak, ezért egy adott kísérletben egyes fajok vagy törzsek különösen alkalmasak vagy alkalmatlanok lehetnek.<sup>30</sup>

A laborállatokkal kapcsolatban alapvető igény, hogy legyenek olcsók, és tartásuk egyszerű legyen. Ma ezeknek a kívánalmaknak leginkább a rágcsálók felelnek meg. A laboratóriumi emlősök közül a felhasználás gyakoriságát tekintve az egér és a patkány együttesen kb. 90%-ot tesz ki, de az utóbbi évtizedekben a felhasznált mennyiség a korábbi időszakok tizedére csökkent. Társállatként is tartott fajok, pl. tengerimalac, nyúl felhasználási aránya ehhez képest igen alacsony. A felhasználás jelentős csökkenésének okai az állatmentes mérési eljárások fejlődése, a sajátos tulajdonságú állatok (beltenyésztett, SPF, ld. később) alkalmazása, valamint az árnövekedés is.<sup>30</sup>

#### 1. A leggyakoribb laboratóriumi emlősök biológiája

##### 1.1. Egér

Tipikus rágcsáló, állandóan növekvő metszőfogakkal, ezért a koptatás miatt kemény táplálékot igényel. Jellemző a bélsárevés (*koprofágia*). Sokat mozognak, másznak, megijedve haraphatnak. Az ivarérett hímek agresszívek egymással. Érzékenyek a hőingadozásra, huzatra, magas páratartalomra. Élettartamuk 1-2 év. Az ivarérettség 6-8 hónapos korban következik be. A nemi működés egész évben folyamatosan, ciklusosan ismétlődik (*poliösztuszosak*). Az ivari ciklus hossza átlagosan 4 nap, a vemhességi idő 13-21 nap, az ellés után azonnal ivarzanak. Az alomnagyság 6-10 db, a szopósok leválasztása 3 hetes korban történik.

##### 1.2. Patkány

Anatómiai különlegesség pl. a szemzugokban lévő Harder-féle mirigy (váladéka a porfirin tartalomtól színes – ld. I. fejezetet is), vagy az epehólyag hiánya. A fogazat olyan, mint az egéré (tipikus rágcsáló). A táplálékfogyasztását energetikai alapon szabályozza. Az egérhez képest kevésbé mozgékony, nem agresszív. Átlagos élettartama 2-3 év. Érzékeny a huzatra, a magas ammónia szintre, az alacsony páratartalomra és a zajokra. Fogékony a légúti fertőzésekre. A szaporodás biológia szinte megegyezik az egérével. A vemhességi idő 21-23 nap.

##### 1.3. Tengerimalac

A kutatásban leginkább használt törzsek rövidszőrűek. A tengerimalac új vagy félelmet keltő élmények hatására könnyen pánikba esik. Ilyenkor szétszóródnak a ketrec sarkaiba, vagy dermedten, mozdulatlanul egy helyben maradnak. Ideges egyedekben fogcsattogtatás is megfigyelhető. Az átlagos élettartam 4-5 év. Minden foguk nyitott gyökerű, folyamatosan növekvő. Növényevő, nem valódi rágcsáló, hatalmas vakbelük van. Nem szintetizálnak C-vitamint, ezt a táplálékkal kell felvenni (C-vitaminnal kiegészített speciális, pelletált táppal kell etetni). A tengerimalac poliösztuszos, egész évben szaporodik (tenyészthető). Spontán ovulátorok (spontán peteleválás). A ciklus hossza 15-17 nap, az ivarzás 1-2 napig tart. Az átlagos vemhességi idő 65 nap. Az átlagos alomnagyság 3-4 db. Az utódok születéskor jól fejlettek, az elválasztás 14-28 napos korban történik.

#### 1.4. Házinyúl

A kutatásban leggyakrabban a közepes testű, 2-5 kg-os testtömegű (Új-Zélandi, Kaliforniai) fajtákat használják. A nyúl élettartama 5-6 év. Minden fog nyitott gyökerű és folyamatosan növekszik. A nyúl nem tud hányni (mint a patkány és a ló). Növényevő. A vakbél nagy és a féregnyúlványban végződik, ami jelentős mennyiségű nyirokszövetet tartalmaz. Koprofágok, a lágy (ún. éjszakai) bélsarat megeszik. A nyulakat leginkább pelletált kereskedelmi nyúltáppal etetjük, mely beltartalmilag komplett. A vérerekkel jól ellátott fülkagylók a hőszabályozásban töltenek be fontos szerepet. A méhük kettős (*uterus duplex*), kettős méhnyakkal. A tenyészettség kezdete 5-6 hónapos kor a közepes testűeknél. Indukált ovulátorok (párazás által indukált tüszőrepedés), szabálytalan nemi ciklussal. A párazásra alkalmas nyúl pérája vérbő és lila. Az átlagos vemhességi idő 32 nap. Kevéssel a fialás előtt a nőtény fészket épít a kitépett szőreből. Az átlagos alom-nagyság 7-8 db, a leválasztás ideje 4-6 hetes kor.

#### 1.4. Szíriai aranyhörcsög

A hörcsög a harmadik leggyakrabban használt laborállat, 90%-ban szíriai aranyhörcsög. Gyakran harap ha nem megfelelően nyúlnak hozzá, ha fél, ha sérült, vagy ha éppen alvásból ébredt fel. A nőtények nagyobbak és agresszívebbek, mint a hímek. Élettartamuk 1.5-2 év. A metszőfogak nyitott gyökerűek, folyamatosan nőnek. Jellegzetesek a pofazacskók, melyek a lapockákig terjednek és nagyon tágulékonyak. Kereskedelmi, pelletált hörcsög- vagy rágcslótáppal kell táplálni. A horpasz- vagy illatmirigyek sötét pöttyként láthatóak a horpaszoknál (faggyúmirigyek, a területjelölésben és a párazási viselkedésben van szerepük). Húgycsőjük a hüvely alatt, különállóan nyílik. Kb. 3 hónapos korban válnak ivaréretté. Poliösztrozusosak, egész évben szaporodnak, az ivarzás 4 napig tart, az átlagos vemhességi idő 16 nap. Az átlagos alomszám 5-9 db. A kannibalizmus gyakoribb, mint más rágcslóknál. A leválasztás a szopósok 3 hetes korában történik.

#### 1.5. Vadászgörény

A vadászgörények átlagos testtömege 0.8-1.2 kg; átlagos életkoruk 5-11 év. Szezonális testtömeg vesztés tavasszal előfordul. Bőrük vastag, izzadságmirigyek nélkül (ezért hamar túlhevülhetnek), aktív faggyúmirigyekkel, amik az illatukért felelősek, miként a páros végbélmirigyek ("bűzmirigyek") is. A görényeknek különleges kardiovaszkuláris anatómiájuk, nagy lépük van. Szigorú húsevők, ragadozók, rövid gyomor-béltraktussal, vakbél nélkül. Magas fehérje és zsírtartalmat, alacsony szénhidrát tartalmat igényelnek a táplálékban. Macskatáppal vagy speciális görénytáppal etethetők.

#### 1.6. Törpesertés (*minipig; micropig; vietnami „csüngőhasú” sertés*)

A törpesertések társas (szociális) állatok és szigorú, tekintélyelvű hierarchiában élnek. Csoportos elhelyezésben általában 1-2 nap alatt harccal döntik el az erőssorrendet, amely csaknem közvetlenül a testmérettel áll összefüggésben. Általában barátságosak, okosak és rosszul reagálnak a nem szakszerű kezelésre. Zajos állatok. A házi sertés betegségeire fogékonyak, érzékenyek a szélsőséges hőmérsékletekre (főleg az extrém melege, magas páratartalommal), porra és huzatra. Átlagos élettartamuk 10-12 év. Táplálásukra megfelelnek a kereskedelmi sertéstápok, de az elhízás elkerülése fontos. Átlagos testtömegük 15-40 kg. A tenyészettséget 6-7 hónapos korban érik el. Poliösztrozusos, az ivari ciklus 18-24 nap, a vemhességi idő 114-115 nap. Az átlagos alomnagyság 5-8 db. Leválasztás 4-5 hetesen történik.

#### 1.7. Macska

A macska szigorú húsevő és ragadozó. Tökéletes látással és hallással bír, de szaglása gyengébb a kutyaénál. Territoriális állatok, területüket vizeletspricceléssel és a felületek feromonokkal történő bekenésével jelölik meg (szaglási kommunikáció). Nem szocializáltak, de a csoportban éléshez hozzászoktathatók. Az ideális csoport kb. 20 egyed, ami lehetővé teszi viszonylag stabil hierarchia kialakulását. A macskának néhány élettani jellemzőben több hasonló tulajdonsága van az emberrel, mint a nyúlak vagy a rágcsálóknak, ezért széles körben használják a viselkedési és orvosbiológiai, különösen a neurológiai kutatásban. A tenyészállatok átlagos élettartama 10-13 év. A macska nem él meg más húsevők, mint pl. a kutya részére előállított táplálékon, speciális macskatápot igényel (pl. taurin szükséglet). A nőstény macskák szezonálisan poliösztroszosak, de kisebb hányaduk folyamatosan pározhat. Poligámiában is jól szaporíthatók. Az egyetlen lehetőség az ivarzás felismerésére a viselkedés változások észlelése, ami 4-6 napig tart. Az ovuláció indukált (a pározás váltja ki a tüszőrepedést), a vemhességi idő 59-65 nap. Az átlagos alomszám 4-6 db, leválasztás 5-6 hetes korban történik.

## **1.8. Kutya**

A kutyák erősen szocializáltak, barátságos, emberszerető állatok. Mind a fajtársakkal, mind az emberrel való szociális kapcsolat fontos a jó közérzetükhöz, ezért a szociális izoláció és egyedi elhelyezés igen fontos stresszor. Megfelelően kialakított csoportokban jól tarthatók. A legideálisabb laboratóriumi kutya a beagle, de más fajták és főleg keverék kutyák is használatosak. A kutya húsevő, a kereskedelmi kutyatápok megfelelőek a táplálásukhoz. Átlagos élettartamuk 8-12 év. Az ivarérettséget 7-10 hónapos korban érik el. Általában évente kétszer ivarzanak ("tüzelnek"), az ivari ciklus hossza kb. 1/2 év. A vemhesség átlagos időtartama 63 nap. Az átlagos alomlétszám 5-8 db. A szopósok leválasztása 6-7 hetes korban történik.<sup>30, 33-35</sup>

## **2. A kísérleti állatok elhelyezése és gondozása**

### **2.1. Általános elvek**

Az állatok megfelelő elhelyezése és környezetük megfelelő alakítása nélkülözhetetlen az állatok jóléte érdekében, a megfelelő minőségű, megbízható kísérleti eredményekhez, valamint a személyzet egészségéhez és biztonságához. Az állatok részére elegendő hely kell ahhoz, hogy megforduljanak és a helyzetváltoztatást megtehessék; hozzá kell jutniuk az élelemhez és a vízhez, elegendő tiszta alommal ellátott terület kell a pihenéshez, és terület kell a mozgáshoz is. Alkalmat kell adni az állatoknak, hogy a fajra jellemző viselkedésmintákat gyakorolhassák. Amikor lehetséges, a társas állatokat csoportokban kell elhelyezni és nem egyedileg, feltéve, hogy az elhelyezés nem ellenjavallt a kérdéses protokoll szempontjából és nem teszi ki az állatokat szükségtelen veszélynek. Erősen szocializált és domesztikált állatoknak előnyös a pozitív emberi kapcsolat.

### **2.2. Fizikai létesítmények (állatházak típusai, berendezései)**

Az állatok mikrokörnyezete az őket közvetlenül körülvevő fizikai környezet, az *elsődleges* tartási tér a maga sajátos környezeti tényezőivel. A makrokörnyezet a *másodlagos* tartási tér (állattartó terem, ól, stb.) fizikai környezete.

#### **2.2.1. Az állattartó létesítmények alapvető típusai**

Alapvetően tenyésztő és kísérleti (felhasználói) létesítmények az alábbiak lehetnek.

- Ketrec: rögzített vagy mozgatható konténer, melyet tömör falak vesznek körül és legalább az egyik oldalán rácsos vagy dróthálóval fedett, melyben egy vagy több állatot tartanak, vagy szállítanak. A tenyészet sűrűségének és a konténer méreteinek függvényében az állatok mozgása viszonylag korlátozott.

- **Ól:** falakkal, ráccsal vagy dróthálóval körülzárt terület, ahol egy, vagy több állatot tartanak. A terület mérete és az állomány sűrűség függvényében az állatnak általában több mozgástere van, mint a ketrecben. Kifutó: fallal, ráccsal, kerítéssel vagy dróthálóval körülzárt terület, általában kőépületen kívül helyezkedik el, melyben a ketrecben vagy ólban tartott állat időnként, etológiai vagy élettani szükségleteinek megfelelően, szabadon mozoghat. Állattartó terem: épületen belüli helyiség, ahol az állatokat ketrecekben vagy ólakban helyezik el tenyésztés, pároztatás vagy egy kísérlet lefolytatása céljából. A tartó helyiségek többségét általában rágsálók elhelyezésére tervezik. Gyakran nagyobb fajok elhelyezésére is használják. Vigyázni kell azonban, hogy összeférhetetlen fajokat ne helyezzenek el együtt. A helyiségek falainak és padozatának simának, könnyen moshatónak és fertőtleníthetőnek, a padozatnak csúszásmentesnek kell lennie. Ezen helyiségekben szennyvízelvezető csatornák is kívánatosak, melyek levezetéseit le kell fedni. Minden intézkedést meg kell tenni a helyiségek rendszeres és hatékony tisztítása és a kielégítő higiénés színvonal folyamatos fenntartása érdekében. A tartó helyiségeket olyan berendezésekkel kell ellátni, hogy szükség esetén kisebb beavatkozások itt is elvégezhetőek legyenek. Kiszolgáló helyiségek a takarmány, a tiszta eszköz és az alomanyag tároló helyiség és a tisztító-fertőtlenítő helyiség. Az alomtároló helyiségnek száraznak, rágsáló- és rovarmentesnek, a takarmány (állateledel) raktárnak ezen kívül még hűvösnek is kell lennie. Raktárhelyiséget kell berendezni a tiszta ketrecek és egyéb állattartási eszközök tárolására. A mosó és fertőtlenítő helyiséget megfelelő nagyságúra kell méretezni a szükséges berendezések elhelyezésére. A tisztítási folyamatot úgy kell megszervezni, hogy a tiszta és szennyezett eszközök teljesen külön legyenek, és így megakadályozzuk a frissen tisztítottak fertőződését.<sup>30, 31, 34</sup>

## **2.2.2. A leggyakrabban használt fajok elhelyezése**

### **2.2.2.1. Egér, patkány, tengerimalac, vadászgörény**

A tartásuk általában különböző méretű műanyag ketrecekben (dobozokban), rács tetővel, általában faforgács alommal történik. Jól szaporíthatók háremben is. A tengerimalacok, görények társas állatok, jól tarthatók csoportosan vagy párban, akár alacsony falakkal elválasztott ólakban (beton "kutricákban"), almozva. Inger-gazdag környezetet igényelnek, főleg a vadászgörények, a tengerimalacoknak szükséges egy menedékhely biztosítása is, ahol biztonságosan elbújhatnak.

### **2.2.2.2. Nyúl**

A nyulak tömegesen tarthatók battériás megoldással, automata itatókkal, de a leggyakoribb az egyedi ketrecekben, tömör vagy dróthálós padozattal történő tartás. Komfortosabb elhelyezés az almozott ólakban, kifutóval összekapcsolt csoportos elhelyezés.

### **2.2.2.3. Macska**

A macskák egyedi ketrecekben, vagy csoportos kennelekben, ketrecekben tarthatók. A csoportos tartásban az elfogadható elhelyezés legfontosabb kritériuma a megfelelő számú búvóhely és a menekülési lehetőség biztosítása az állatok számára. A macskalakba alom (ürülék) tálcát, a pihenéshez tágas polcokat, a mászáshoz megfelelő tárgyakat és körömkoptatási alkalmatosságot kell elhelyezni. A zárt helyiségekben sok, nem nyitható ablak legyen: a látvány, a fény (és más sugárzó hőforrások is) nyugtatja az állatot.

### **2.2.2.4. Kutya, törpesertés**

Elhelyezésükre a lehetőségek széles köre áll rendelkezésre: belső- vagy külső szálláshelyeken (ólakban, termekben) szabad közlekedéssel a kifutóba, illetve teljesen zárt környezetben, néhány komplexitást biztosító lehetőség beépítésével, esetleg egyedi

ketrecekben a kísérletek idejére. A kutyáknak alkalmat kell adni az aktivitásra (mozgásra) arra, hogy bejuthassanak a kifutóba vagy átmenjek egy másik területre (nagyobb ketrecre vagy külső ólba, kennelbe), amely nagyobb méretű helyet biztosít a mozgáshoz.

#### **2.2.2.5. Majmok (nem emberszabású főemlősök)**

Szociális állatok, ha hosszabb időre megfosztják őket a társaságtól, akkor a depresszió és frusztráció félreérthetetlen jeleit mutatják (mint a kutyák, sertések). Élettanilag és anatómiailag egy komplex, dinamikus környezetben való életre alkalmasak. Párban történő elhelyezésük megfelelőbb a csoportos elhelyezésnél.

Emelt pihenőfelületek és magasabban lévő polcok a macskák mellett gyakran kívánatosak kutyák és a nem-emberszabású főemlősök (majmok) részére is. A macskák, kutyák, sertések ketrecben történő elhelyezése szigorúan korlátozott. Az így elhelyezett állatokat naponta legalább egyszer ki kell engedni mozgásra (kifutó), ha ez nem ellenkezik a kísérlet céljaival. Rácsos padlózatot csak akkor lehet alkalmazni, ha az a kísérlet céljaira szükséges.

### **2.3. Etető és itató berendezések**

- Egér, patkány: etetőkosár és itatópalackok szopókával,
- Tengerimalac, nyúl: utántöltős önetető és itatópalackok szopókával,
- Kutya, macska, sertés: rögzített vagy súlyos tálak, tálcák.<sup>30-35</sup>

## **3. Az állatok ellátása és gondozása**

A létesítményért felelős személynek biztosítani kell az állatok rendszeres ellenőrzését, az elhelyezés felügyeletét, és az állatorvos, vagy más illetékes személy részéről történő gondoskodást.

### **3.1. Takarmány, ivóvíz, alom**

Ma már szinte minden faj táplálása egységes (standard) takarmány-keverékkel történik, melyet ún. *pellet* (dugó) formába préselnek. A takarmány csomagolásának, szállításának és raktározásának is meg kell felelni azon követelményeknek, melyek megakadályozzák szennyeződését, megromlását vagy megsemmisülését. A takarmány fő hibái a csíraszám emelkedés, avasodás és gombatoxinok jelenléte. A takarmány szétosztásának módja nagymértékben függ a fajoktól, de mindenképpen olyannak kell lennie, amit az illető faj élettani szükséglete megkíván (rágcsálóknak általában „*ad libitum*”, húsevőknek, sertésnek adagolva). Az etetőket úgy kell kialakítani és elhelyezni, hogy a táplálékhoz való könnyű hozzáfutást minden állat számára lehetővé tegye, és minimális legyen a széklettel és ivóvízzel történő szennyeződés.

Általánosságban az állatoknak hozzá kell férniük szennyeződésmentes, tiszta ivóvízhez, az egyedi igényeiknek megfelelően. Az általánosan használt itatási módszerek: palackok, edények, automata itató rendszerek. Itatópalackok leggyakrabban kisebb állatok (rágcsálók, nyúl), edények, vályúk általában nagyobb állatok (kutya, macska, sertés) esetén használatosak. A palackoknak átlátszó anyagból kell készülniük, hogy figyelni lehessen tartalmukat. A palackokat és az egyéb alkatrészeket szétszerelve, megfelelő időszakonként, rendszeresen tisztítani és sterilizálni kell. Jobb a vizes palackokat alkalmanként lecserélni, mint újratölteni, a mikrobiológiai átfertőződés elkerülése miatt.

Az alomanyag legyen száraz, nedvszívó, nem poros, nem mérgező, fertőző mikroorganizmusoktól, parazitáktól, férgekől és más szennyeződésektől mentes. Leginkább a nem gyantás fából készült puhafa gyaluforgács alkalmas és használatos. Különös gondossággal kell elkerülni a fűrészpor (poros forgács) vagy a kémiai anyaggal kezelt fából

készült forgács alkalmazását. Olyan mennyiségű alomanyagot kell használni, amely elégséges az állatok szárazon tartásához a doboz (ketrec) cserék közötti időben.

A létesítmény színvonala nagymértéken függ a higiéniai körülményektől, vagyis egy adott napirend alapján végzett, megfelelő gyakoriságú alomcserétől, takarítástól és fertőtlenítéstől. Az állatházak minden részlegét, beleértve a kiszolgáló területeket is, rendszeresen takarítani, fertőtleníteni kell. A tisztítás eltávolítja a por és a szennyeződések nagy részét, a fertőtlenítés lecsökkenti a mikroorganizmusok elfogadhatatlan mennyiségét.

A kísérlet folyamán az állat teljesítményét nagymértékben befolyásolja, hogy mennyire bízik az emberben és ezt a bizalmat fejleszteni kell. Ajánlatos ezért a gyakori kapcsolattartás, hogy az állat megszokja az ember jelenlétét és tevékenységét (adaptálás/adaptálódás). Az alkalmazottaknak kedvesnek, gyöngédnek és határozottnak kell lenniük az állatokkal való kapcsolat során.<sup>30-35</sup>

#### **4. A fizikai környezet legfontosabb tényezői**

##### **4.1. Hőmérséklet**

A termék hőmérsékletét folyamatosan mérni kell. Az ajánlott (optimális) hőmérsékletek:

- Egér, patkány, tengerimalac, törpesertés, majom részére: 20–24°C
- Kutya, macska, nyúl, vadászgörény: 15–21°C.

Újszülött és fiatal állatok, vagy altatásból ébredő állatok esetében magasabb hőmérséklet szükséges.

##### **4.2. Páratartalom (nedvesség)**

A tartó helyiségekben a relatív páratartalom (RH) normálértéke 55±10%. Feltétlenül kerülendő a 40% alatti és a 70% feletti értékek huzamosabb fenntartása.

##### **4.3. Levegőminőség, szellőzés**

A szellőzés célja a friss levegő (oxigén) biztosítása, a szagok, káros gázok (pl. ammónia), por, valamint a fertőző anyagok szintjének minimális szinten való tartása (pl. szűrt levegő, nyomás különbség a helyiségek között, stb.). A rendszer csökkenti az állatok légcseréjéből, a világítás és egyéb berendezések működéséből eredő túlzott meleget és nedvességet is. A helyiség levegőjét rendszeresen cserélni kell. Óránként 15–20-szor történő levegőcsere az optimális arány. A már használt, visszaforgatott levegő alkalmazása a szellőztetésre kerülendő. A szellőztető levegőt télen fűteni, nyáron hűteni szükséges. A gyakori alomcserék és ketrectakarítás, a zsúfoltság elkerülése, az optimálisan tartott hőmérséklet és páratartalom is csökkenti a toxikus vagy bűzös gázok mennyiségét a termék levegőjében. A szellőztető rendszert úgy kell tervezni, hogy ne okozzon káros huzatot.<sup>30-35</sup>

#### **5. A mikrobiológiai környezet (egészség, fertőzőtség, betegség)**

##### **5.1. A mikroorganizmusok, fertőzések szerepe és jelentősége (mikrobiológiai és járványtani alapfogalmak)**

Az állatokat érintő kórokok lehetnek öröklődő rendellenességek, élettelen (fizikai-kémiai) tényezők, vagy élő (egy- vagy többsejtű) élőlények. A potenciális kórokozók lehetnek baktériumok, vírusok, gombák, élősködők. A fertőzés során egy mikroorganizmus vagy parazita társult viszonyba kerül az állati szervezettel, függetlenül attól, hogy okoz-e betegséget vagy nem (tehát a fertőzőtség nem egyenlő a betegséggel!). A megbetegedést okozó mikroorganizmusok lehetnek feltétlen (*obligát*), vagy esetleges (*fakultatív*) kórokozók.

A fertőzés, betegség kialakulása függ még a kórokozók faj és fajtaspecifikusságától, illetve fogékony szervezet jelenlététől. Tünetmentes (*latens*) fertőzőtség (szubklinikai betegség) esetén a kórokozó jelen van a szervezetben, de nem mutatható ki, illetve nem okoz klinikai tüneteket, ugyanakkor fertőzésveszélyt jelent. A kórokozó behatolásának pillanatától

valamennyi idő eltelik, amíg a mikroba elszaporodik (lappangási idő), majd további idő kell a tünetek megjelenéséhez (vagy egyéb történéshez, pl. ellenanyag képződéshez). A tünetekben megnyilvánuló betegség kimenetele sok tényezőtől függ, ezek alapján lehet nem végzetes, vagy elhullást okozó.

A kísérleti állatok fertőződésének forrása lehet a nem laboratóriumi célra tenyésztett, vagy más tenyészetből behozott állatok; otthoni kedvenc állatok; biológiai anyagok; egyéb anyagok és berendezések (pl. alom!); a személyzet (kutató és a látogató - a legnagyobb mikrobiológiai veszély maga az ember!) Az intézmény jó szervezési, működési gyakorlata és az állandó ellenőrzés fontos a nem kívánt organizmusok bejutásának megakadályozására.<sup>30</sup>

A karantén (az olasz *"quaranta giorni"*, 40 nap kifejezésből) a más helyről származó állatok állományba történő betelepítés előtti elkülönített tartására, megfigyelésére szolgál. Célja a fertőzések távoltartása. A karantén időtartamának elegendőnek kell lenni, hogy az éppen lappangási időben lévő betegségek tünetei kifejlődhessenek. A karantén és stabilizáció időszakában néhányat vagy mindet meg kell valósítani az következők közül: diagnózis, ellenőrző vizsgálatok, a betegségek megelőzése és kezelése; az élettani és táplálkozási stabilizálás; a kültakaró ellenőrzése a külső élősködők miatt (több zoonózis terjesztésében szerepelnek). Időtartama a lappangási idő és az állategészségügyi előírások alapján kerül meghatározásra. Más esetekben változhat, és a körülményeknek megfelelően egy illetékes személy, általában az intézmény állatorvosa határozza meg. Még ha az állatok kitűnő egészségi állapotban vannak, vagy magasabb higiéniai kategóriájúak is, a szállítás és fogadás után akkor jó az ellátásuk, ha egy akklimatizálódási időszakon (élettani, pszichés és táplálkozási stabilizáció) esnek át, mielőtt kísérleti felhasználásra kerülnének.

## **5.2. A fertőzőtség hatása a kísérleti eredményekre**

Sok mikroorganizmus (még a rejtett, latens kórokozók, illetve a szubklinikai betegségek esetén is) befolyásolhatja az élettani paramétereket és ennek következtében az állatkísérleti eredményeket. Az nyilvánvaló, hogy a beteg állatokból nyert kísérleti adatok csak maximális fenntartással használhatók, ha egyáltalán használhatók. A nem kívánatos kórokozóktól mentes laboratóriumi állatok használata fontos előfeltétele a megbízható és megismételhető eredmények elérésének, minimális állatlétszám felhasználásával, ami egyben lényeges hozzájárulás az állatjóléti célokhoz is.

## **5.3. A kísérleti állatok mikrobiológiai (higiéniai) minősége és besorolása**

A nem kívánatos kórokozók jelenléte és egy populációnak egy specifikus kísérletre való alkalmassága csak a kísérletezés előtti és alatti átfogó egészség monitorozás által határozható meg. Az állatok minősége leginkább a mikrobiológiai (higiéniai) állapotuk és azon tartási rendszer alapján jellemezhető, amely biztosítja a specifikus mikrobiológiai státusz fenntartását.

Mikrobiológiai szempontból a következő tartási rendszerek különböztethetők meg (*higiéniai szintek*): Izolátorban tartott: az állatok sterilizált kamrában tartottak, steril levegővel történő szellőztetéssel, sterilizált anyagok megfelelő bejuttatásával, egy sor beépített kesztyűvel. Barrier (zsilip) mögött tartott: az állatokat egy célzottan kialakított, zsilipek mögötti térben (helyiségben) tartják és szaporítják. Ezeknél az egységeknél az alkalmazottak egy sor zsilipen át (öltözők), zuhanyozást követően, steril ruházatba öltözve juthatnak be. Minden eszköz, anyag, ami bejut, és a szellőztető levegő is sterilizált vagy fertőtlenített. Barrier mögötti tartás megvalósítható ketrec vagy állvány szinten is, sterilizálható vagy más módon fertőtleníthető eszközök használatával. Konvencionálisan (hagyományosan) tartott: az állatokat olyan területen (helyiségben) tartják, ahol nincs semmilyen speciális gát a kórokozók bejutása ellen. Ez a tartásmód nem biztosítja a mikrobiológiai állapot stabilitását, mert nem kívánt organizmusok bármikor bejuthatnak. Mikroizolációs ketrecek általában használatosak hogy megvédjék az állatokat az egyébként konvencionális termekben.

Számos besorolás (klasszifikáció) került kidolgozásra a laboratóriumi állatok mikrobiológiai minőségének meghatározására. A legfontosabb *higiéniai kategóriák* a következők:

- GF (*germ free*, mikrobamentes, csíramentes). Császármetszéssel vagy embrió transzferrel nyert állatok, melyeket izolátorban nevelnek fel és tartanak aszeptikus technikákkal.
- SPF (*specified pathogen free*, meghatározott kórokozóktól mentes). Az állatokban semmilyen bizonyítéka nincs (általában szerológiai, kórszövettani vagy tenyésztési vizsgálatokkal) meghatározott kórokozók jelenlétének. Egy állat akkor sorolható az SPF kategóriába, ha egy vagy sok patogén mikroorganizmustól mentes. A kereskedelmi forgalmazók (előállítók, tenyésztők) különböző értelmezéseket alkottak az SPF státusz kifejezésére, ami tehát így nem egységes, nem egyértelmű. Minden meghatározás alapja az adott állatokban rendszeresen vizsgált és ez alapján nem kimutatható kórokozók sora.
- VAF (*virus antibody free*; vírus ellenanyagtól mentes). Meghatározott rágcső vírusok ellenanyagaitól mentes állatok (rágcső). Ezek az állatok a meghatározottakon kívüli vírusoktól és más mikroorganizmusoktól valószínűleg nem mentesek.
- MD (*minimal disease*; kevés betegséggel terhelt). Az állatokat alacsony biztonsági szintű zsilip mögött tartják és néhány patogéntől mentesnek nyilvánítják. A kifejezés használata óvatosságot igényel, jelentésének pontatlansága miatt.
- Konvencionális (hagyományos). Ezekben az állatokban a kórokozó terheltség ismeretlen, ellenőrizetlen, vagy mindkettő.

#### 5.4. Tünetek, diagnózis, a beteg állat sorsa

A betegségeket kezdetben csak általános tünetek jelzik. Értékelhető tünetek jelentkezésekor sokszor már késő az állomány megóvása. A klinikai vizsgálat több fajnál (pl. rágcső) nehézkes. Általános tennivalók:

- a betegnek tűnő állat azonnali elkülönítése (SPF állományban az állományból is el kell távolítani; itt a deklaráltan elő nem forduló kórokozó kimutatása is már „betegség”!);
- a környezet fertőtlenítése;
- a betegnek tűnő (beteg) állat és néhány társa azonnali vizsgálatra küldése (SPF), konvencionális állatházban az elkülönített betegek gyógykezelése, megsemmisítése, esetleg állomány szintű kezelés (vizsgálatra küldés itt is hasznos lehet).

**5.5. Zoonózisok** Állatról emberre, illetve viszont terjedő fertőzések. A kutatásban, oktatásban, vagy tesztelésben használt állatokhoz kapcsolódó lehetséges potenciális zoonózisok listája elég hosszú, mégis a valóságban a veszély nagyon kicsi, amikor a laboratóriumi kisállatokkal foglalkozunk. Ennek több oka van. Először is a kereskedelmi laborállat forgalmazók (tenyésztők) remek munkát végeznek a betegség mentes állatok előállítása terén. Ugyanígy a felhasználó intézetek általában jó foglalkozás egészségügyi és biztonsági programokat alkottak, melyek hatékony állatorvosi szűrő és kezelési elemeket tartalmaznak. A fertőződés veszélye nagyobb azoknál, akik nem laboratóriumi célra tenyésztett állatokkal (kutya, macska, gazdasági állatok) vagy vadállatokkal végeznek kísérleteket. A nem emberi főemlősökkel történő munka egy speciális eset, mert sok zoonóziát okozó mikroorganizmust hordozhatnak. Minden ismeretlen helyről származó laborállatot, vagy amelyet nem fertőzés mentesítettek, zoonóziát okozó mikrobák forrásának kell tekinteni!<sup>30-32</sup>

#### 6. Szociális környezet és egyéb környezeti tényezők

A szociális környezet általában magába foglalja az ugyanazon faj egyedei (fajtársak) közötti fizikai érintkezést és kommunikációt, de jelenti az egyedek közötti, érintkezés nélküli kapcsolatot is vizuális, hang, és szagjelek útján.



## 6.1. Területigény, csoportméret

A területigényt a szabályozások kiemelten kezelik, ezekben részletesen meghatározásra került a minimális területigény és ketrecméret. A szociális állatokat párokban vagy csoportokban kell elhelyezni és nem egyedileg, ha az nem jelent szükségtelen kockázatot az állatokra nézve, ha megvalósítható és összeegyeztethető a protokollal. A csoportban tartott állatok helyigénye függ az egyedi alapterület igénytől, a viselkedéstől, az állatok összeférhetőségétől, az állatok számától és a tartási céloktól.

## 6.2. Egyéb tényezők

Figyelembe kell venni a fajok közötti és fajon belüli hatásokat (hang, szag és mikrobiológiai hatások), a „szagtér”, „hangtér”, „mikrobatér” megfelelő elkülönítése miatt minden fajt külön helyiségben kell elhelyezni (pl. zajos állatokat, mint a kutya, sertés, majmok, távolabb kell tartani a csendesebb állatoktól, mint pl. rágcsálók vagy macska). Fontos tényezők a fény és színhatások és a biológiai ritmus.<sup>30-32</sup>

## 7. Az állatok szállítása, fogadása

Az állatokat mindig törvényesen kell beszerezni. A direkt kísérleti célra tenyésztett állatok beszerzése a kívánatos, ami a leggyakrabban használt emlős fajok esetében a jogszabályok szerint is kötelező. Rendszerint az ilyen állatok előállítói (forgalmazói) rendszeresen tájékoztatást adnak (deklarálják) az állományaik vagy egyedi állataik genetikai és mikrobiológiai státuszáról.

A szállítás olyan stressz, amely félelemből, zajból, hőmérsékletváltozásból, táplálék- és ivóvízmegvonásból stb. tevődhet össze, aminek következtében súlyos eltérések mutatkoznak az élettani mutatókban. Az eltérések normalizálódásához rágcsálóknak legalább két hétre, fejlettebb idegrendszerű állatoknak (pl. majom) legalább két hónapra van szükségük! Ezen időszak lerövidülését szolgálják a szállítás megtervezése, a klimatizált állatszállító járművek, és az új helyen hasonló környezeti feltételek létrehozása. Minden állat számára ajánlatos egy hétig terjedő akklimatizációs időszakot biztosítani. A szállító feladata annak ellenőrzése, hogy a szállítandó állat jó egészségben van-e. Nem szállíthatók olyan vemhes állatok amelyek várhatóan a szállítás közben szülnek. A feladónak és a szállítónak minden óvintézkedést meg kell tennie a csomagolásnál, berakodásnál és a szállítás során, hogy a nem megfelelő szellőzés, szélsőséges hőmérséklet, étel vagy ital hiánya, a hosszú állásidő ne okozzon szenvedést az állatnak. Az állatküldeményeket azonnal át kell venni és haladéktalanul kicsomagolni. Átvizsgálás után az állatokat azonnal tiszta ketrecekben (ólakban) kell elhelyezni és étellel, itallal ellátni. Minden állat számára ajánlatos minimum egy hétig terjedő akklimatizációs időszakot biztosítani, még akkor is, ha hosszabb karanténost nem igényel.<sup>30-32</sup>

## 8. A laboratóriumi állatok tenyésztésének fő irányai

### 8.1. Genetikailag definiált állományok - beltenyésztett (*inbred*) törzsek

A folyamatos rokon pároztatások miatt az egyedek gyakorlatilag genetikailag egyformának tekinthetők. Az ilyen egyedeket speciális igényű kutatásban (szerv- és daganat átültetés, immunológia, stb.) használják. A természetellenes tenyésztési törekvésnek negatív hatásai lehetnek a szaporaságban, életerőben, ami gyakran a törzsek leromlásához vezet. Speciális beltenyésztett állományok pl. a transzgén állatok.

### Genetikailag nem definiált - kültenyésztett (*outbred*) állományok

A rokontenyésztés tudatos elkerülése a cél. Általában szaporák, így olcsóbbak. Elméletileg csak olyan vizsgálatokban lennének használhatók, ahol a genetikai jellegnek nincs hatása az eredményekre, de a gyakorlatban sokkal szélesebb körben használják ezeket!<sup>30-32</sup>

#### IV. A fájdalom és a fájdalom csökkentése az állatkísérletekben (Dr. Gaál Balázs)

A fájdalom és a gyötrelem (*distress*) egyfajta biológiai alkalmazkodás részei a természetben. Mérésük nehéz, inkább csak a normálistól eltérő viselkedésmintákból következtethetünk rájuk. A gyötrelem (*distress*) elzárkózó állapot, melyben az állat képtelen teljesen alkalmazkodni a káros ingerekhez és az általuk okozott stresszhez. A fájdalom egy kellemetlen érzékelés és emocionális élmény, kapcsolódva egy lehetséges vagy tényleges szövethárosodáshoz.

Az elhúzódó fájdalom (betegség, sérülések, sebészeti beavatkozások nyomán) és a diszkomfort gyakori okai a gyötrelemnek, aminek a következménye aggodalom és depresszió (passzivitás, apátia) lehet.

A fájdalom felismerése és kezelése igen fontos. A fájdalomnak többféle negatív következménye van (stressz válasz), mert számos élettani funkció is zavart szenved. Ilyen pl. a késedelmes sebgyógyulás, szervfunkciók késői helyreállása, immunműködés csökkenése, amitől torzulnak a kísérleti adatok. Az állatjóléti szabályozásoknak is kulcskérdése, hogy az állatok fájdalma minimális legyen, amikor csak lehetséges: *”minden kísérletet úgy kell megtervezni, hogy a kísérleti állatot megkíméljük a szükségtelen fájdalomtól, szenvedéstől, gyötrelemtől”*. Tehát a fájdalmat, szenvedést mind erkölcsi, mind tudományos okokból minimálisra kell csökkenteni!<sup>30, 36, 37</sup>

##### 1. A fájdalom felismerése

Bizonyított, hogy az állatok ténylegesen érzik a fájdalmat, akár nagyon fiatal korban is. A legfőbb különbség az állatok és az ember között, hogy az emberek verbálisan be tudnak számolni a kellemetlen érzékelési és érzelmi élményeikről. Ellenkező bizonyítékok hiányában valószínűsíthető, hogy ami fájdalmas az embernek, az fájdalmas lesz az állatnak is. A fájdalom mennyiségileg is meghatározható, objektív tünetei (főleg heveny fájdalom esetén):

- pupillatágulat,
- pulzus- és légzés szám emelkedés,
- vizelet- és bélsárürítés,
- hirtelen hangadás.

Legtöbbször azonban (főleg elhúzódó fájdalom esetén) az állatok viselkedése változik meg, melynek felismerése és mérése nehéz. Ráadásul egyes fajokban a viselkedésminták eltérőek. Ilyen magatartásminták lehetnek pl. az alábbiak:

- pszichomotoros nyugtalanság, agresszivitás, védekezés,
- visszahúzódás, nyugodt hely keresése,
- a mozgás jellegének megváltozása (púposított hát, lassú járás),
- elnyomott testhelyzet felvétele,
- étvágytalanság, fogyás
- apátia, a testápolás hiánya
- hanghatások.

A heveny és a krónikus fájdalomra esetleg eltérő tünetek is utalhatnak.<sup>30, 31, 32, 36, 37</sup>

##### 2. Fájdalom-mentesítés

A lehetséges megvalósítások az alábbiak lehetnek:

- Érzéstelenítés (*anaesthesia*): a fájdalom érzékelésének, tudatosulásának kikapcsolása;
  - Fájdalomcsillapítás (*analgesia*): a fájdalomérzet elnyomása, korlátozása, csökkentése.
- Az állatjóléti szabályozások szerint *”valamennyi kísérletet helyi vagy általános érzéstelenítésben kell elvégezni, kivéve:*
- *ha az érzéstelenítés nagyobb traumát okoz az állatnak, mint maga a kísérlet;*

- *ha az érzéstelenítés nem egyeztethető össze a kísérlet céljával (pl. az eredmények torzulása várható ettől; fájdalomkutatás);*

*Ha az érzéstelenítés nem lehetséges, fájdalomcsillapítókat vagy megfelelő más módszert kell használni, hogy lehetőség szerint korlátozzuk a fájdalmat; és amennyiben az ilyen módszer a kísérlet céljával összeegyeztethető, de az állatnak az érzéstelenítő hatásának elmúltával várhatóan erős fájdalmai lesznek, időben megfelelő fájdalomcsillapítókat kell adni”.<sup>40</sup>*

## **2.1. Az érzéstelenítés (anaesthesia) módszerei**

### **2.1.1. Helyi érzéstelenítés**

Ha a test körülírt, meghatározott területén átmeneti érzéstelenséget hozunk létre úgy, hogy közben az öntudat megmarad. Formái a felületes-, vezetési és beszűrési helyi érzéstelenítés.

### **2.1.2. Általános érzéstelenítés (altatás)**

Minden olyan módszer, amikor a fájdalomérzet kikapcsolása öntudatvesztéssel jár. Formái:

- inhalációs altatás: altatógázok alkalmazásával. Gyakran az általános érzéstelenítés bevezetése (indukciója) injekciós altatószerrel történik, és annak fenntartását végzik altatógázzal.
- injekciós altatás: az injekciós altatószerek összetételüktől függően különböző módon adagolhatóak. Leggyakoribb a laboratóriumi állatokon az izomba, a vénába és a hasüregbe történő beadásuk.

Az altatás gyógyszeres előkészítése (*premedicatio*) célja a nyugtatás, az altatószer adagjának csökkentése, az ébredési idő csökkentése, fájdalomcsillapítás. Az altatás (megfelelő) mélységének megítélésére használható (vizsgálható) reflexek:

- pupillareakció (fényre reagálás)
- szemhéjreflex (szemhéj megérintésére pislogás)
- megfordulási reflex (hasra akar fordulni, ha hátára fektetjük)
- fülkagyló reflex (fülcspésre fejrázás: nyúl, tengerimalac!)

A mélység megítélésére a fájdalom objektív tüneteinek bírálata is alkalmas (ld. fentebb).

### **2.1.3. Az altatás előkészítése; az altatás alatti és utáni teendők legfontosabb elemei**

- A macska, kutya, sertés és a majom a narkózis bevezetése közben könnyen hány bizonyos szerek adásakor – altatás előtt kb. 12 óráig koplaltatni kell őket. Kisebb állatok esetében 2 órás koplaltatás elegendő, rágsálóknál pedig nem is szükséges. A hányás okozta félrenyelés elkerülésére és a szabad légutak biztosítására egyébként is tanácsos légsőttubus alkalmazása (*intubálás*), injekciós altatásnál is.
- Altatás közben a testhőmérséklet gyorsan csökken, kis testűeknél hamarabb. Ez az élettani folyamatok csökkent működéséhez, elhúzódó ébredéshez vezet. Elkerülésére fűtőlap, melegítőpárna (paplan), meleg vizes palackok használata szükséges.
- Altatás alatt az állat gondos és folyamatos monitorozása (életjelenségek, reflexek vizsgálata) fontos, melynek célja a folyamatos információ nyerése az aktuális állapotról, így segítségükkel az altatást irányíthatjuk, az eltéréseket korrigálhatjuk, a komplikációkat elháríthatjuk. A fizikális és/vagy műszeres úton vizsgálendő legfontosabb élettani paraméterek (életjelenségek): nyálkahártyák színe, pulzus szám és szívritmus, kapilláris telődés, légzésszám, légzési ritmus és mélység, testhőmérséklet, artériás vérnyomás, pupilla tágassága, fényre reagálása, izomtónus. Az élettani paramétereket az altatás bevezető szakaszában percenként, a fenntartás során legalább 5 percenként szükséges meghatározni, értékelni. A műszeres vizsgálatokkal egyszerre több életjelenség monitorozása és az altatott állat folyamatos ellenőrzése válik lehetővé.

- A műtét alatti vérveszteség pótlására, a vértérfogat fenntartására és altatás okozta kórosan megváltozott egyensúlyi helyzetek korrigálására az altatás alatt és után infúzió adása szükséges.
- Altatás után az állatot egyedileg, félhomályos, csendes környezetben kell elhelyezni folyamatos felügyelettel az ébredésig. Az ébredés alatt az életjelenségek ellenőrzése, a melegítés folytatása és/vagy a hő veszteség megakadályozása (puha, hőszigetelő anyagra fektetés, melegítőpárna) szükséges. A teljes felébredés azt az állapotot jelenti, amikor az állat képes függőleges helyzetben tartani a testét, visszatér a normál testhőmérséklete és minden élettani mutatója normál határok között van. Inhalációs és rövid idejű altatásnál az ébredés rövidebb, míg injekciós illetve hosszú altatásnál elhúzódóbb.
- Az ébredés után fontos az ivóvíz nyújtása a szokott módon, mert az állatok szomjasak lesznek.<sup>30, 31, 32, 36</sup>

## 2.2. Fájdalomcsillapítás (analgesia)

A fájdalomérzés teljes hiánya csak az általános érzéstelenítés során érhető el – a fájdalomcsillapító szerek alkalmazásával nem; de a fájdalom jelentősen csökkenthető, így hátrányos következményei alig érvényesülnek!

### 2.2.1. A fájdalomcsillapítás alapelvei

A fájdalom megelőzése hatásosabb, mint "gyógyítása" (*preemptív* fájdalomcsillapítás). Az idegrendszer ingerlékenységének fokozódása akkor csökkenthető optimálisan, ha a fájdalomcsillapítókat az ingerhatás előtt, és nem annak kezdete után adjuk. Sokkal jobb hatás érhető el az alkalmazható szerek két- vagy több típusának kombinációjával. Túlélési kísérleteknél fájdalomcsillapító protokollokat kell alkalmazni. Ezek alapja az a tény, hogy egyes érzéstelenítőszerrel rendelkeznek fájdalomcsillapító hatással, többségük azonban nem! Az idegrendszer túlérzékenységi állapota ilyenkor ugyanúgy kialakul, az érzéstelenség ellenére, ami klinikai fájdalomhoz vezethet az ébredés után! Ezért az általános érzéstelenítés előtt meg kell fontolni, hogy milyen fájdalomcsillapító szerekre van szükség (ld. gyógyszeres előkészítés!). Fájdalomcsillapítóként használható gyógyszercsoportok:

- Opioidok;
- Helyi érzéstelenítők;
- Nem-szteroid gyulladáscsökkentők;
- Alfa-2 adrenoceptor agonisták;
- Disszociatív szerek.

Egyes gyógyszercsoportok ezek közül, egymással vagy más általános érzéstelenítő szerekkel kombinálva, az általános érzéstelenség elérésére alkalmasak (ld. gyógyszeres előkészítés!).<sup>30, 31, 32, 36, 37</sup>

## **V. Az invazív beavatkozások alapelvei (Dr. Gaál Balázs)**

### **1. Az állatok kezelése és rögzítése**

A megfelelő kézbevételi és rögzítési technikák csökkentik a stresszt mind az állatokra, mind a kutatóra nézve. A rögzítési stressz a kísérleti eredmények torzulását eredményezheti, és mindig minimalizálni kell, amikor csak lehetséges. Helytelen megfogáskor az állatok sérülést okozhatnak maguknak és az embereknek is. Ha a kísérlet az állatok jelentős rögzítésével jár, ajánlatos őket ehhez hozzászoktatni. A rögzítés alapelve a kíméletesség és a határozottság! A gyógyszeres rögzítés (nyugtatók) megfontolandó minden elhúzódó, vagy fájdalmasnak ígérkező rögzítés esetén.

#### **Egér, patkány**

A fark megfogása a faroktő közelében alkalmas a felemeléshez és áthelyezéshez. Kisebb beavatkozáshoz (pl. injekció beadása) a tarkó és hát laza bőrét egyik kézzel szorosan meg kell ragadni. Patkánynál lehetséges a test átfogása és a hüvelykujjal az áll alatti rögzítés. Mindkét esetben a szabad kézzel – szükség esetén - a hátulsó lábakat rögzíthetjük vagy a hátulsó testfelet alátámaszthatjuk.

#### **Hörcsög**

Mivel megfogható farka nincs, a patkányhoz hasonló módon kézbe vehető a test átfogásával, vagy szorosan meg kell ragadni a laza hátbőrénél fogva.

#### **Tengerimalac**

Egyik kézzel a testét körbefogva felemelhető, míg a másik kézzel a hátulsó lábak (testfél) alá nyúlva a testet alátámasztjuk, illetve rögzítjük.

#### **Nyúl**

Felemeléshez a laza hátbőrt kell megragadni az egyik kézzel, a másikkal pedig a hátsó testfél emelését kell segíteni a hátulsó lábak összefogása után. A nyúl sérülést okozhat erős hátulsó lábainak rúgásával, éles karmaival! Szállításhoz a testet az egyik alkaral alátámasztva testünkhöz szorítva rögzíthetjük, úgy hogy a feje a könyökünk alatt van. Tilos a fülénél fogva felemelni!

#### **Vadászgörény**

Jóindulatú állat a test lapockák környéki átölelésével felemelhető. Harapós vagy túl aktív állat esetén felemeléshez, illetve beavatkozáshoz a tarkóbőr szoros megragadása szükséges.

#### **Macska**

Gyakran elég kooperatívak ahhoz, hogy rögzíthessük egy asztalon, a nyak és csípőtájék laza bőrének összefogásával, vagy a test és a fej átfogásával. A nem agresszív macska szállítható a kutyához hasonlóan a test alá nyúlással, testünkhöz ölelve. Ingerlékeny macskát egy vastag takaróba lehet tekerni, ahonnan szükség esetén a lábai óvatosan előhúzhatók a beavatkozáshoz. Speciális szájkosár (maszk) is használható a harapás megakadályozására; injekció beadásához alkalmazható a betolható falú kezelő ketrec.

#### **Kutya**

A kutya felemelésének módszere a testméretétől függően változik. Alaplépése, hogy az állat nyakbőrét az egyik kézzel megragadjuk, míg másik karunkat a teste köré fonva (átölelve) az alá nyúlunk, úgy hogy ez a kezünk a mellkast támasztja alá. A rögzítés

oldalfekvésben vagy ülő helyzetben történhet injekció beavatkozáshoz vagy kisebb beavatkozáshoz. Agresszív kutyáknál szükség lehet szájkosár használatára vagy a száj bekötésére gézcsíkkal. A kutyákkal való munkához póráz használata ajánlott.

### **Sertés**

A sertések általában barátságosak de rosszul reagálnak a nem szakszerű kezelésre. Kezelésük és rögzítésük sikere nagyban függ a humánus módon végzett beavatkozásoktól. Megközelítéskor meg kell bizonyosodni arról, hogy észleli a jelenlétünket (hangadás!). Ha ijedtségben "nekiindulnak", sérüléseket okozhatnak maguknak és az embernek is. Alaprögzítésük legegyszerűbb módja a táplálék nyújtása. A kisebbek könnyen felemelhetők a testük megfogásával (alányulás), lábaikat lógva hagyva. A nagyobbak a mellső lábak előtt és a has alatt, alá nyúlva emelhetők fel. Mozgatáshoz jól alkalmazható egy kisebb tábla, melyet oldalukhoz nyomva könnyen irányíthatók. Kísérleti rögzítéshez különböző hevederek alkalmazhatók.

### **Majmok (nem emberszabású főemlősök)**

Veszélyesek lehetnek. Gyógyszeres (kémiai) immobilizáció gyakran használatos. Gyakori vérvételhez vagy gyógyszerbeadáshoz rögzítő rendszerek használatosak. Injekció beadáshoz bizalmatlan állat esetében beszorító ketrec vehető igénybe.

A kutyák és majmok, pozitív megerősítéseken keresztül könnyen megtaníthatók, képezhetők, hogy eltűnjék a rutin beavatkozásokat, mint az izomba adott vagy vénás injekció, a vérvétel, a szájon át történő beadás, és legyenek kooperatívak. Az ilyen képzés segít csökkenteni ezen beavatkozások során fellépő stresszt, és nincs szükség erőszakos rögzítésre!<sup>30, 32, 38</sup>

## **2. Anyagok bejuttatásának módjai a szervezetbe**

A különböző anyagok (tabletták, folyadékok, injekciós készítmények, stb.) beadásakor többféle alkalmazási mód közül választhatunk, amely elsősorban az illető anyag természetétől (összetételétől), az állat jellemzőitől és az adagolás céljától függ.

- Enterális adagolás (emésztőcsőbe juttatás): szájon át, gyomorszondán (kanülön), végbélen, vékonybél szondán.
- Parenterális adagolás (az emésztőcső kikerülésével történő bejuttatás): döntően injekciós adagolás bőrbe, bőr alá, izomba, vénába, artériába, hasüregbe, gerinccsatornába, orrüregbe, légcsőbe. A beadásra használható vénák (esetenként más vénák is) alkalmasak vérvételre. A hasüregbe történő adagolás rágszálakon az egyik leggyakrabban használt módszer.
- Különleges eljárások: vértranszfúzió, transzplantáció (pl. embriótranszfer, bőráttűtetés), implantáció.<sup>30, 32</sup>

## **3. Az invazív beavatkozások (injekciózás, vérvétel, műtétek) alapvető követelményei**

### **1. Fájdalommentesség**

Ha a fájdalom elkerülhető, akkor a fájdalommentesség egyben kötelesség! A fájdalomkórást nem lehet az állatnak megmagyarázni. Aggodalom, veszélyérzet, szenvedés kíséri az invazív beavatkozásokat, ezért a jutalmazás, dicséret fontos minden rendszeresen ismételt beavatkozás után (ld. korábban is!)

### **2. Az aszepszis betartása**

Kötelező – egyrészt azért, hogy a vizsgálati minták ne fertőzödjének, és azért is, hogy az állat ne fertőződjön (még akkor is, ha a beavatkozást követően esetleg életét veszti). Alapvető elemei:

- Az állat tömegét még az anyagok beadása vagy altatás előtt meg kell mérni.
- A használt műszereket sterilizálni kell (hő, gáz, vagy "hideg" sterilizálás).
- Kézfertőtlenítés szükséges; műtétek előtt sebészi bemosakodás és az általános sebészeti gyakorlatnak megfelelő beöltözés (köpeny, sapka, maszk, kesztyű).
- A műtéti (behatolási) terület előkészítése: tisztítás után borotválás, de legalább szőrnírási, majd a terület fertőtlenítése. A műtéti területet steril kendőkkel vagy műanyag fóliával izolálni kell (részletesen ld. a műtéttani gyakorlatban).

#### **4. Műtéti beavatkozások utáni (posztoperatív) tennivalók**

- A sebek védelme műanyag gallérral és/vagy kötéssel (esetleg más módon).
- A sebek ellenőrzését és kezelését (fertőtlenítés, kötéscsere) naponta el kell végezni.
- Az alapvető biológiai funkciókat (étvágy, vizelet- és székletürítés) rendszeresen, naponta ellenőrizni kell, mert ezek az általános állapot indikátorai.
- A varratszedés a 10-14. napon történhet.
- A fájdalmakat a beavatkozás után is csökkenteni kell (fájdalomcsillapítókkal).<sup>30, 31, 32</sup>

## VI. Euthanasia, a kísérleti állatok kíméletes elpusztítása (Dr. Gaál Balázs)

A kísérleti állatok szenvedésmentes elpusztítását el *kell* végezni a törvények által előírt esetekben; és el *lehet* végezni szervek, szövetek nyérése érdekében, vagy a kísérlet által okozott morfológiai elváltozások megismerése céljából. A jogszabályi rendelkezések állatjóléti okokból a kísérleti állatok sorsával kapcsolatba úgy rendelkeznek, hogy „*a kísérlet végén el kell dönteni, hogy életben tartható-e az állat, vagy pedig valamilye humánus módszerrel el kell pusztítani, attól függően, hogy az egészségét vissza tudja ugyan minden egyéb tekintetben állítani, de életét nagy valószínűséggel tartós fájdalom vagy gyötrellem közepette tudja csak leélni*”.<sup>40</sup>

### 1. Alapvető követelmények

- A halálnak szenvedésmentesen (humánusan) kell bekövetkeznie;
- Megbízható, hatásos, gazdaságos, könnyen kivitelezhető legyen;
- Lehetőleg kézikontaktusban, bódított állapotban (ha a vizsgálatot, kísérletet nem zavarja) kell elvégezni, azért, hogy az aggodás minimális legyen;
- Az euthanasiát mindig a többi állattól elkülönített helyiségben, elszigetelten kell végrehajtani (a látvány, hang- és szaghatások az élettani paraméterek változását, torzulását eredményezhetik!).

### 2. Alapvető módszerek

#### 2.1. Farmako–kémiai eljárások

- általános érzéstelenítő szerek túladagolása (főleg pentobarbital)
- belélegeztetés (altatógázok vagy CO<sub>2</sub>) Általános érzéstelenítő szerek és altatógázok használata megfelelő a legtöbb faj (sertés, kutya, macska, rágcsálók, nyúl, madarak és majmok) esetén. A szén-dioxid belélegeztetés elvileg bármely faj részére alkalmas módszer, de a gyakorlatban az 500g alatti rágcsálókra és emlősökre korlátozódik a használata.

#### 2.2. Mechanikai – fizikai módszerek

- lefejezés (dekapitálás) – kisebb állatokon ollóval, nyaktilóval
- nyakcsigolya kiízesítés (diszlokáció) – rágcsálók, kutya és macskakölykök (gyors és gyakorlott végrehajtása fájdalommentes!)
- szögbelövés (pisztoly)
- elvéreztetés (nagyállatok), ezen módszerek előtt nyugtatás vagy altatás alkalmazása ajánlott.

### 3. Nem javasolt eljárások

Fagyasztás, vízbefojtás, éter, kloroform, sztrichnin, magnézium-szulfát, izombénítók, stb.<sup>30-32,</sup>  
39



## VII. Kísérletek tervezése, értékelése, adatok feldolgozása (Dr. Kaszaki József)

E fejezet célja, hogy a gyakorlatban alkalmazható áttekintést adjon egy kísérlet részleteiről, a tervezésről, kivitelezésről és a kísérleti adatok értékeléséről. Az ötlettől a megvalósításig, illetve az eredmény birtokában a következtetés levonásáig az alábbi témaköröket érintjük: az irodalom áttekintése; a kísérleti hipotézis felállítása; a kísérlet megtervezése, kísérleti modellek, módszerek, protokollok, a kontroll csoport; a kísérlet kivitelezése; a mérési adatok értékelése, statisztikai analízis; a konklúzió, válasz a feltett kérdésre, a hipotézis igazolása.

### 1. Az irodalom áttekintése

A kísérlet tervezése a szakirodalom áttekintésével kezdődik. Fontos, hogy megismerkedjünk a kutatási téma hátterével. Frissítsük fel a korábban tanult és a témával kapcsolatos alapismereteinket, olvassunk minél többet és próbáljuk megérteni a közölt adatok és elméletek között található összefüggéseket. Mindehhez ma már nem szükséges beköltözni a könyvtárba - az Internet segítségével számos nemzetközi folyóirat és adatbázis elérhető. Az egyik leghasznosabb és jó kereső felülettel rendelkező rendszer a PUBMED (a honlap elérhetősége: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Kereshetünk kulcsszavak, szókombinációk alapján, a szerző neve vagy a folyóirat adatait megadva. A keresés eredményeképpen kapott közlemények kivonatát elolvashatjuk, majd szerencsés esetben (ha a folyóirat hozzáférése ingyenes) az Adobe Acrobat Reader program segítségével a közlemények PDF file formátumban letölthetők (az esetek egy részében a teljes cikk letöltéséhez csak a megfelelő előfizetés és jelszavak ismerete után juthatunk hozzá). Tanács: *inkább olvass egy hétig és kísérletezz egy napot, mint fordítva!*

### 2. A hipotézis felállítása

A témával az I. fejezet részletesen foglalkozott, ezért itt csak röviden összefoglaljuk a folyamat lényegét. Az összegyűjtött ismeretanyag alapján, annak ismeretlen, eddig nem tisztázott részleteire, fehér foltjaira építve fogalmazzuk meg a kérdésünket, amire kísérleti úton szeretnénk választ kapni. Ha a vizsgálandó jelenség általunk *feltételezett* folyamatát vázoljuk, kísérleti *hipotézist* alkotunk. Az elméleti alapok adottak, a folyamat bizonyos részletei lehetnek ismertek, de a folyamat mélyebb részleteit és összefüggéseit bizonyítani szeretnénk. Ha a kérdést jól tettük fel, hipotézisünk helytálló, a kísérleti tervezés és kivitelezés korrekt volt, akkor a kísérlet mérési eredményeinek analízise választ fog adni a feltett kérdésre.

### 3. A kísérlet megtervezése

Egy kísérlet részletes megtervezése a kísérleti *modell* és *objektum* kiválasztását, a (vizsgáló) *módszerek* feltételeinek megteremtését, ami egyben a kísérleti *elrendezés* (setup) és *protokoll* tervezését, valamint a kísérleti *csoportok* átgondolását igényli. Az utóbbi esetében kiemelt figyelmet kell fordítani a *kontroll* csoportra vagy csoportokra.

#### 3.1. A kísérleti modellek fő típusai

A kísérlet tervezésének meghatározó pontja, hogy milyen kísérleti modellt választunk, illetve milyen modell alkalmas az elképzelések megvalósításához. Kérdés, hogy sejt, szövet, szerv, szervrendszer, vagy az élőlény szintjén kívánunk-e vizsgálatokat végezni. Ezek alapján *in vitro* (*ex vivo*) és *in vivo* kísérleti modellek közül választhatunk, ez a csoportosítás első közelítésben az egyszerűbbtől a bonyolultabb, összetettebb életjelenségek vizsgálatát teszi lehetővé. Ez azonban nem azt jelenti, hogy az *in vitro* kísérlet kivitelezése egyszerű lenne, sőt a megvalósítás a mesterséges közeg miatt sok esetben igen költséges, és nagy anyag- és műszer igényvel jár.

*In vitro*: Mesterséges közegben fenntartott sejt, vagy szövet életjelenségeinek, működésének vizsgálatát jelenti. Elsősorban sejt és szövet kultúrák tartoznak ebbe a típusba (részletesen a XI. fejezet foglalkozik a témával). Az élő szervezetből kiemelt, abból eltávolított (*ex vivo*) szövet, szerv, vagy szervrendszer életjelenségeinek vizsgálata. A vitális működés fenntartására speciális mesterséges közeget biztosítunk, amely összetétele, fizikai és kémiai paraméterei közel azonosak a testnedvek (pl. vér) tulajdonságaival;

*In vivo*: Éber vagy altatott élőlény életjelenségeinek, normális vagy kóros működésének megfigyelése és vizsgálata.

### **3.2. A kísérlet „tárgya”**

A választott modell alapján kísérletünk „tárgya” (objektuma) lehet egyetlen sejt, de megfigyeléseket, méréseket végezhetünk *in vivo* körülmények között is. Az *in vivo* modellen belül további lehetőség az ún. „kis állat” (pl. rágcsáló) és a „nagy állat” (pl. kutya, sertés) modell. Ezek előnyeit és hátrányait az alábbiakban foglaljuk össze:

#### **3.2.1. ”Kis állat” modellek**

Előnye hogy a kísérletek nagyobb esetszámban végezhetők, mivel egyszerre több kísérlet is futhat párhuzamosan. A rövid tenyészdő a fejlődéssel összefüggő, vagy adott életkorban kialakuló folyamatok vizsgálatát is lehetővé teszi. Kiemelten fontos jelentősége lehet a genetikai specialitásoknak (transzgenikus, vagy knock out egér törzsek), amelyek révén molekuláris biológiai és celluláris folyamatok külön farmakológiai kezelések nélkül vizsgálhatók. Összességében ezek a modellek molekuláris biológiai, biokémiai vizsgálatok céljaira sokkal előnyösebbek, mint a nagy állat modell. Hátrányuk lehet a korlátozott (vagy nagyon költséges) instrumentáció (pl. hemodinamikai mérések csak korlátozottan végezhetők), másrészt bizonyos esetekben a kapott adatok nem adaptálhatók a humán viszonyokra.

#### **3.2.2. ”Nagy állat” modellek**

Az előnyök között kell említenünk mindazt, ami a rágcsáló modellek hátránya, vagyis a széleskörű instrumentációs lehetőségeket és a nagyobb humán kompatibilitást. Hátrányuk a kisebb esetszámú kísérleti lehetőség és a hosszú tenyészdő, ami gyakorlatilag kizárja a genetikai vizsgálatokat.

### **3.3. A metodikák**

A vizsgálómódszerek a tudományterületek szerint csoportosíthatók (morfológiai, biokémiai, fiziológiai, farmakológiai, genetikai, etc. módszerek), ezeket lehetőségeink és a kísérlet célja szerint alkalmazhatjuk. A terjedelmi korlátok miatt e fejezet természetesen csak bizonyos alapvető metodikákat összegezhet.

#### **3.3.1. Altatás/anaesthesia (részletesen lásd a IV. fejezetben)**

#### **3.3.2. Légzésbiztosítás**

A szabad, átjárható légutak biztosítása minden altatott állatkísérlet alapfeltétele. Maga az altatás, vagy a természetestől eltérő testhelyzet (háti fektetés) elégtelen gázcserét eredményezhet, amely a légzés által meghatározott életjelenségek befolyásolásával azonnal tévútra viheti kísérletünket. A légzésbiztosítás történhet a légcső szájon át történő intubálásával, azaz a légzést biztosító, megfelelő méretű cső bevezetésével. Rágcsálók esetében gyakoribb a trachea sebészi úton történő megnyitásával kivitelezett intubálás. A légzésvizsgáló módszereket a X. fejezet tárgyalja részletesebben.

#### **3.3.3. Sebészi technikák, instrumentáció**

E beavatkozások célja, hogy sebészi úton feltárjuk, azaz a megfigyelés számára láthatóvá tegyük a vizsgálandó területet (pl. hasüreg, mellkas), vagy a fiziológiai, biokémiai paraméterek monitorozására szolgáló érzékelő, jelátalakító és továbbító eszközöket (szenzorok, transzducerek, katéterek) a vizsgálandó szerv/szerv rendszer területére beültessük.

### **3.3.4. Életjelenségek vizsgáló módszerei**

A fiziológiai paraméterek monitorozására érzékelő, jelátalakító, továbbító eszközöket alkalmazunk, amelyeket megfelelő mérőműszerrel, illetve adatgyűjtő-jelanalizáló számítógéppel kapcsolunk össze. A legfontosabb fiziológiai paraméter a vérnyomás, amelynek monitorozása a keringési állapot megismerésének egyik alapfeltétele. Mérése közvetlen (invazív) vagy közvetett (nem-invazív) módon történhet. A vérkeringés vizsgáló módszereit az VIII. fejezet, a mikrokeringést vizsgáló módszereket a IX. fejezet tárgyalja részletesen.

### **3.3.5. Biológiai minták analízise**

A mintavétel technikája és módszere sarkalatos pontja a biológiai minták analízisének, amely történhet azonnal, vagy a minta bizonyos idejű tárolását követően. Biokémiai meghatározás esetében általában lényeges a minta hűtése. A hűtés céljára használt közeg lehet olvadó jég (0-4 °C), szénsavhó (-70 °C), vagy folyékony nitrogén (-180 °C). A mintavételi és a tárolási hőmérséklet szempontjából lényeges, hogy a mintát milyen biokémiai meghatározás céljára vettük, pl. enzimaktivitás mérése esetén előnyös a -70 °C alatti tárolás, de ez a tárolási hőmérséklet már károsíthatja a minták RNS tartalmának meghatározását. Biológiai mintavétel történhet testnedvekből (vér, nyirok, liquor, vizelet), illetve szövetből (biopszia). Vérmintákból meghatározhatjuk:

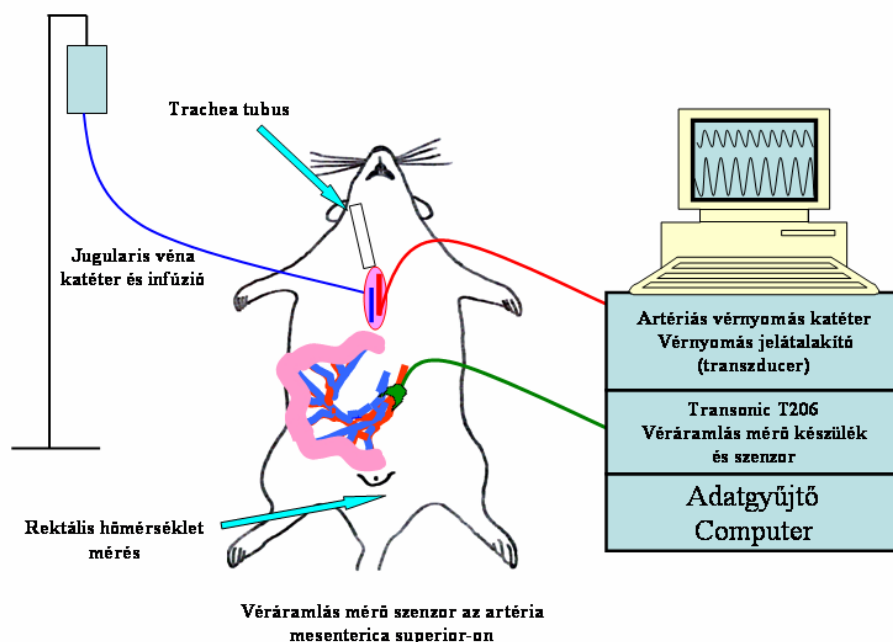
- a sejtes komponensek számát (vörösvértest, leukocytá, vérlemezke),
- plazma összetevőket, metabolitokat (vércukor, laktát, piruvát szintek, ion összetétel, stb.),
- rheológiai (áramlástan) paramétereket (süllyedés, hematokrit, viszkozitás),
- vérgáz analízis (vér pH; pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, oxigén szaturáció, stb.),

Szöveti mintavételből (biopsziákból):

- biokémiai, molekuláris biológiai meghatározások;
- szövettani módszerek alkalmazása (hisztokémia, stb.).

### **3.4. A kísérleti elrendezés (setup)**

A szükséges mérőműszerek és metodikák használatának elsajátítását követően állíthatjuk össze kísérleti elrendezésünket. A kísérleti elrendezés (*setup*) az alkalmazott módszerek és a méréseket végző műszerek összerendezett gyűjteménye. Magában foglalja a szükséges sebészi instrumentációt, a kísérleti állapot fenntartásához szükséges eszközöket (altatógép, respirátor, infúziós pumpa), a vitális jelek monitorozásához szükséges eszközöket, valamint a mintavételekből történő biokémiai, szövettani módszereket. Az 6. ábra egy altatott patkányon történő vérkeringés monitorozás elrendezését szemlélteti.

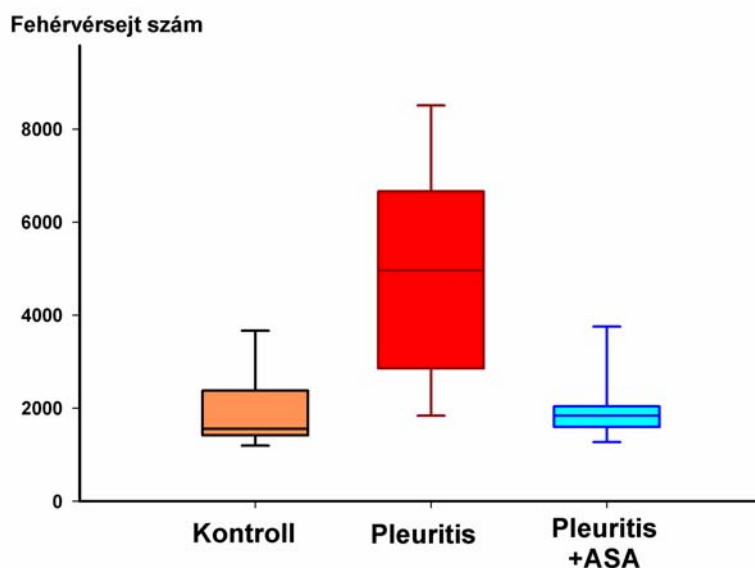


**6. ábra** Mesenterális keringési vizsgálat kísérleti elrendezése patkány modellben

### 3.5. A kontroll és a kísérleti csoportok

A kísérlet egyik legfontosabb pontja a megfelelő kontroll megtervezése. Lényeges kérdés, hogy mit tekintünk kontrollnak, illetve mit viszonyítunk mihez. A kontrollnak alapvetően azt az állapotot kell tükröznie, amelyhez képest egy beavatkozás következtében fellépő változás mértéke meghatározható. A kontroll lehet egy folyamat kiindulási kezdeti szakasza, azaz normál körülmények között, a tervezett beavatkozás előtt mért érték, vagyis alapvonal (*baseline*). Ez esetben *önkontroll*os kísérletről beszélünk. Az önkontroll azonban számos esetben nem elegendő, főleg akkor, ha a vizsgált folyamat hosszú és számos tényező (pl. altatás) befolyásolhatja a hosszasan vizsgálandó állapotot. Ezért a hosszabb időtartamú vizsgálatok esetében önálló *kontroll csoportra* van szükség. Ekkor a korrekt összehasonlítás céljából pontosan ugyanolyan ideig és módon kell a beavatkozás nélküli (kontroll) folyamatot vizsgálnunk, mint azt, amelyben a vizsgálandó folyamatot (pl. kóros állapotot) létrehoztuk.

Nemcsak egy kórállapotban bekövetkező változásokat, hanem a kórállapotot befolyásoló kezelés hatását, hatékonyságát is vizsgálhatjuk. Ez esetben célszerű a kezelés hatását egy *negatív* és egy *pozitív kontroll* csoport adataihoz hasonlítani. A negatív kontroll fogalma megegyezik a fentiekben vázolt kontroll csoport jellemzőivel. Olyan állapot, amelyben a vizsgált paraméterek változása minimális. A pozitív kontrollal az a célunk, hogy olyan állapotot hozzunk létre, amelyben a vizsgált paraméterek maximális mértékű változását idézzük elő. Tulajdonképpen az a csoport, amelyben magát a beavatkozást létrehozzuk, egyúttal pozitív kontrollként is funkcionálhat a beavatkozás hatását befolyásoló kezeléssel szemben. A **7. ábra** ezt az állapotot szemlélteti. Egy kísérletben mesterséges mellhártyagyulladás (*pleuritist*) hoztunk létre, és a kórállapot jellemzésére meghatároztuk a mellüregből kimosható, a gyulladás folyamatában fontos szerepet játszó fehérvérsejtek számát. A kontroll csoportban is elvégeztük a sebészi beavatkozást, de a gyulladáskeltő anyag helyett annak oldószerével (fiziológiás só oldattal) kezeltük őket. Ezt a csoportot tekintjük negatív kontrollnak. Pozitív kontrollnak tekintjük a kórállapotban szenvedő egerek csoportját, amelyben gyulladáskeltő anyag beadásával kísérletes pleuritist okozunk. A harmadik csoportunk gyógyszeres (pl. acetilszalicilsav; ASA) kezelést kapott, amely csoport adatait az előző két kontroll csoport adataival vetjük össze, a kezelés hatékonyságának megállapítása céljából.



**7. ábra** Negatív és pozitív kontroll, valamint kezelt csoport adatainak szemléltetése 'box-whisker' diagramon (magyarázatot lásd a szövegben).

Az előző példa alapján összegezhetjük, hogy egy kísérlet tervezésénél (annak időtartamától függetlenül) milyen kísérleti csoportokra lehet szükség. Az ún. álműtött, vagyis intervenciómentes, negatív kontroll csoport mellett az intervenciónak kitett csoport egyúttal a pozitív kontroll szerepét is betölti. A kísérletesen létrehozott kórfolyamatot befolyásolhatjuk előkezeléssel (befolyásoló hatás indítása az intervenció előtt), illetve kezeléssel, azaz a beavatkozás alatt elkezdett terápiával. Ennek megfelelően 'előkezelt' és 'kezelt' kísérleti csoportokról beszélhetünk.

### 3.6. A kísérleti protokoll

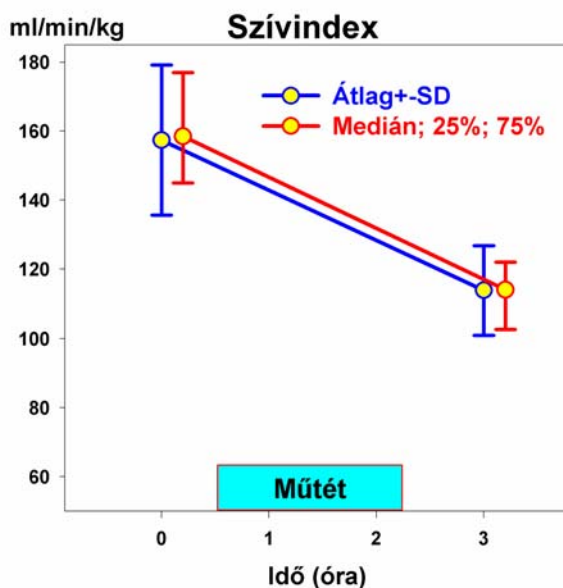
A kísérleti protokoll alapja, hogy a kísérlet egymást követő szakaszai előre meghatározott időrendben követik egymást. A kísérleti periódusok általában a kontroll, az intervenció (sebészi, kórélettani, farmakológiai) és az intervenció következményeinek a megfigyelése, amely kiegészülhet egy előkezelési, illetve egy beavatkozás alatt/után végzett kezelési periódussal. Fontos, hogy a kísérlet valamennyi csoportjában ugyanazokat az előre eltervezett, szigorú időrendnek megfelelő méréseket, illetve mintavételezést kell elvégezni a pontos összehasonlíthatóság érdekében.

A kísérleti protokoll tervezésénél két (részben ellentétes) szempontot érdemes figyelembe venni a mérések/mintavételezés számát illetően. Az egyik szempont, hogy elegendő számú mérést végezzünk ahhoz, hogy a vizsgált folyamatot megfelelően feltérképezzük. Ez különösen hosszú kísérlet esetében lényeges. A másik szempont a mintavételezések számát illetően az, hogy már a tervezéskor vegyük figyelembe a kísérlet értékelését jelentő statisztikai analízis igényeit. Ugyanis ha lényegtelen mérési adatokkal sűrítjük a kísérleti protokollt, az megnehezítheti a statisztikai kiértékelést, mivel a megfigyelt változás elveszhet a lényegtelen adatok tengerében. Ennek elkerülése céljából érdemes áttekintenünk, hogy milyen kísérleti

protokoll típusokat alkalmazhatunk, amelyek egyúttal alapját képezik a későbbi statisztikai analízisnek is.

### 3.6.1. Két mérés összehasonlítása ("előtt – után" típus)

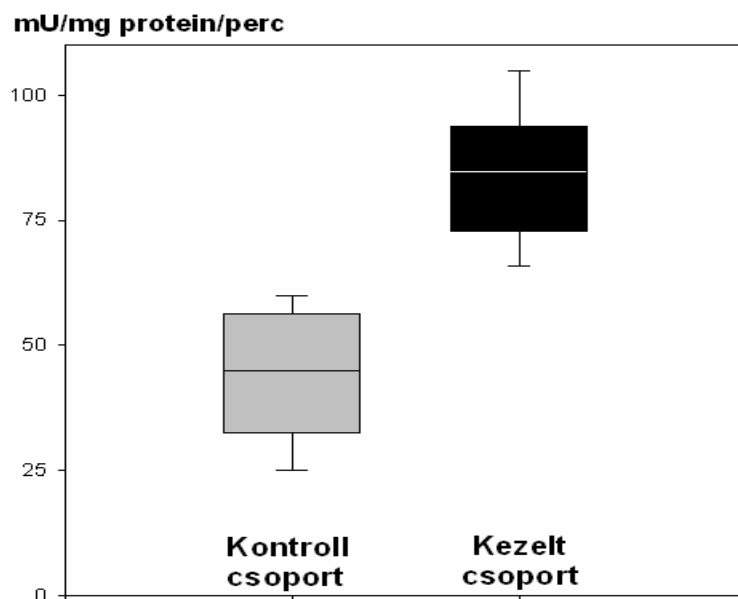
A legegyszerűbb eset, amikor mindössze két mérést végünk ugyanazon az egyeden, a beavatkozás előtt és után (**8. ábra**). A statisztika analízis szempontjából a két mérés *egymástól függő* mérésnek tekinthető, mivel a mérések ugyanazon az egyeden történtek.



**8. ábra** Két, egymástól függő mérés összehasonlítása egy beavatkozás előtt és után

### 3.6.2. Két csoport összehasonlítása egy mintavétel alapján

Két kísérleti csoportunk van, amelyekben csak egy-egy mérés/mintavétel történik, ugyanabban az időpontban. Így a két csoport egy-egy, azonos időpillanatbeli eltérését hasonlíthatjuk össze (kontroll – kezelt csoportok esete; **9. ábra**). A statisztika szempontjából a mérések *egymástól függetlenek*, mivel két különböző populáció adatait hasonlítjuk össze.



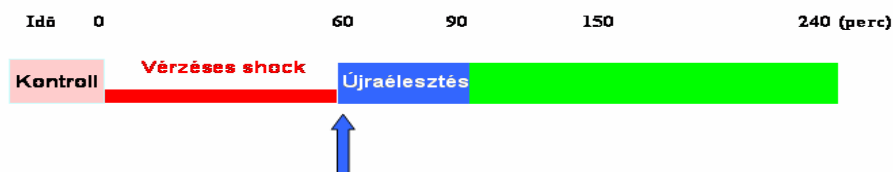
**9. ábra** Két, egymástól független csoport összehasonlítása

### 3.6.3. Kettőnél több csoport összehasonlítása egy mintavétel alapján

Az előbb említett (3.5. pont) pleuritis kísérlet tipikus példája a kettőnél több csoport összehasonlításának, ahol negatív kontroll, pozitív kontroll (indukált kórállapot) és a kezeléssel befolyásolt kórállapotú csoportokat hasonlítottuk össze (**7. ábra**). A statisztika szempontjából a mérések *egymástól függetlenek*, mivel több, különböző populáció adatait hasonlítjuk össze.

### 3.6.4. Többször ismételt mérések a populáció egy csoportjában

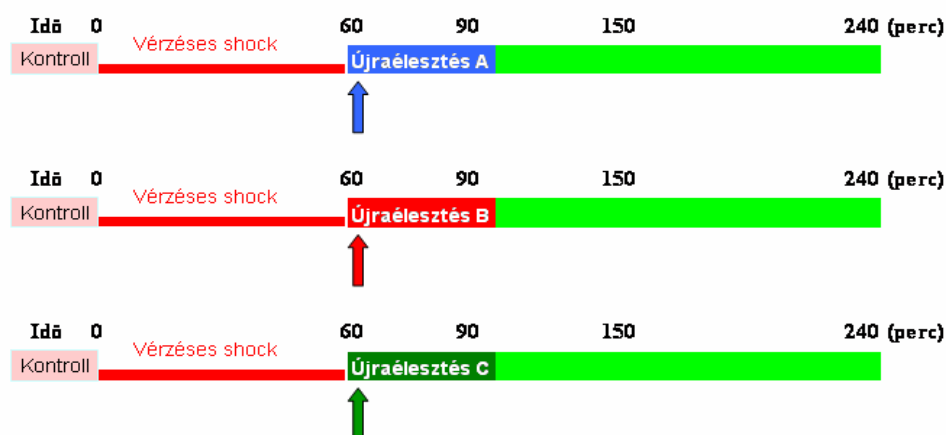
Ezt a kísérleti protokoll típust akkor alkalmazzuk, ha egy folyamat időfüggését vizsgáljuk. Minimum 3 mérés/mintavétel esetén érvényes, ahol a vizsgált paraméter változását a kezdeti kontroll alapvonal (*baseline*) értékéhez hasonlítjuk (**10. ábra**). A statisztikai analízis szempontjából a mérések *egymástól függő* mérésnek tekinthető, mivel a mérések ugyanazon az egyeden történtek.



**10. ábra** Többször ismételt, egymástól függő mérések protokoll típusa egy csoporton belül

### 3.6.5. Többször ismételt mérések kettőnél több csoport esetén

Az előzőhöz hasonló, de kettőnél több csoport esetére érvényes protokoll típus, ahol szintén egy folyamat időfüggését vizsgáljuk, természetesen kettőnél több, ismételt mérést/mintavételezést végezve (11. ábra). Ez esetben az adatok összehasonlítása két szempont szerint történhet. A statisztika analízis szempontjából a mérések *egymástól függő* mérésnek tekinthetők egy csoporton belül, ahol a vizsgált paraméterek változását a kontroll alapvonal (*baseline*) értékéhez hasonlítjuk. A másik szempont a csoportok közötti összehasonlítás, amely esetben minden egyes vizsgált időpontban a kapott adatokat *egymástól függetlennek tekintjük*.



11. ábra Többször ismételt mérések összehasonlítása kettőnél több csoport esetén

#### 4. A kísérlet kivitelezése

Egy *in vivo* kísérlet igen sok türelmet és kitartást igényel, mivel számos dologra kell egyszerre figyelmet fordítanunk. Nemcsak a mérések pontos kivitelezésére, hanem a körülmények standardizálására, ezek fenntartására is ügyelnünk kell. Két kérdés merül fel a kísérleti kivitelezés kapcsán: 1. mit és mennyit mérünk, és 2. mire figyelünk kísérlet közben?

1. A lehetőségeinkhez képest minél több paramétert, minél többször meg kell mérni, különösen az elő-kísérletek időszakában, amikor még pontosan nem ismerjük a vizsgált folyamat változását, vagy a kísérleti alanyunk reakcióit. A sikeres kísérletek számának növekedésével (optimális esetben) kezd körvonalazódni a változás iránya, tendenciája, amely lehetővé teszi a mérési időpontok, illetve a vizsgálható paraméterek számának optimalizálását. Az elő-kísérletek főleg adatokat később szelektálni lehet, de a hiányzó adatokat csak újabb, költséges mérésekkel lehet pótolni.

A kísérleti kivitelezés fontos eszköze a jegyzőkönyv. Lényeges, hogy a kivitelezés minden lépését, a mérések/mintavételek pontos időpontját, a gyógyszeres kezelések paramétereit (beadás módja, dózis, volumen, kezelés időtartama) és minden egyéb megfigyelésünket a jegyzőkönyvben rögzítsük. A jegyzőkönyv esetében fokozottan érvényes „a szó elszáll, az írás megmarad” elve: tömören, lényegre törő módon írunk, úgy, hogy akár évek múlva is érthető legyen mindenki számára.

2. Néhány példa arra, hogy mire figyelünk kísérlet közben:



- Fenntartó altatás: figyeljük az ébredés jeleit (pislogás, izomfeszítés; szívfrekvencia emelkedés) és meghatározott időpontokban, vagy amikor szükséges, adjunk fenntartó dózisú anesztetikumot.
- Testhő: altatott állatkísérletben nem elhanyagolható paraméter, amelynek ellenőrzése minimális odafigyeléssel és technikai eszközgénnyel megoldható. A rektális (végbélben történő) hőmérséklet monitorozása egyszerű és megfelelő pontosságú megoldás. Bizonyos anesztetikumok, műtétek és kórállapotok befolyásolhatják a testhő regulációját, amelyet fűtőpárna alkalmazásával tudunk kompenzálni.
- Infúzió: a folyamatos, kontrolált folyadék pótlás rendkívül fontos az altatott és sebészi beavatkozáson átesett állatok esetében. Csak így kompenzálható a hosszú távú altatás és a sebészi beavatkozás negatív hatása.
- Végáz: ha lehetőségünk van rá, ne hanyagoljuk el a végázok monitorozását. Azonnal jelzi a légzés és a homeosztázis zavarát, amelyet mesterséges lélegeztetéssel korrigálhatunk.

## 5. A mérési adatok értékelése, statisztikai analízis

### 5.1. Az adatbázis elkészítése

A mérési adatok összegzéséhez és értékeléséhez használjunk adatbázis kezelésére alkalmas szoftvereket (pl. MS Excel). Egy-egy kísérlet adatait ún. adat-blokkokba (rekord) rendezzük, amelynek első oszlopai a kísérlet dátumát, kódját, a csoport megnevezését és esetleg az adat forrás file nevét tartalmazzák (az adott rekordon belül állandó cellatartalom oszloponként). A mérések időpontja, illetve a mért paraméterek további oszlopokba kerülnek (az adott időponthoz tartozó sorokban, az idő függvénye szerint változó cellatartalommal). A 10. táblázat a fentieknek megfelelő adatbázis részletét szemlélteti.

**10. Táblázat** Az adatbázis felépítése (jelölések: Sham-op = álműtött, kontroll csoport; MBP = artériás középnyomás; HR = szívfrekvencia; BTemp = testhőmérséklet; CO = perctérfogat)

| Dátum      | Kód   | Csoport | Forrás | Idő | MBP   | HR     | BTemp | CO    |
|------------|-------|---------|--------|-----|-------|--------|-------|-------|
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID1 | 0   | 76,42 | 389,61 | 37,55 | 73,6  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID2 | 30  | 96,56 | 489,8  | 38,28 | 60,1  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID3 | 60  | 92,63 | 454,55 | 37,85 | 61,3  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID4 | 90  | 98,86 | 478,09 | 37,75 | 71,2  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID5 | 120 | 85,95 | 585,37 | 37,43 | 87,7  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID6 | 150 | 79,02 | 444,44 | 38,03 | 68,6  |
| 2006.10.13 | Col1  | Sham-op | CO ID7 | 180 | 83,46 | 463,32 | 37,5  | 74,8  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID1 | 0   | 154,1 | 421,1  | 37,9  | 75,0  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID2 | 30  | 152   | 412    | 37,2  | 83,1  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID3 | 60  | 151,5 | 408,6  | 36,7  | 68,9  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID4 | 90  | 155,3 | 375,1  | 35,4  | 74,5  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID5 | 120 | 147   | 409    | 37,5  | 87,2  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID6 | 150 | 138,5 | 454,1  | 38,6  | 94,3  |
| 2007.01.31 | Col32 | Colitis | CO_ID7 | 180 | 136,2 | 447    | 37,0  | 103,1 |

### 5.2. Az adatok grafikus ábrázolása

*Diszkrét (kategórikus)* adatokat (pl. férfi/nő; él/meghalt), amelyek csak egyetlen értéket vehetnek fel, általában oszlop, vagy kör diagramon ábrázoljuk.

Adataink többsége inkább *folytonos típusú*, azaz bármely értéket felvehet, így ábrázolhatók maguk a mérési pontok (*pontdiagram*), vagy a mérésekből számolt statisztikák. Ez utóbbi

alapján lehet *hisztogramot*, *box-whisker* diagramot, *átlag-szórás* diagramot készíteni egy változó esetén.

A pontdiagram alkalmazásának egyik példája a korreláció vizsgálat, amikor két paraméter kapcsolatát pontthalmaz szemlélteti.

A *box-whisker* ábrázolási mód feltünteti az adatok 5-95 %-os terjedelmét, alsó és felső szórását, valamint a középértéket (ld. **7. ábra**).

Az *átlag-szórás* diagram lehet oszlop vagy vonal grafikon.

### 5.3. A statisztikai analízis

Előljáróban szükséges megjegyezni, hogy e jegyzet terjedelme nem teszi lehetővé, hogy a statisztikai analízis témakörrel részletesen foglalkozzunk. Célunk az alapfogalmak érthetővé tétele, és hogy rövid áttekintést adjunk a gyakorlatban alkalmazható statisztika módszerekről.<sup>41</sup>

#### 5.3.1. Alapfogalmak

*Sokaság (populáció)*: a vizsgálni kívánt egyedek, tárgyak, stb. összessége, amelynek minden elemre kiterjedő, teljeskörű vizsgálatát nem lehet, vagy nem gazdaságos elvégezni.

*Statisztikai minta*: a sokaságból kiválasztott egyedekhez tartozó megfigyelési adatok. A minta elemszáma a benne szereplő egyedek száma. Minél többet mérünk, annál jobban megközelíthetjük a minta alapján a populáció tulajdonságait. Ugyanakkor a mérésnek anyagi, térbeli és időbeli korlátai lehetnek. A minta optimális elemszámának meghatározása fontos feladat, és függ a problémától, előzetes ismereteinktől, az alkalmazandó módszertől.

Mintavételnél fontos szempont a *reprezentativitás* (azaz a kiválasztott minta jól reprezentálja a vizsgálni kívánt sokaságot), és a *függetlenség* (pl. ha ugyanazt az egyedet többször megmérjük, az így keletkezett adatok nem függetlenek - a minta elemszámát így nem lehet növelni).

A minta *eloszlása (hisztogram)*: a legkisebb és a legnagyobb mintaelem közti különbséget valahány (általában 5-nél több) intervallumra osztjuk. Ábrát készítünk úgy, hogy az intervallumokra olyan magas téglalapokat rajzolunk, mint ahány megfigyelés abba az intervallumba esik. Minél több a mintaelem, és minél több az intervallumok száma, a hisztogram annál jobban megközelíti az elméleti eloszlást. Ha ez az elméleti eloszlás formája harang-görbe (Gauss-görbe), akkor azt mondjuk, hogy a minta *normális eloszlású* populációból származik (**12. ábra**). Ha az eloszlás formája eltér a szabályos harang-görbétől (ferdeség jellemzi), akkor a minta *nem-normális eloszlású* populációból származik (**13. ábra**).

*Elemszám*: a mérések száma

*Átlag*: középérték. Ha  $x_1, x_2, \dots, x_n$  jelöli a mintát, az átlag a mintaelemek számtani közepe, azaz:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

*Standard deviáció (SD)*: a minta szórása, azaz a minta elemeinek az átlagtól való átlagos eltérése. Normális eloszlás esetén  $\bar{x} \pm 2 \cdot SD$  intervallumban található a mintaelemek 95%-a. Képlete:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

*Standard error (SE v. SEM)*: az átlag szórása  $SE = SD/\sqrt{n}$ . Azt fejezi ki, hogy ha új mintát vennénk ugyanebből a populációból, akkor ennek az átlaga mennyire térne el a most kiszámolttól. Normális eloszlás esetén  $\bar{x} \pm 2 \cdot SE$  jelenti azt az intervallumot, amelyben az átlag mozoghat az esetek 95%-ában.

*Percentilis*: 10%-os percentilis: az a szám, aminél a mintaelemek 10%-a kisebb.

*Kvartilisek*: 25%-os és 75%-os percentilisek (a minta "negyedelő" pontjai).

*Medián:* a minta közepe, az a szám, aminél a mintaelemek 50%-a kisebb vagy egyenlő. Számítása: a mintaelemeket nagyság szerint rendezve a medián középső elem, vagy a két középső átlaga.

*Terjedelem:* a legnagyobb és a legkisebb érték (mintaelem) közötti különbség.

*Ferdeségi együttható:* mérőszám arra, hogy az eloszlás szimmetrikus-e vagy ferde. Negatív ferdeségi együttható esetén baloldali (negatív) ferdeségről van szó, azaz az átlagnál nagyobb értékek gyakoribbak.

*Statisztikai becslés:* a populáció eloszlásának valamely ismeretlen paraméterét a minta alapján becsüljük. A minta elemeit egy formulába helyettesítve közelíthetjük a paraméter igazi értékét (pl. a populáció "elméleti" átlagát a minta elemekből szokásos módon számolt átlaggal közelítjük). A *megbízhatósági intervallum (konfidencia intervallum)*: olyan intervallum, amely (általában) nagy valószínűséggel tartalmazza a becsült paraméter valódi értékét.

*Hipotézisvizsgálat:* Azt az eljárást, amellyel a statisztikusok az adatokat elemzik annak eldöntésére, hogy van-e elegendő bizonyíték a megsejtett (alternatív) hipotézis alátámasztására, hipotézisvizsgálatnak nevezzük. Két ellentétes állítást kell kialakítani, melyeket null-hipotézisnek és alternatív hipotézisnek nevezünk. A kísérletet azért végezzük, hogy az alternatív hipotézist bebizonyítsuk azzal, hogy lehetőleg kevés kétségünk maradjon afelől, hogy az alternatív hipotézis igaz, megmutatva, hogy a null-hipotézis nagy valószínűséggel hamis.

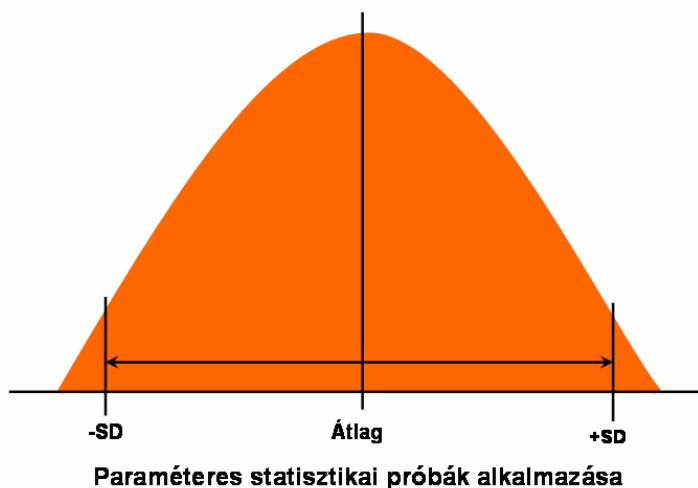
*p-érték:* annak valószínűsége, hogy a null-hipotézis fennállása esetén éppen az adott próbastatisztikát kapjuk. A számítógépes programrendszerek ezt a p értéket közelítőleg ki tudják számítani. Ma már többen ajánlják ennek a p-értéknek a közlését a  $p > 0.05$  vagy  $p < 0.05$  használata helyett. Ugyanis, a  $p > 0.05$  alapján csak annyit tudunk, hogy nincs szignifikáns különbség 95%-os szinten. De ha pl.  $p = 0.078$ , akkor látható, hogy ez már "majdnem" szignifikáns, illetve az is 90%-os szinten. Ha pl.  $p = 0.975$ , akkor "messze" vagyunk a szignifikanciától, és elég biztosak lehetünk abban, hogy valóban nincs különbség.

*A szignifikancia, szignifikáns eltérés:* a null-hipotézistől való, adott szintet meghaladó eltérés. A szignifikancia nem jelenti azt, hogy az összehasonlított várható értékek biztosan különböznek, csak azt, hogy a megegyezés valószínűsége kicsi (5%).

*Nem szignifikáns:*  $p > 0.05$ , 95%-os szinten nem szignifikáns különbség azt jelenti, hogy nem sikerült különbséget kimutatni.<sup>41</sup>

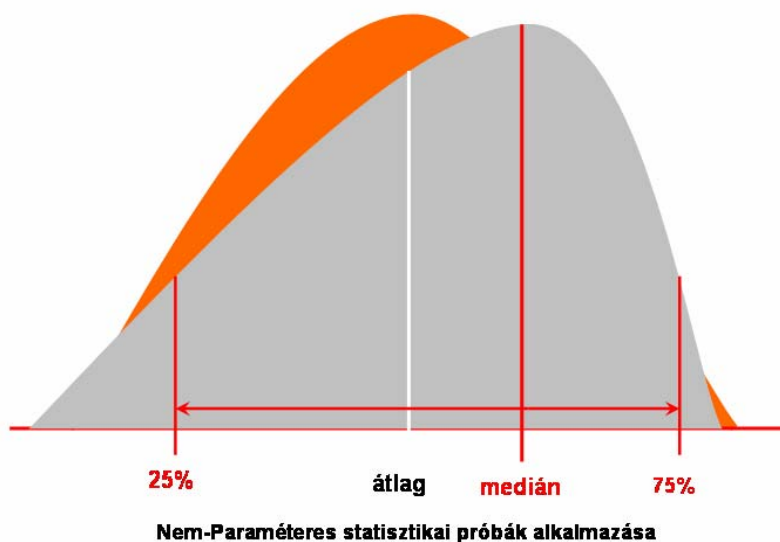
### 5.3.2. A statisztikai analízis gyakorlati alkalmazása

Adataink statisztikai analízisét célszerű eloszlás vizsgálattal kezdeni. Ha elég nagy elemszámú mintánk van (több száz), akkor az eloszlás típusa nagy pontossággal megállapítható a ferdeségi együttható, vagy a szórás azonosság tétele alapján (a statisztikai programok általában automatikusan elvégzik az eloszlás vizsgálatot). Azonban igen ritkán fordul elő, hogy több száz adatunk van, a mintánk elemszáma legtöbbször 5-20 közé esik. Ilyen, relatíve kis elemszám esetén az eloszlás típusa pontosan nem állapítható meg, így kisebb hibát követünk el, ha feltételezzük a nem-normális eloszlást.

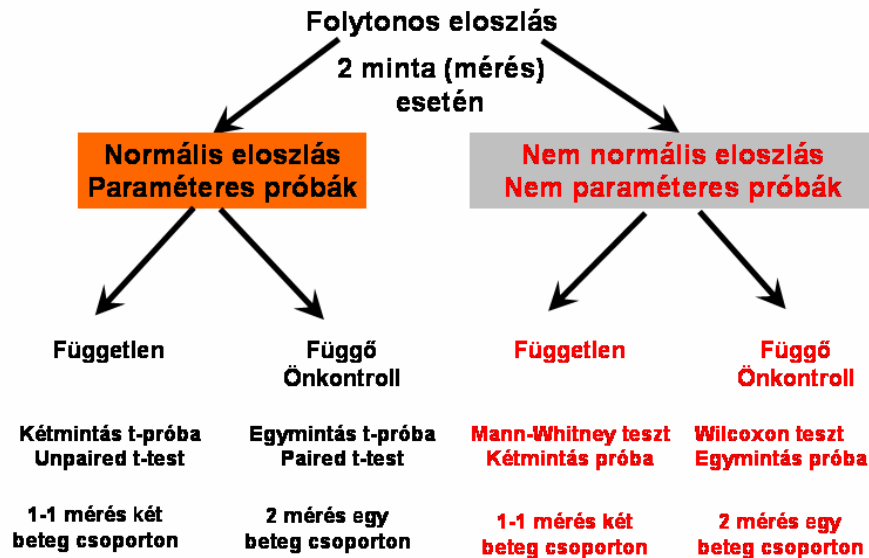


**12. ábra** Harang formájú normális eloszlás (Gauss-görbe), amelyet az adatok átlagával és szórásaként a standard deviációval jellemezhetünk

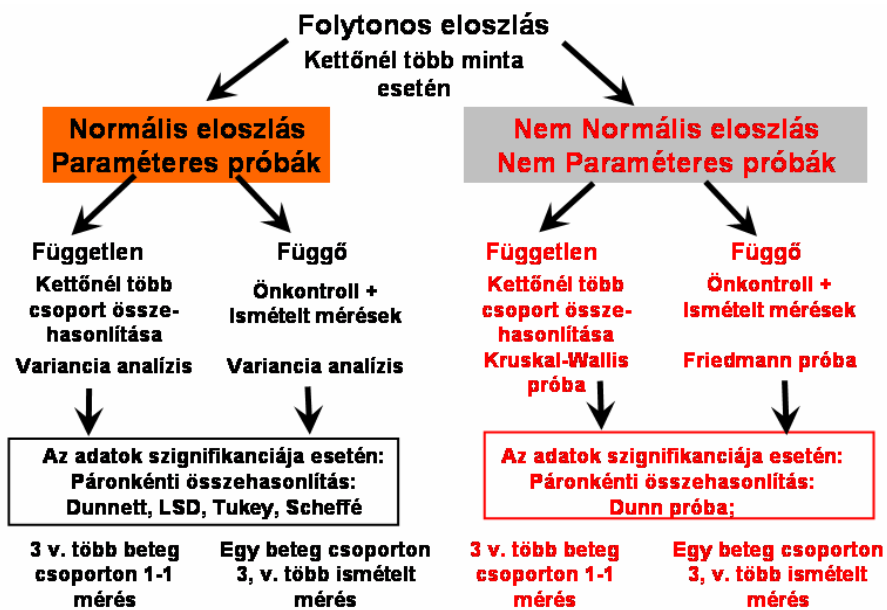
A statisztikai vizsgáló módszereket (próbákat) az eloszlás típusának megfelelően alkalmazhatjuk. Paraméteres eloszlás (Gauss görbe; **12. ábra**) esetén paraméteres statisztikai próbákat, míg nem-paraméteres eloszlás (torzult Gauss görbe; **13. ábra**) estén nem-paraméteres statisztikai próbákat alkalmazhatunk. A továbbiakban használandó statisztikai próbák kiválasztását már a kísérleti protokoll típusa határozza meg. Két minta esetén egy mintás, vagy két mintás próbákat végezhetünk, attól függően, hogy adataink egymástól függő, vagy függetlenek. Két minta esetén választható próbák áttekintéséhez a **14. ábra** nyújt segítséget. A kettőnél több minta, illetve ismételt mérések esetére az alkalmazható statisztikai próbákról a **15. ábra** nyújt áttekintést.<sup>41</sup>



**13. ábra** Torzult harang-görbe formájú, nem-normális eloszlás, amelyet az adatok medián értékével és szórásaként a kvartilisekkel jellemezhetünk



14. ábra Két minta esetén választható statisztikai próbák áttekintése



15. ábra Kettőnél több minta, illetve ismételt mérések esetén alkalmazható statisztikai próbák összegzése

## VIII. Életjelenségek monitorozása a gyakorlatban - a keringés (Dr. Kaszaki József)

Minden fejlett monitorozás fizikai, technikai alapja a változások (elektromos) jellé alakítása, melynek alapvető sorrendje a jelérzékelés → jelátalakítás → erősítés és zavarsszűrés → adat kijelzés (analóg, digitális) → adatfeldolgozás → adattárolás. A transducer (jelátalakító) jellegzetességei:

*Szenzitivitás (érzékenység):* az a minimum input (bemeneti) jel, amely mérhető (detektálható) kimeneti (output) változást hoz létre;

*Range:* a vizsgált paraméter még mérhető maximum és a minimum értékének különbsége;

*Pontosság:* a mérés reprodukálhatóságának a foka;

*Felbontás:* a legkisebb detektálható input növekedés, amely detektálható output jelet eredményez;

A transducer kimenete elektromos jel, amit erősíteni és tárolni lehet. Az elektromos jel kábelon kerül a megjelenítő eszközhöz (kijelző). Az elektromos jelet analóg → digitális átalakító (A/D konverter) formálja a számítógép számára használható információvá.<sup>42</sup>

### 5.1. Nem invazív vizsgáló módszerek

#### 5.1.1. Elektrokardiográfia

Állatkísérletek esetében is széles körben alkalmazott nem-invazív eljárás, amely a normális, illetve attól eltérő szív működésről, ritmus zavarokról, a szívfrekvenciáról, a szívizom oxigén státuszáról ad információt. A humán EKG jelhez képest jelentős eltérések lehetnek a kísérleti állatok esetében (pl. fordított T hullám sertések esetén).

#### 5.1.2. Indirekt vérnyomás-mérés

A legfontosabb fiziológiai paraméter a vérnyomás, amelynek monitorozása a keringési állapot megismerésének egyik alapfeltétele. Az indirekt, nem invazív vérnyomás-mérés elsősorban rágcsálók (egerek, patkányok) esetében használt eljárás, amely során az állatok farkára helyezük a mandzsettás érzékelőt. A mérés az oszcillatonometria ('elektromos' vérnyomásmérő) elvén alapul.

#### 5.1.3. Pulzus oximetria (pulzoximetria)

Folyamatos, nem invazív módszer az artériás oxigén szaturáció és a szívfrekvencia mérésére. A vér oxigénnel való telítettsége (szaturációja) kiszámítható az oxigenizált hemoglobin és az össz-hemoglobin arányából. A vért adott hullámhosszúságú fényrel megvilágítva a visszavert (áthaladó) fény intenzitásából következtetni lehet az oxigénszintre. Az artériás pulzus által hozzáadott többlet – variábilis - fényelnyelést alkalmaznak az artériás oxigén szaturáció kiszámítására. Rágcsálók esetében a szenzort a szőrtelen testfelszínre (fül, farok) helyezhetjük, míg nagy állat modell esetén az állat nyelve a legalkalmasabb célterület.<sup>42</sup>

### 5.2. Kardiovaszkuláris monitorozás invazív módszerei

#### 5.2.1. Az invazív nyomásmérés alapelvei

Alapeszköze az ér lumenébe vezetett cső (intra-vaszkuláris kanül, ill. katéter), amely a vénás vagy artériás nyomást, mint mechanikus energiát, egy hajlékony, de viszonylag merev falú csövön át az energia átalakítóhoz (transducer) közvetíti. A kanül végén a csőben levő folyadékoszlop (sóoldat) közvetlenül érintkezik az érben áramló véroszloppal (a Pascal törvény alapján a nyomás gyengítetlenül terjed tovább a folyadékban). Így módon a vérnyomás jel a kanül belsejében lévő folyadékoszlop közvetítésével érintkezik a testen kívül elhelyezett szenzor membránjával, ami nyomás jelet elektromos jellé alakítja.

A vérkeringés egyes szakaszaiba invazív úton vezetett kanüloket folyamatosan kell heparinizált sóoldattal öblíteni. A katéterbe bejutott vért, ill. a katéterben keletkező buborékokat

el kell távolítani, ez utóbbiak jelentősen befolyásolják az eszközök működését. A pontos nyomásmérés feltétele a légtelen, minél merevebb és rövidebb kanül. A rendszer „0” pontját minden összeállítás elején, és a későbbiekben is ismételten meg kell határozni.

### 5.2.2. Vénás nyomásmérés

Vénás katéter bevezetésére általában a v. jugularis externa, vagy a v. femoralis a legalkalmasabb terület. A vénás kanül lehetővé teszi a fenntartó anesztetikum, vizsgálandó drogok és az infúzió beadását, valamint vérminta vételt. A megfelelően pozicionált v. juguláris katéter a centrális vénás nyomás, a jobb szívfél töltő nyomásának mérését teszi lehetővé, amelyből a keringő vérvolumenre lehet következtetni. Vénás vérmintából a sejtes komponenseket (vörösvértest, fehérvérsejt, és trombocita szám) és a vér rheológiai paramétereit (hematokrit, süllyedés, viszkozitás) határozhatjuk meg.<sup>42, 43</sup>

### 5.2.3. Artériás nyomás mérés

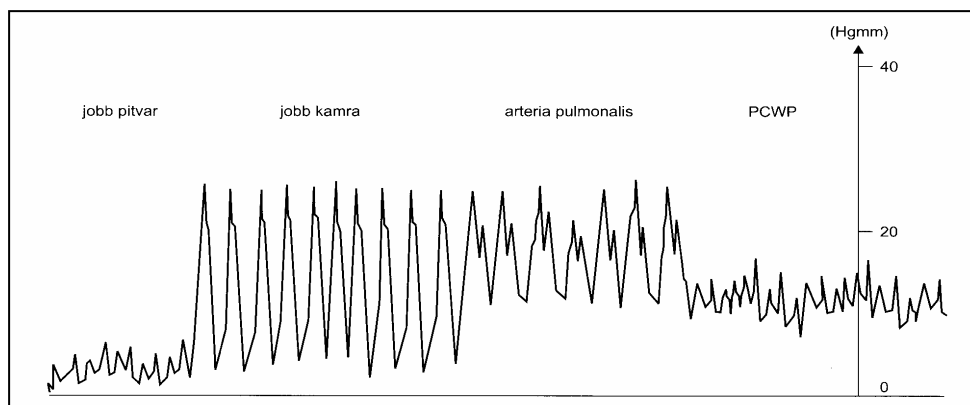
Az *in vivo* állatkísérletekben közvetlen artériás nyomásmérésre általában a femoralis vagy a carotis artériák kanülálása révén kerül sor. Az artériás katéter a vérnyomás közvetlen mérését, vérgáz méréseket, folyamatos hemodinamikai információt szolgáltat. Az adekvát szervperfúzió fenntartása szempontjából kiemelkedő jelentőségű az átlagos artériás vérnyomás megfelelő szinten való tartása. A pulzáló nyomás jelből annak szisztolés és diasztolés értéke, középnyomása és a percenkénti pulzushullám számából pedig a szívfrekvencia határozható meg. A pulzusnyomás (szisztolés-diasztolés nyomás különbség) jelzi a volumen státuszt. Magas pulzusnyomás: vazodilatációra, hipervolémiára, az alacsony pulzusnyomás vazokonstrikcióra, hipovolémiára utalhat. Az artériás nyomás mérés lépései:

1. Artéria kanülálása
2. Csatlakozás a mérőrendszerhez, buborékmentesség biztosítása;
3. A kanül biztonságos rögzítése
4. A transducer nulla pontjának beállítása és rögzítése a szív szintjében;
5. Heparin (1-2 egység /ml) alkalmazása a kanül öblítésére, véralvadást gátlás;
6. A mérés kezdete.

### 5.2.4. A pulmonális keringés (kisvérkör) monitorozása

Kis állat modellek esetén gyakorlatilag nem lehetséges katétert juttatni a kis vérkörbe (a módszer csak nagy állat modellben kivitelezhető). Az artéria pulmonális nyomásának (és a perctérfogatnak) a meghatározása Swan-Ganz katéterrel lehetséges, amelynek 4-5 lumene van. A sárga ág az a. pulmonális nyomás csatorna, a kék ág a termodilúciós teszt oldat beinjektálására szolgál (29 cm-el a katétervég előtt); a fehér ág a termisztor vezeték (a termisztor a katéter végén található); a piros ág a katéter végén levő ballon felfújására szolgáló csatorna, amely az a. pulmonálisba történő katétervég beúsztatást teszi lehetővé. Az 5. vezeték, a beinjektált hideg fiziológiás só oldat hőmérsékletét mérő termisztor kábele (5 csatornás katéter esetén);

A katéter felvezetése a jugularis vagy a femoralis vénán keresztül történik, a nyomás jelek kontrollálása mellett (16. ábra). Ha látjuk a jobb kamrai nyomás jelét, akkor a piros lumen, a katétervég ballon felfújása után lehet beúsztatni a termisztoros katéter véget az a. pulmonalisba. Sikeres felvezetés esetén a 10-25 Hgmm-es pulmonális nyomás jelet monitorozhatjuk. A ballon újabb felfújása esetén a pulmonális kapilláris éknyomás (*wedge pressure*), a katétervég előtti nyomás mérhető, amely a kisvérkör visszatérő ágának (bal pitvar) nyomásával egyenlő. Így tehát Swan-Ganz katéter alkalmazásával a centrális vénás nyomás, a pulmonális artéria nyomása és a kapilláris éknyomás, valamint a perctérfogat mérhető egyidőben.<sup>42, 43</sup>



**16. ábra** A kisvérkőri nyomásgörbe szakaszai és jellegzetességei

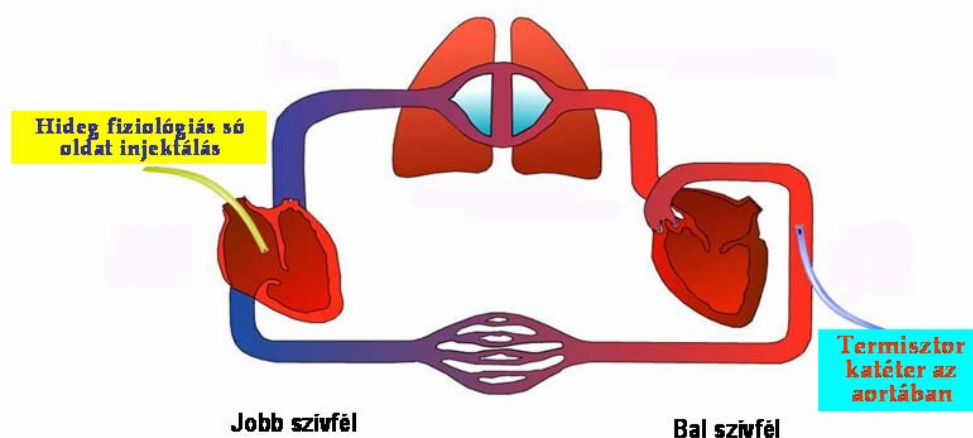
## 5.2.5. A perctérfogat monitorozása

### 5.2.5.1. Perctérfogat mérés pulmonális termofilúciós módszerrel

Ez a Swan-Ganz katéter alkalmazását igénylő módszer csak nagy állatok esetében alkalmazható. Perctérfogatmérés megfelelő készülékkel történhet, a jobb pitvar előtt, a kék ágon beinjektált 5 ml hideg (2-5 °C) fiziológiás sóoldat termofilúciós görbéje alapján. A folyadék pontos hőfokát a katéter szenzorja méri. A hőmérséklet-változást, a „hűtött vérbólus” továbbhaladását az a. pulmonalisban elhelyezkedő katétervéggi termisztor méri. A monitor a vér átmeneti hőmérséklet változásából termofilúciós görbét rajzol. A termofilúciós görbe alatti terület arányos a perctérfogattal. A görbeterület integrálásával a monitor számítógépe megadja a perctérfogatot.<sup>42-43</sup> Az artériás nyomás és a centrális vénás nyomás, valamint a perctérfogat ismeretében számítható a teljes perifériás ellenállás = (artériás középnyomás-centrális vénás nyomás)/perctérfogat.

### 5.2.5.2. Perctérfogat mérés transzpulmonális termofilúciós módszerrel

Említettük, hogy rácsálók esetében nem lehetséges katétert bevezetni a kis vérkörbe, de perctérfogat mérésre mégis van lehetőség, az ún. transzpulmonális módszerrel. A mérés feltétele egy centrális vénás katéter és egy artériás hőszenzoros katéter, amelyet általában az a. femorálisba vezetünk. A centrális vénába adott hőbolus hatását az artériás oldalon behelyezett kanül hőmérőszála regisztrálja (17. ábra). A teljes kis vérkör és a nagy vérkör artériás szakaszának egy részéből extrapolálunk az egész keringésre. Az időben és térben kiterjedtebb minta csökkenti a lélegeztetés befolyásoló hatását. A bolus-hatás görbe integrálásából számolt perctérfogat és a lefutásából nyert időadatok birtokában, a  $Q = V/t$  alapösszefüggés alapján különböző, a keringést jellemző térfogatokat, volumetriás paramétereket határozhatunk meg.<sup>43</sup>



**17. ábra** A transzpulmonális perctérfogat mérés sémája



### 5.2.6. Véráramlás mérés

A mérés célja egy adott érkeresztmetszeten időegység alatt átáramlott vérmennyiség meghatározása. A legelterjedtebb az ultrahangos áramlásmérés, amely során az ultrahang érzékelő szenzort (ún. próba, *probe*) a vizsgálandó ér lumene köré illesztjük. A mérés függ a rendelkezésre álló próba méretétől, így a mérésnek alsó és felső határa van (kis artéria áramlása nem, vagy pontatlanul mérhető 5 mm-es érátmérőre tervezett próbával). A közvetlen ultrahangos áramlásmérés az ér keresztmetszeten áthaladó ultrahang sugarak és azok áthaladási idejének (az ún. *transit-time*) mérésével történik. Két ultrahang adó-vevő helyezkedik el egymással szemben, az ér másik oldalán pedig egy visszaverődő „reflektor” felület található, és mindkét adó ultrahang sugarakat küld a másik felé. Az egyik jel a véráramlás irányába, a másik az áramlással szemben halad. Amikor az első sugár beérkezik, elindul a másik sugár az áramlással szemben. Az ultrahang sugarak áthaladási ideje eltér az áramlás irányú és az áramlással szemben történő haladás esetén. A mérés alapja a különböző áthaladási időtartamok, illetve az áthaladási időkülönbségek megállapítása egy számítógépes szoftver segítségével.<sup>43</sup>

### 5.2.7. A szív kontraktilitása

A bal kamra feladata a diasztole során beáramlott vér továbbítása a nagyvérkörbe. A kamra teljesítményét jelentősen befolyásolhatja a szív kontraktilitása. A szívkontraktilitás meghatározása a gyakorlatban a normális szívciklus szisztolés fázisában lehetséges, az izometriás kontrakció ( $dP/dt \text{ max}$ ) vagy a végszisztolés nyomás-volumen összefüggés (ESPVR) alapján. 1. Az artériás nyomásgörbe  $dP/dt_{\text{max}}$  értéke a balkamrai nyomásváltozás növekedését reprezentálja, ami a szívkontraktilitás paramétere. 2. ESPVR mérés esetén valamely, a pumpafunkcióra utaló paraméter ( $dP/dt$ ; kamranyomás) és az előterhelésre utaló paraméter (végdiasztolés volumen) egyidejű mérésével hozzuk létre a nyomás-volumen hurok görbéket, amelyek végszisztolés pontjaira (a legnagyobb nyomáshoz tartozó legkisebb volumen) illesztett egyenes meredeksége az elasztancia, melyet a kontraktilitás mérőszámaként fogadunk el. A gyakorlatban ez a módszer csak egy speciális, a kamra üregébe vezetett nyomás és volumen egyidejű meghatározására alkalmas katéter révén lehetséges.<sup>43</sup>

## IX: A mikrokeringés vizsgálata (Dr. Szabó Andrea)

### 1. Bevezetés

A keringési rendszer betegségei, a szív- és érrendszeri kórképekre visszavezethető morbiditás és halálozás jelentős egészségügyi problémát jelent szerte a világon. E problémakör egészen addig fog kihívást jelenteni, amíg az eltérések oka és a fenntartásukért felelős tényezők, vagyis a betegségek kórtana ismeretlen, vagy csak részben ismert. A lassú előrehaladás fő oka ezúttal is az ismeretek, információk hiánya.

Minden szerv élete a mikrokeringés függvénye, ez a rendszer határozza meg, hogy a sejtek, szövetek, szervek mennyi oxigént és tápanyagot kapnak az életben maradáshoz. Mikrokeringési vonatkozásai nem csupán keringési zavaroknak vannak (pl. sokk, érelzáródások), pl. a bőr mikrokeringés kóros változása a klinikai megjelenés egyik fontos összetevője diabetes mellitusban, és a mikrokeringés zavarai számos gyulladásos betegség hátterében is megtalálhatók. Az akut gyulladás valamennyi klinikai tünete mögött (*rubor* = vörösség, *tumor* = duzzanat, *calor* = forróság, *dolor* = fájdalom és *functio laesa* = funkciózavar) mikrokeringési szintű változások állnak.

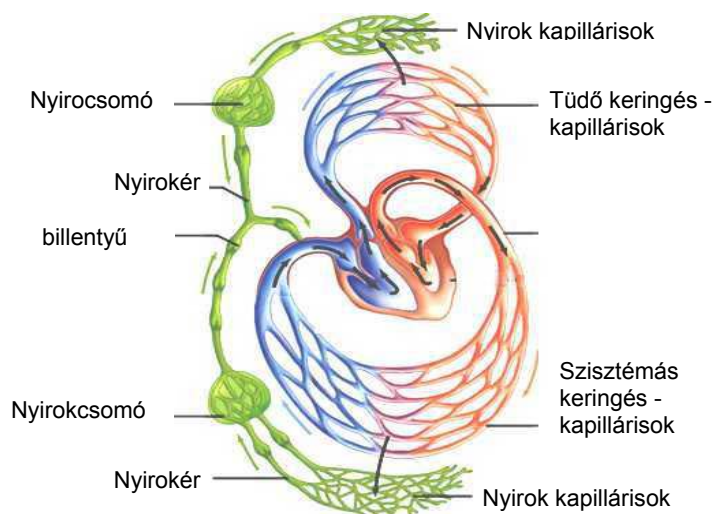
A mikrokeringési elégtelenség kimutatása a terápiás stratégia kialakítása és a kezelés hatásosságának megállapítása szempontjából is igen fontos, de ma még nagyon kevés eszközös lehetőség áll az orvoslás rendelkezésére. Az állatkísérletes modellekben kialakított és továbbfejlesztett eszközök (mint pl. intravitális mikroszkópia; ld. alább) már bizonyos lehetőséget biztosítanak a humán klinikai vizsgálati lehetőségek kidolgozására is. Ezek az eszközök mindössze néhány évtized óta állnak rendelkezésre, de megjelenésükkel máris rohamos fejlődés bontakozott ki a mikrokeringési zavarok és gyulladásos reakciók kórtanának megismerése terén is.

Ma még nem jósolható meg, hogy a jövőben milyen módszerek fogják megmenteni a lecsökkent vagy megszűnő agyi vagy vékonybél mikrokeringést. Fontos tudni, hogy e kórképek pathomechanizmusának vizsgálatára jelenleg kizárólag állati modellek használhatók, vagyis (ezúttal is) az alap kutatásoknak kell olyan eredményeket elérni, melyeket az alkalmazott kutatás és a klinikum felhasználhat. Mindez jórészt annak köszönhető, hogy a rácsálókban szerzett ismeretek adaptálhatók a humán viszonyokra. Az állati és az emberi gyulladásos mediátorok nagy homológiát mutatnak, így az állatkísérletes vizsgálatoknak döntő szerepük van a klinikai gyakorlatban bevezetésre szánt kezelések hatékonyságának meghatározásában.

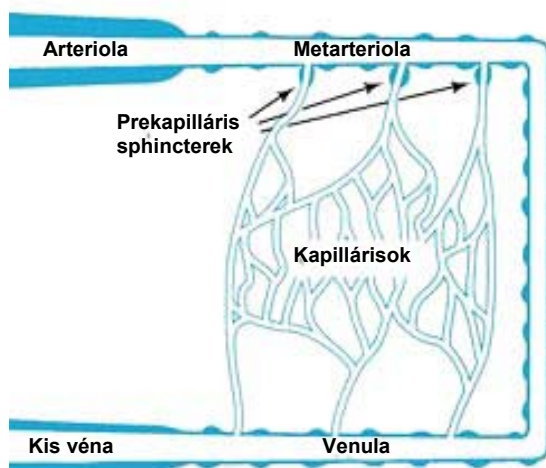
Az mikrokeringési vizsgálatokat a legtöbb esetben invazív, sebészi vagy mikrosebészi beavatkozás előzi meg (pl. akut vagy krónikus bőr, mellkasi vagy koponya „ablakok” – *skinfold chamber*, *cranial window* technika, stb.). A technikák leírása meghaladná e jegyzet kereteit; ezeket a részleteket a tárgykörrel foglalkozó közlemények és szakkönyvek általában részletesen tárgyalják.

### 2. A mikrokeringés funkcionális anatómiája, jellegzetességei

A mikrokeringés fő komponensei a prekapilláris sphincterek, a metarteriolák - “preferenciális csatornák”, kis “igazi kapillárisok” és a posztkapilláris venulák (ld. **18-19. ábra**).



**18. ábra** A szisztémás keringés és a mikrokeringés sematikus rajza



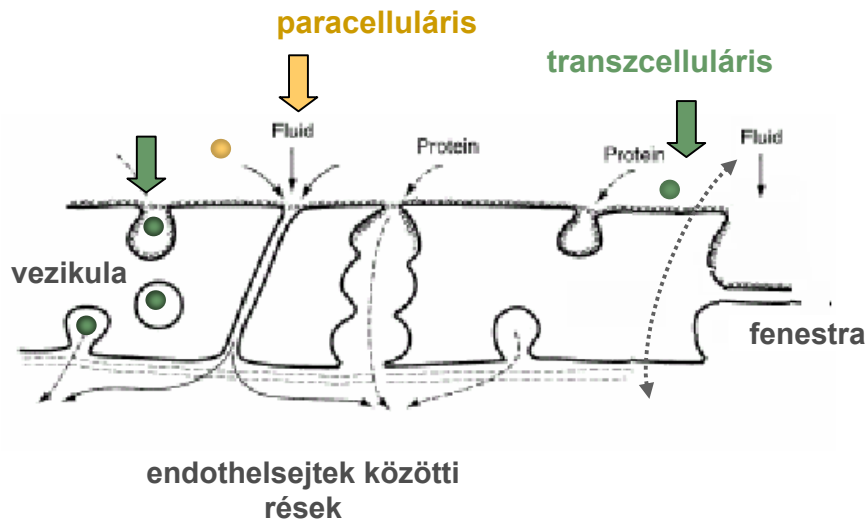
**19. ábra** A mikrokeringés sematikus ábrázolása

A mikrokeringés jellegzetességei:

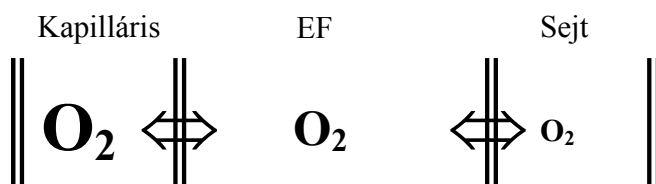
- 1 A nyomás progresszíven csökken arterioláktól a venulák irányába.
- 2 Az arteriolákat simaizom veszi körül, amely a metarteriolákban folyamatossá válik és egy simaizom gyűrűben végződik a prekapilláris sphincterekben. A perfundált kapillárisok területét a prekapilláris sphincterek szabályozzák, ezek nyílása növeli a perfundált kapillárisok számát.
- 3 A kapillárisok egyetlen réteg endothelsejtéből állnak, melyek kollagénből és mucopolysaccharidból felépülő bazális membránon helyezkednek el és ezeket periciták veszik körül. Mindössze ~ 30%-50%-uk van normál állapotban nyitva.

A kapillárisok funkciója az ereken keresztül történő tápanyag és salakanyag csere. A kapilláris hálózat rendkívül sűrű, hiszen a sejtek maximális távolsága a kapilláristól kisebb, mint 3-4 sejtnyi, azaz kisebb, mint 100  $\mu\text{m}$ . A kapillárisok fala rendkívül vékony, ezért hatalmas felszín : térfogat arányt képviselnek és ez a vékony diffúziós barrier kiváló lehetőséget biztosít a tápanyagok (és oxigén) és a salakanyagok (és  $\text{CO}_2$ ) cseréjének (**20-21. ábra**). A kapillárisok sűrűsége szervenként eltér, a tüdő kapilláris denzitása kb. 35-ször nagyobb, mint a vázizomé. A prekapilláris sphincter nyitása csökkenti a sejtnek kapilláristól való távolságát. A kapillárisok átmérője ugyanakkor nagyon kicsi, mindössze annyira nagy, hogy a vörösvérsejtek átréselődjenek rajta, a fehérvérsejtek pedig néha el is akadhatnak ezekben. A transsendotheliális transzport függ a diffúziós grádiénstól és a Starling erőktől (**22. ábra**). Az

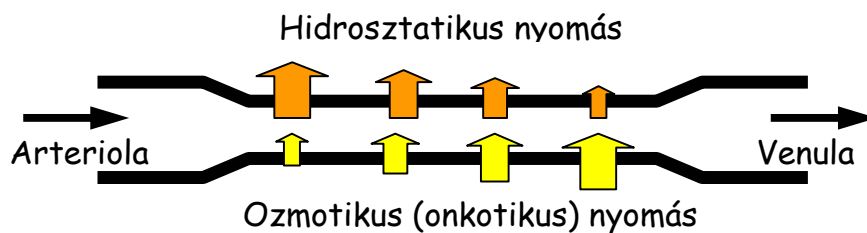
utóbbiak a kapilláris hidrosztatikus nyomás vs interstitialis hidrosztatikus nyomás és a plazma ozmotikus nyomás vs interstitialis ozmotikus nyomás függvényei. A fenti hatásokra összesen ~20 liter folyadék kerül ki naponta és ~16 liter kerül vissza a nyirokkeringés révén. Ödéma akkor keletkezik, ha a filtráció meghaladja a nyirokkeringés kapacitását.



**20. ábra** A transendotheliális transzport

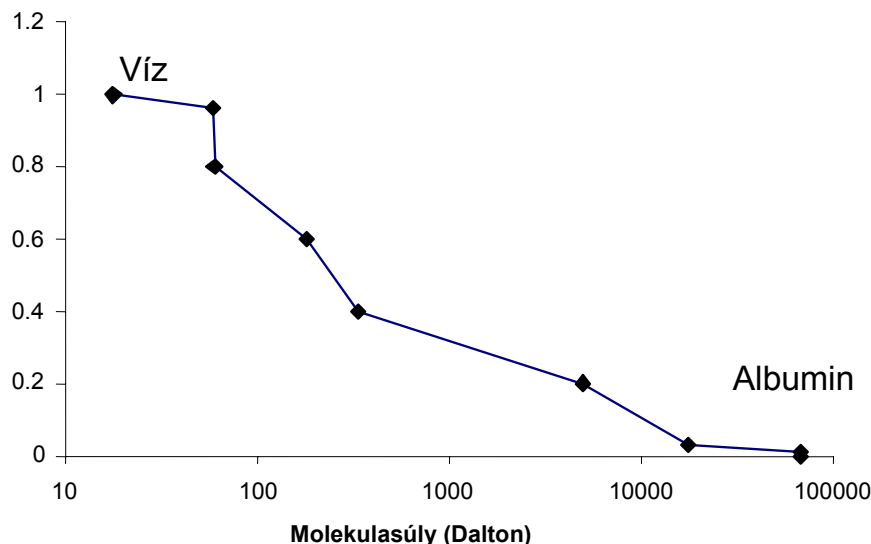


**21. ábra** Az oxigén koncentrációja csökken a kapilláristól az extracelluláris folyadékon (EF) át a sejtek irányában.



**22. ábra** A hidrosztatikus és onkotikus nyomás változása a kapillárisok mentén

Permeabilitás (a vízhez képest)



**23. ábra** Diffúzió a kapilláris membránon keresztül

A kapilláris membrán permeabilitása logaritmikusan csökken az anyag méretével. Ezért a mikrovaszkuláris permeabilitás vizsgálatoknál nagy molekula súlyú (az albuminnál nagyobb) anyagok nem jutnak ki a kapilláris membránon (23. ábra). Kis méretű anyagok koncentrációja viszont gyorsan kiegyenlítődik az extra- és intravaszkuláris tér között, ezért ezek nem használhatók mikrovaszkuláris permeabilitás vizsgálatra.

### 3. Az akut gyulladás mikrokeringési vonatkozásai

A gyulladás valamilyen károsodás, károsító tényező (kémiai ágens, hideg, meleg, trauma, kórokozók, stb.) által kiváltott élettani válasz, amely a károsító ágens felhígulásához vagy teljes eliminálásához vezet. A normál állapot visszaállítására irányul, védő hatású, de potenciálisan káros következményekkel jár. A mikrokeringés szoros kapcsolatban áll a gyulladásos és immunválasszal. Az immunválasz egy behatoló (testidegen objektum) felismerésére, jelzésére és elpusztítására irányul (szükség van a "saját" és "idegen" felismerésére és elkülönítésére). A limfociták rendelkeznek az idegen anyagok, behatoló patogének felszínén található receptorok (antigének), vírus által megtámadott sejtek és tumorsejtek felismerésének képességével. A nyirokcsomók a nyirok filtrálása révén elősegítik az antigének találkozását a limfocitákkal, a mobilis sejtek (pl. a polimorf magvú leukociták (PMN) és makrofágok) bekebelezhetik a mikroorganizmusokat és a testidegen anyagokat.

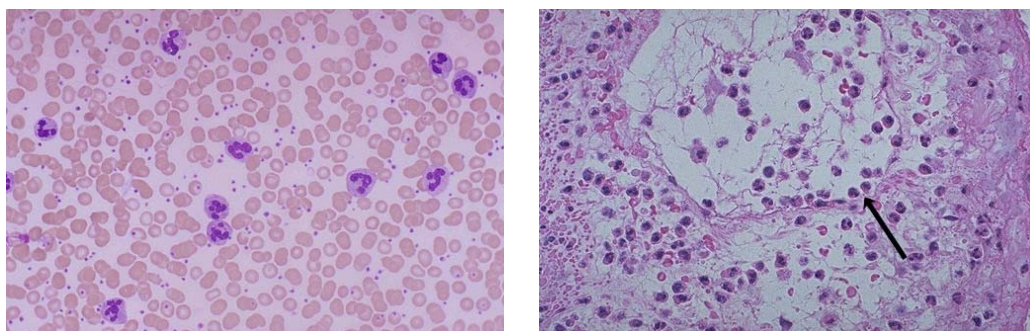


Az akut gyulladás mikrokeringési vonatkozásai:

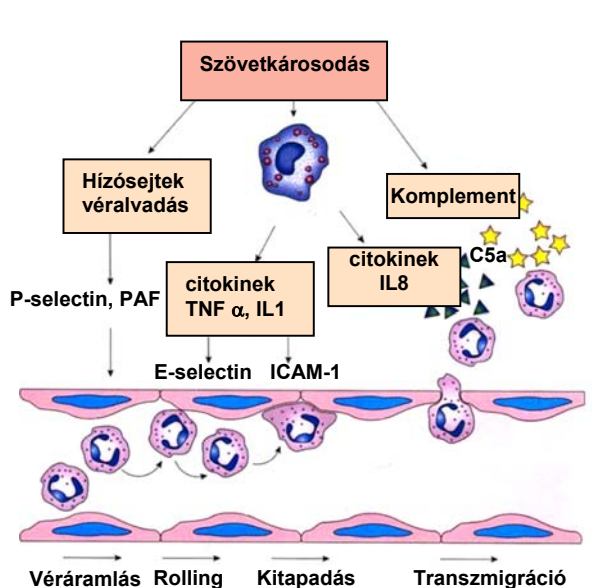
- Az érátérő változások (vazodilatáció) megnövekedett véráramlást (*rubor, tumor*) okoznak.
- A megnövekedett permeabilitás miatt rések keletkeznek (1) az endothel sejtek myosin tartalmának összehúzódása és következményes rövidülése miatt, (2) direkt endothelsejt nekrózis és (3) az éretlen endothelsejtek folyadék átérésztése következtében. A

permeabilitás fokozódása a fehérjében dús exsudatum és sejtek elemek extracelluláris részbe történő kijutását okozza. A szivárgás általában 20-60  $\mu\text{m}$ -es méretű venulákra korlátozódik és endotheliális rések következtében jön létre egy azonnali, átmeneti (kb. 30 perces) reakció során.

- A PMN-ek kijutása a mikrokeringésből a fokozott leukocita rolling, kitapadás és migráció révén. A fehérvérsejtek szöveti akkumulációja hozzájárul a károsító ágens elleni küzdelemhez (**24. ábra**). Kémiai ágenseknek a leukociták specifikus receptorokhoz való kötődése számos reakciót indul el, köztük azok chemotaxisát. Ennek eredményeként a leukocita – endothelsejt interakciók fokozódnak (**25. ábra**).



**24. ábra** Leukociták a vérben és a szöveti migrációt követően

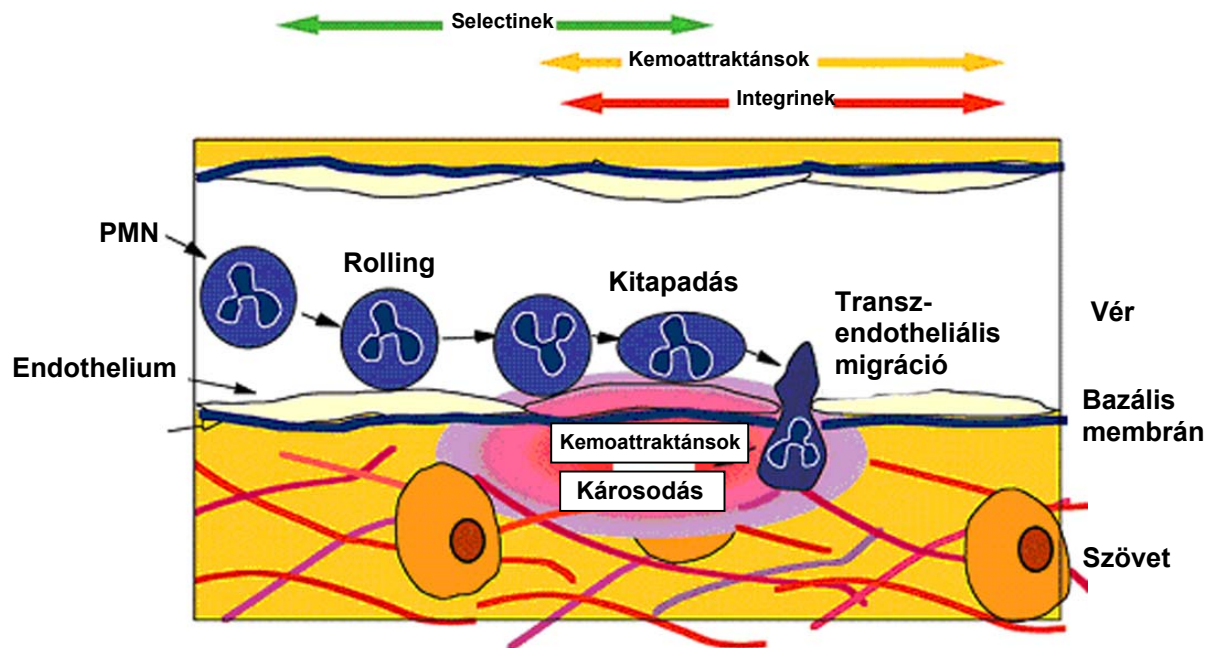


**25. ábra** A leukocita – endothelsejt interakció mechanizmusa

### 3.1. Leukocita aktiváció és transzmigráció

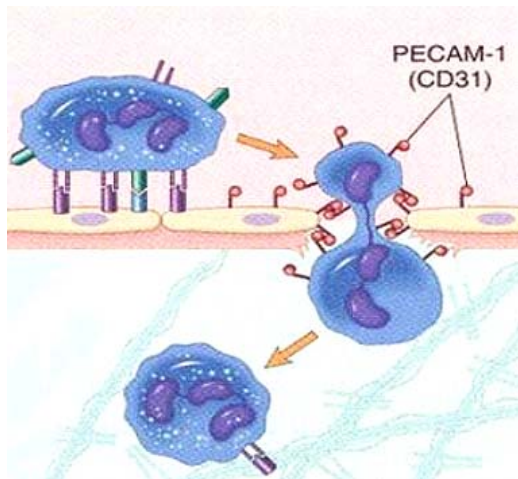
Ahhoz, hogy a PMN-ek el tudják hagyni az ér lumenét, az endothelsejtek és a PMN-ek adhéziós molekulái expressziójának egyidejűleg fokozódnia kell. A PMN rollingért feltehetően elsősorban a selectinek, az endothelium felszínén való kitapadásukért az integrinek felelősek (**26. ábra**).





**26. ábra** A leukociták rollingjában, kitapadásában és transzmigrációjában szerepet játszó fő adhézións molekulák.

A kitapadást követően a PMN-ek az endothelsejt felszínén még addig mozognak, míg az endothelsejtek közötti résekbe cytoplazmatikus nyúlványokat, ún. pseudopodiumokat nem bocsátanak. Ezeket a réseket részben a felszabaduló hisztamin, részben a PMN-ek saját enzimei hozzák létre. A PECAM nevű adhézións molekula felelős részben a transzmigrációért. Végül a teljes sejt átjut a bazális membránon is, melynek lebontása kollagenáz enzim révén valósul meg (27. ábra).



**27. ábra** A leukocyták transzmigrációja az endotheliumon.

**11. Táblázat** Az adhézións molekulák néhány jelenleg ismert csoportja, amelyek szerepet játszanak a leukocita migráció egyes fázisaiban.

| Fázis              | Endotheliális ligand                                                                                                   | Leukocita ligand                                                                                              |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rolling            | Selectinek/ <i>ligandok</i><br>E-selectin (endothelium)<br>P-selectin (endothelium & vérlemezke)<br><i>GlyCAM-1</i>    | Selectinek/ <i>ligandok</i><br>+ “ <i>ESL-1</i> ”<br>+ “ <i>PSGL-1</i> ”<br>+ L-selectin                      |
| Adhézió (sticking) | Immunoglobulin family<br>VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1)<br>ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1)<br>ICAM-1 | Integrinek<br>+ VLA-4 = $\beta$ 1 integrin<br>+ LFA1 (CD11a/CD18)<br>+ MAC1 (CD11b/CD18) = $\beta$ 2 integrin |
| Transzmigráció     | endothelialis PECAM-1<br>(“platelet-endothelial adhesion molecule” = CD31)                                             | leukocita PECAM-1<br>(“platelet-endothelial adhesion molecule” = CD31)                                        |

### 3.2. A PMN „killing” mechanizmus

Az aktiváció egyes fázisai a következők:

- Felismerés és kapcsolódás.
- Bekebelezés és feloldás (phagocytosis és lysocytosis révén).
- A „killing” és az eliminálás főként oxigén szabadgyökök vagy halogénálás révén valósul meg. A neutrofiloknak ugyanis vannak oxidatív és nem oxidatív „killing” mechanizmusai egyaránt:
  - NADPH oxidase rendszer, egy membránhoz kapcsolt enzim, mely redukálja az  $O_2$ -t szuperoxid anionná ( $O_2^-$ ), hidrogén peroxiddá ( $H_2O_2$ ), és hidroxil gyökké ( $OH^\cdot$ ) = „*oxidative burst*”.
  - Bacteriocidális és sejt degradációt okozó lizoszómális granulumok (*azurophil-* és ún. *specifikus* granulumok) melyek egybeolvadnak a phagosomával phago-lysosomát hozva létre.
  - $H_2O_2$ -MPO-halid rendszer, mely a leghatásosabb bacteriocidális rendszer.

## 4. A mikrokeringés kísérletes vizsgálata

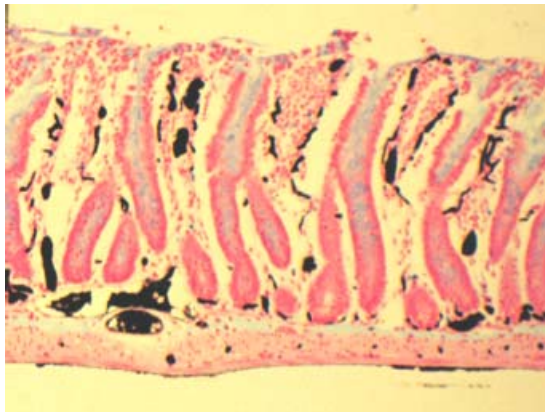
### 4.1. Strukturális – statikus módszerek

#### 4.1.1. Fénymikroszkópos módszerek



Állati mikrokeringési modellekben használható a tus feltöltés (India ink, természetes tinta). Intravénás alkalmazás után a vizsgált szövetet fixálják, paraffinba ágyazzák, majd megfestik (pl. hematoxin-eozinnal). A módszer célja a mikrokeringés és a perfúzió effektivitásának vizualizálása és az endothelium folytonosság megszakadásának kimutatása. A mikrovaszkuláris károsodásra utal a tus szivárgás a kapillárisokból – fekete foltok látszanak a szövettani metszeten, vagy a nem perfundált területek kimutathatók (**28. ábra**). Hátránya hogy statikus, egyetlen időpillanatot demonstráló metszetek készülnek, és ismételt injekcióra és felvételek készítésére van szükség, ha időbeli változásokat szeretnénk követni.

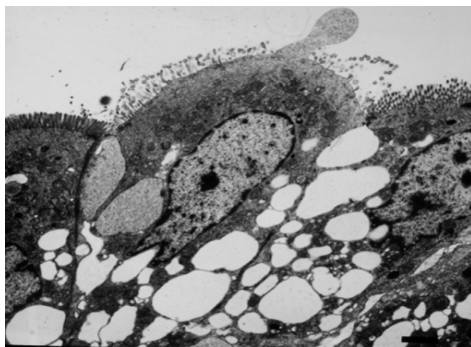




**28. ábra** A mikrovaszkuláris struktúra és a vérellátás károsodása patkány vékonybélben érelzáródás hatására (India ink foltok jelzik a kapillárisokat és a károsodást)

#### 4.1.2. Elektronmikroszkópia

A mikrokeringés különböző sejtes struktúráinak károsodásának kimutatására használható (29. ábra). Hátránya hogy statikus, több sejt, vagy nagyobb szöveti egység károsodásának kimutatására, a sejtek közötti kapcsolatok változásainak jellemzésére kevésbé alkalmas.

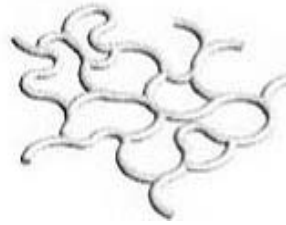
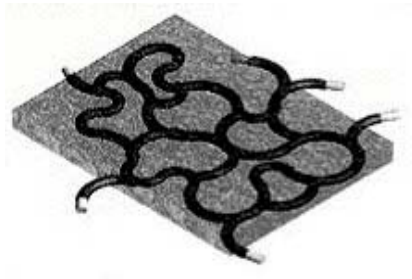


**29. ábra** Mikrokeringési zavar által kiváltott sejtkárosodás kimutatása elektronmikroszkóppal.

#### 4.1.3. „Corrosion casting” (scanning elektronmikroszkópiával)<sup>44</sup>

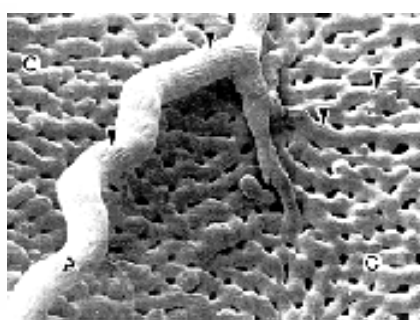
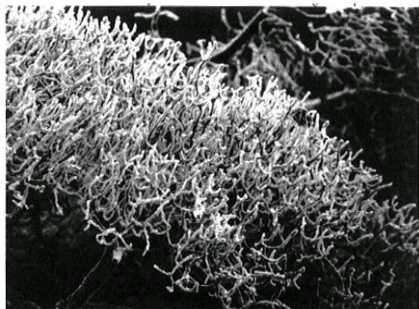
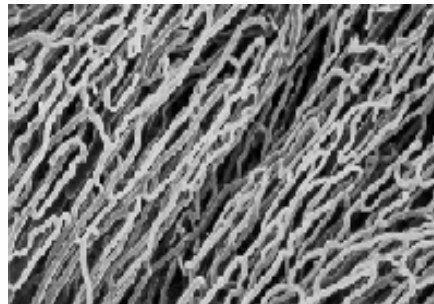
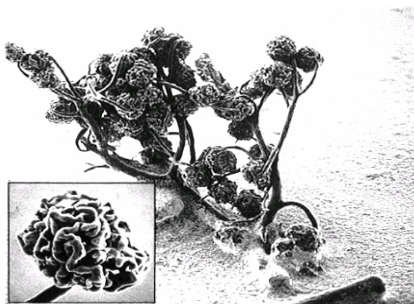


A „korróziós öntvény” technikával a vizsgálni kívánt szervből a vért eltávolítjuk (kannülálást követően átöblítjük, perfundáljuk), majd szövettani fixáló oldattal mossuk át az érrendszert. Ezután nagyon híg, de gyorsan szilárduló anyaggal (pl. methacrylate gyantával) töltjük fel a szervet, egészen a kapillárisokig eljuttatva. A gyanta tökéletes megszilárdulása után a szövetet koncentrált lúgba (KOH vagy NaOH) helyezzük, mely a szerves anyagokat teljesen feloldja és csak a megkeményedett öntvény (*corrosion cast*) marad vissza (30a ábra). Ezeket az öntvényeket metszés után pl. scanning elektronmikroszkóppal vizsgálhatjuk tovább. A módszer célja a szöveti érszerkezet kirajzolása. Hátránya hogy statikus, egyetlen időpillanatot reprezentál (30b ábra).



Érrendszer egy szöveten belül. A műanyag öntvény a szövet  
Injektált műanyag gyanta feloldását követően

**30a. ábra** Érhálózat a műgyanta injektálásakor és a szövet feloldását követően.



**30b. ábra** A vese (bal felső), vese glomerulusok (bal középső), a gyomor (bal alsó), a szív (jobb felső) és a szemfenék (jobb alsó) kapillárisainak corrosion casting képe.

## 4.2. Funkcionális, *in vivo* módszerek

#### 4.2.1. Mikrogyöngy technika



Mikro- vagy nanométer méretű partikulumokat intravénásan injektálunk, majd ezek gyors eloszlását követően egy kiválasztott szervben vizsgáljuk a dúsulást. A jelzéstől függően a részecskék eloszlását szövettani struktúrák, szöveti rétegek vagy szervek között tudjuk vizsgálni. A test egyes régiói elkülönítve is vizsgálhatóak.

- **Izotóppal jelzett mikrogyöngyök**<sup>45</sup>

- Kimutatás szövetből *in vivo*: gamma kamera segítségével vizsgálhatjuk az izotóp dúsulását a vizsgált szerv vagy szövet felett. Ha különböző izotópokat különböző időpontokban adunk, a szöveti perfúzió időbeli változásai is detektálhatóvá válnak.
- Meghatározás szövetmintából: szövetmintákat több szervből vehetünk (általában a kísérletek végén, ritkábban időközi szöveti biopsziából) és ezek radioaktivitása a szöveti perfúzióval lesz arányos. Különböző szervek perfúziójának aránya is számítható.
- Meghatározás vérmintából: a szövetmintákból való meghatározással párhuzamosan, vagy azoktól függetlenül egyaránt lehetséges. Ezek a minták a vizsgált szerv előtti és utáni mintavételek révén az adott szerv perfúziójára engednek következtetni (gamma szcintillációs számláló segítségével).

- **Színes mikrogyöngyök**

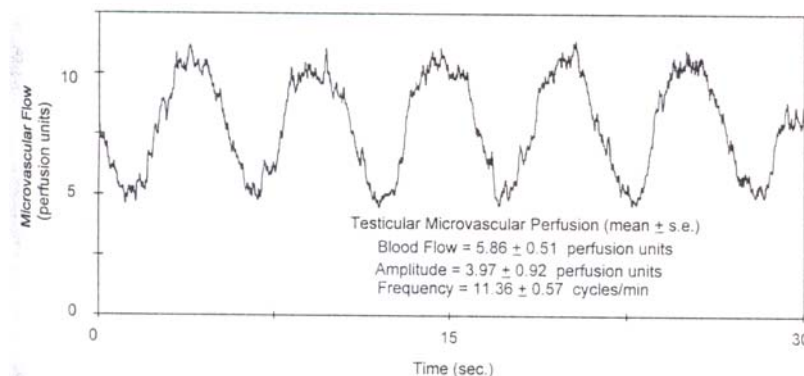
Különböző színnel jelzett partikulumok injektálhatók, a meghatározás történhet:

- szövetmintából (vagy biopsziából): kolorimetrikus/fotometriás méréssel
- szerv előtti és utáni minták koncentrációja hasonlítható össze.

Mivel különböző időpontokban különböző színű gyöngyök beadására is van lehetőség, a szöveti perfúzió időbeli változásai is detektálhatóvá válnak. Előnyök: funkcionális és dinamikus mérési lehetőség. Limitációk: egy- vagy néhány időpillanatról adnak információt (és az izotópok alkalmazása veszélyes).

#### 4.2.2. Laser-Doppler véráramlás mérés<sup>46</sup>

Előnyök: dinamikus, bármely időpillanatban korlátlanul megismételhető, humán körülmények között is alkalmazható. Limitáció, hogy a szervek felső vékony rétege vizsgálatára alkalmas és hogy a mikrokeringés különböző struktúráinak (arteriolák/venulák/kapillárisok) paraméter változása egyedi módon nem detektálhatók (csak nagyobb szövetmasszából származó jelek állnak rendelkezésre) (31. ábra). A működés elvét lásd a megfelelő tankönyvekben.



31. ábra A here laser-Doppler áramlásgörbéje

## 5. A mikrokeringés direkt vizsgálata: az intravitális mikroszkóp<sup>47</sup>



Ez a módszer lehetőséget ad a mikrokeringés dinamikus, *in vivo* megfigyelésére a szövetek felső rétegében. A hagyományos szövettani vizsgálatokkal szemben a szövet nem áthaladó fénnyel (transzilluminációval) kerül vizsgálatra, hanem az ún. epi-illuminációs technikával. Ez azt jelenti, hogy a vizsgáló fény visszaverődik és a mikroszkóp fókuszának változtatásával a szövet különböző mélységben (általában 100-200  $\mu\text{m}$  mélységben) vizsgálható. A mikroszkóphoz egy kamera és képrögzítő rendszer tartozik, amely a mikrokeringés elvileg korlátlan idejű megfigyelését tenné lehetővé, az analízis pedig a videó-felvételekről *off-line*, számítógép segítségével történik.

### 5.1. Klasszikus fluoreszcens intravitális videó-mikroszkópia (IVM)

A szövetek megvilágítása higanygőz lámával történik, a mikroszkópból távozó vagy a mikroszkópba érkező jelek szűrése különböző hullámhosszra specifikus filterek segítségével történik. Ezek a jelek a mikrokeringés különböző módon jelzett struktúráiról (vörösvérsejt, leukocita, plazma) egymástól elkülönítve gyűjthetők be, különböző fluoreszcens filterek révén.

*Vörösvérsejt jelzése:* az állatoktól levett vért fluoreszcens molekulák (Na-fluorescein) jelenlétében inkubáljuk, mossuk, majd intravénásan beadjuk egy másik állatnak (a beltenyésztett rágsálóknak nincsenek eltérő vércsoportjai). A szignál világos folt lesz a képernyőn, amely az érrendszerben együtt áramlik a vörösvérsejtekkel (32. ábra).

*Plazma jelzése:* nagy molekulatömegű (általában az albuminnál nagyobb) fluoreszcens markerek segítségével lehetséges, melyek nem hagyják el az érpályát. Ebben az esetben a plazma világosan kirajzolja minden érstruktúra kontúrját, melyben a sejtes elemek sötét foltokként mozognak.

*Fehérvérsejtek jelzése:* ezek a sejtek könnyen megjelölhetők egy fluoreszcens vegyi anyag, a rhodamin egyszeri intravénás beadásával. Ezt a leukociták gyorsan felveszik (a mitokondriumokhoz kapcsolódik).

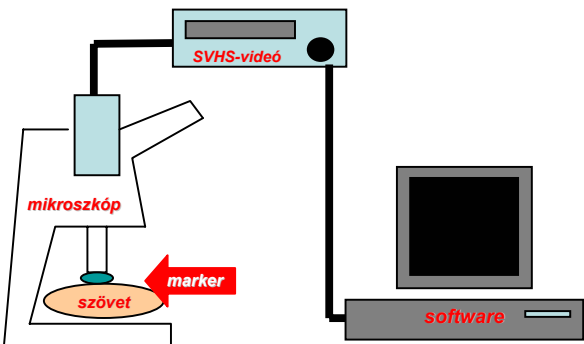
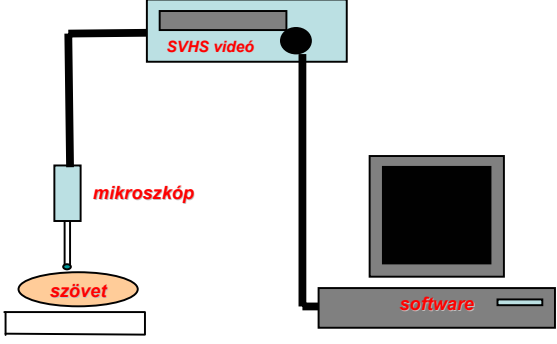
### 5.2. Orthogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotás<sup>48, 49</sup>

Humán körülmények között a mikrokeringés direkt megfigyelésével kapcsolatos problémák a fluoreszcens jelzés szükségességéből és az eszközök méretéből adódnak. Az OPS technika olyan intravitális mikroszkópiás lehetőség, mely nem a fluoreszcens markerek, hanem polarizált fény alkalmazásán alapul. A másik fontos előnye az eszköz méretéből adódik, mely alkalmassá teszi az emberi műtétek alatti használatra is. Az OPS technika 548 nm-es fényt alkalmaz (mely megfelel a hemoglobin és oxihemoglobin spektrum izobesztikus pontjának), így alkalmas minden hemoglobin tartalmú struktúra (azaz ér) vizualizálására. A kamerához egy videó felvevő kapcsolódik és a kiértékelés az IVM-hez hasonlóan történik (12. Táblázat).

**12. Táblázat** Két intravitális videó-mikroszkópos módszer összehasonlítása



| Fluoreszcens IVM                  | OPS képalkotás             |
|-----------------------------------|----------------------------|
| <i>In vivo</i> , dinamikus        | <i>In vivo</i> , dinamikus |
| Fluoreszcens markerekkel történik | Polarizált fény            |

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Felszíni szövetrétegek analizésére                                                                                                                                      | Felszíni szövetrétegek analizésére                                                                                                                                        |
| Fluoreszcens jelölések: leukocita: rhodamine 6G, vvt: FITC (fluoreszcein izotiocianát), plazma: FITC-albumin, FITC-dextrán, etc.                                        | Nincs festés: hemoglobin tartalmú struktúrák vizsgálata                                                                                                                   |
| Leukocita-endothel interakciók vizsgálata is                                                                                                                            | Leukocita-endothel interakciók vizsgálatára nem alkalmas                                                                                                                  |
| Videó felvételek, <i>off line</i> analízis                                                                                                                              | Videó felvételek, <i>off line</i> analízis                                                                                                                                |
| <br> | <br> |
| Humán körülmények között nem alkalmazható                                                                                                                               | Humán körülmények között alkalmazható                                                                                                                                     |

### 5.3. Mikrokeringési paraméterek intravitális mikroszkópiával



#### 1. Perfúzió

- áramlási sebesség („red blood cell velocity”; RBCV; egysége:  $\mu\text{m/s}$ )
- véráramlási mintázat változások (térbeli és időbeli heterogenitást mutathatnak)
- kapilláris perfúzió változások („functional capillary density”; FCD:”; átjárt kapilláris hossz/terület, egysége: 1/mm)

#### 2. Leukocita–endotheliális interakciók

A gyulladásos reakciókat mutató sejtek számszerűsítése:

- „free flowing” sejtek (a vizsgált érszakaszon szabadon áthaladó, interakciókat nem mutató sejtek; számszerűsítés: %-ban kifejezve)
- „rolling” (gördülő sejtek, az érre jellemző sebesség 30-40%-át meg nem haladó sejtek, melyek az endothelium felszínén gördülést mutatnak, számszerűsítés: %-ban kifejezve vagy db sejt/érkeresztmetszet)



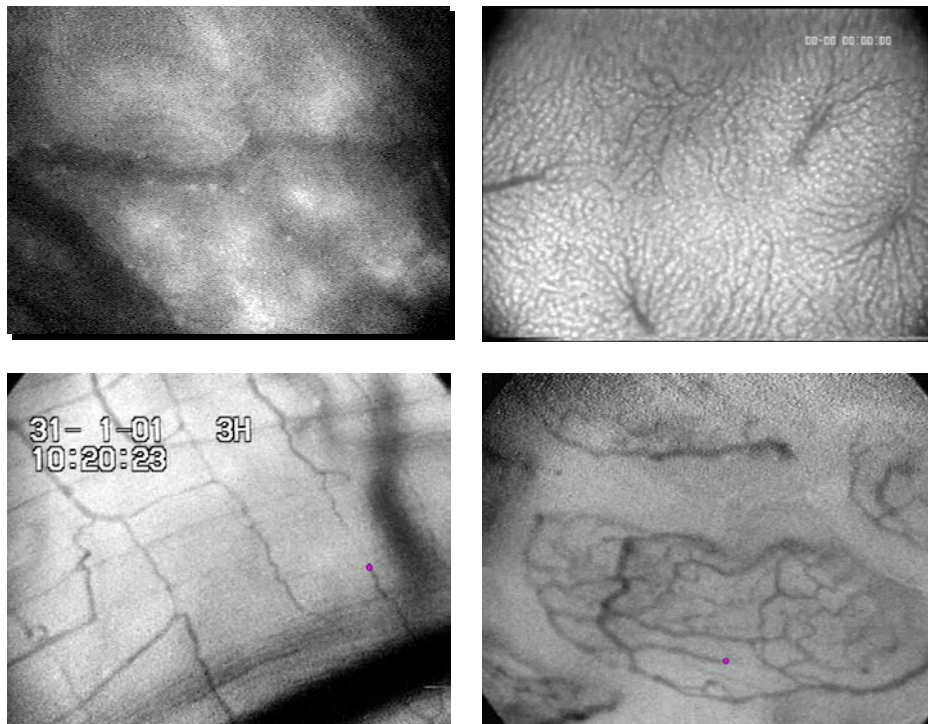
- „sticking” (kitapadó sejtek, melyek az endothel felszínén helyezkednek el minimum 30 sec-ig, %-ban kifejezve vagy db sejt/érfelszín)

### 3. Mikrovaszkuláris permeabilitás

Az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer az intravénás FITC-albumin beadását követően a fény-intenzitás mérése és összehasonlítása intra- és extravaszkulárisan.

### 4. Érátmérő változások

A vazodilatátor és vazokonstriktor stimulusokra adott válaszok számszerűsíthetők.



**32. ábra** Fluoreszcens jelölés (bal felső: leukociták a venulákban; jobb felső: máj) és OPS intravitális mikroszkópikus képek (bal alsó: a vékonybél izomrétege, jobb alsó: bél villusok)

## 5.4. IVM-mel vizsgálható szövetek, szervek



Limitációt jelent a szövet vastagsága (csak a szövetek felszíni rétegéről szolgáltat információt, így a szövetvastagság nagymértékben befolyásolja az alkalmazhatóságát). Minden parenchymás szerv vizsgálható, hiszen ezekben a felszínen nyert információ jól reprezentálja a mélyebben levő változásokat is. Mivel a kisállatok pl. rágcsálók (egér, tengerimalac, patkány) nagyon vékony szövetekkel rendelkeznek, ezért főként ezen fajok egyedeinek vizsgálata a legelterjedtebb. Ha a vékonybelet vesszük alapul, a mikroszkóp fókuszának változtatásával először a subserosalis nyirokerek látszanak és a szövetek nem vizsgálhatók mélyebben (pl. kutyán), míg patkányon vagy egéren mélyebb rétegekig eljuthatunk (serosa, körkörös és hosszanti izom rétegek, akár a submucosalis erekig). Ha viszont a bélbolyhokat szeretnénk vizsgálni, a lumen antimesenterialis oldalon történő megnyitását követően a villusok a lumen

felől (kutyán vagy egéren egyformán) könnyen vizsgálhatóak. Ami viszont a bőrt illeti, még a patkányok sem alkalmasak, csak az egerek vékony epidermise esetén lehet a bőr alatti mikrokeringést vizsgálhatóvá tenni.

A szervek mozgása problémát okozhat (ideális esetben a nem mozgó szervek alkalmasabbak IVM vizsgálatokra, mint a mozgó, pulzáló vagy összehúzódók), éppen ezért a szív és tüdők csak ritkán célszervei ezeknek a vizsgálatoknak. Mivel a légzőmozgások a rekeszizmon keresztül a májra is áttérjednek, ez a szerv is csak speciális preparálás révén tehető alkalmassá az IVM-mel való vizsgálatokra (a máj bal lebenyének hátulsó felszínét vizsgáljuk, mely a szerv kiemelése és rotálása révén válik elérhetővé). IVM-mel leggyakrabban vizsgált szervek és szövetek az izom (váz, simaizom, szívizom), belek, csonthártya, máj, hasnyálmirigy, here, húgyhólyag, agy (ún. craniális ablakon keresztül) és a tüdő (ún. mellkasi ablakon keresztül, légzési szünetekben).

### 5.5. A mikrokeringési paraméterek kóros változásai



#### *Perfúzió*

- vörösvérsejt áramlási sebesség csökken (ritkán nő)
- funkcionális kapilláris denzitás csökken
- A mikrokeringés heterogenitása nő

*Leukocita–endotheliális interakciók:* szabadon áthaladó sejtek aránya csökken, a rollingot mutatók és kitapadók aránya nő.

*Mikrovaszkuláris permeabilitás:* fokozódik.

## **X. Állatkísérletes modellek és módszerek a légzéskutatásban (Dr. Adamicza Ágnes)**

Az asztma, a súlyos szepszist kísérő tüdőödéma, vagy az emphysema olyan emberi betegségek, kóros elváltozások, melyek egy egész szervrendszer – a légzőrendszer – teljes struktúráját és funkcióját érintik; s vizsgálatukra, a kórfolyamatok mechanizmusainak megértésére csaknem kizárólag *in vivo* modellek alkalmazhatók.

### **1. A légzés funkcionális vizsgálata**

A légzés funkcionális vizsgálatát, monitorozását az alábbiak szerint végezhetjük:

- Alap-monitorozás (megfigyelések)
- Hemodinamika (pulmonális keringés, nyomás, véráramlás vizsgálatok)
- Légzésmechanika (pletizmográfia, bronchiális provokációs teszt, kényszerített oszcilláció módszere)
- Légzési gázok nem-invazív (kapnometria, pulzoximetria) vagy invazív (vérgázanalízis) monitorozása
- Biokémiai analízisek (vér, tüdőszövet, bronchoalveoláris folyadék)
- Bronchoalveoláris lavage (BAL)
- Tüdőödéma meghatározása (gravimetriás analízis, permeabilitás vizsgálat, transthoracalis elektromos impedancia)

#### **1.1. Alap monitorozás**

Megfigyeljük a kísérleti állat légzőmozgását (típus, mélység, frekvencia), valamint, nagy állatmodellben, hallgatózással a tüdőben áramló levegő hangjelenségeit.

#### **1.2. Hemodinamika**

A pulmonális keringési állapotra az artéria pulmonalis nyomás és véráramlás mérésével következtetünk. A csak nagy állatmodellekben használt Swan-Ganz katéterrel mért paraméterek az a. pulmonalis nyomás, pulmonalis kapilláris éknyomás, pulmonalis vaszkuláris rezisztencia és a perctérfogat, valamint a kevert vénás vérben mért vérgáz paraméterek.

#### **1.3. Légzésmechanika**

A légzés során változik a nyomás, az áramlás és a térfogat a tüdőben. A légzésmechanika ezeknek a paramétereknek a mérésével, és a köztük lévő összefüggések vizsgálatával foglalkozik. Hagyományos légzésmechanikai paraméterek a légúti ellenállás, tüdő compliance, elaszticitás, pulmonális inflációs nyomás.

*Légúti ellenállás* ( $H_2Ocm/l/s$ ) a levegőáramlás során keletkező súrlódási erők által okozott, a levegő áramlásával szembeni ellenállás, mely a nyomás és az áramlás hányadosa. Az áramlás egyenesen arányos a nyomással, és fordítottan arányos az ellenállással. Az ellenállás a levegő molekulák egymás közti, és a levegő molekulák és a légutak fala közti súrlódásból származik. A nyomásmérés transducerrel (jelátalakító), az áramlásmérés pneumotachográfal történik.

*Tüdő compliance* ( $l/H_2Ocm$ ) a tüdőszövet tágulékonyságának a jellemzője, az egységnyi nyomásváltozásra bekövetkező térfogatváltozás mérőszáma. A compliance csökken tüdő fibrózisban (a tüdőszövet diffúz, kötőszövetes átalakulása; pl. fémpor, azbeszt expozíciója kezdetben gyulladásos folyamatot indukál, melyet hegesedés követ az intersticiumban – az alveolusok közti tér -, a tüdőszövet megvastagodik, és merevvé válik), légutak elzáródásakor vagy fokozott alveoláris felületi feszültség esetén, atelektáziában és tüdőödémában, ugyanakkor emphysemában nő.



*Elaszticitás* a tüdőszövet rugalmasságát jellemző tulajdonság, az a képesség, mely révén a tüdő igyekszik az eredeti formáját és nagyságát felvenni; fő meghatározója az alveolusokat körülvevő rostos-elasztikus hálózat.<sup>50</sup>

*Inflációs csúcsnyomás* az endotracheális vagy a tracheatubus végén mért belégzési nyomás legnagyobb értéke.

### 1.3.1. Pletizmográfia

A pletizmográf egy légmentesen lezárható kamra, mely a tüdőtérfogat és a légúti ellenállás nem-invazív meghatározására alkalmas mind a klinikumban, mind a kísérleti laboratóriumokban. A hozzá csatlakoztatott nyomásmérők és pneumotachográf segítségével nyomás és áramlási jeleket mérnek. Ezzel a módszerrel mérhető a funkcionális reziduális kapacitás (FRC, kilégzés-végi tüdő térfogat) és a teljes tüdő kapacitás (TLC). A kísérleti állat egy, a kamrából kivezető csövön/tracheatubus keresztül lélegzik. Légzés során a mellkas térfogata változik, így változik a kamranyomás is.

A tüdőtérfogat meghatározásának alapja a Boyle-Mariotte empirikus törvény, mely szerint, egy adott hőmérsékleten adott mennyiségű gáz térfogatának és nyomásának szorzata állandó:

$$PV = \text{állandó}$$

vagy, ha a gáz állapotváltozáson megy keresztül, akkor a két állapot közötti összefüggés:

$$PV = P'V'$$

ahol  $V'$  és  $V$  a végső és kezdeti térfogatok, a  $P'$  és  $P$  a végső és kezdeti nyomások.

### 1.3.2. Bronchiális provokáció

A bronchiális provokációs tesztet az asztma diagnosztizálásában használják. A tüdőben bekövetkező változásokat különböző bronchokonstriktor anyagokkal (acetilkolin, metakolin, hisztamin, vagy környezeti allergén) szembeni fokozott légúti reaktivitás mérésével határozzák meg. Az adott anyag különböző koncentrációját a légutakba juttatják aerosol formájában, mely hiperreaktív válaszreakciót okoz. A légzésfunkciós paramétereket a provokáció előtt és után regisztrálják, vagy kísérletes körülmények között a kényszerített oszcilláció módszerét alkalmazzák.

### 1.3.3. Kényszerített oszcilláció módszere

A kényszerített oszcilláció módszerével a tüdőszövet és a légutak mechanikai tulajdonságai szeparáltan, nem-invazív módon mérhetők.<sup>51</sup> Kis amplitúdójú, alacsony frekvenciájú (a fiziológiás frekvenciát is magában foglaló) kényszerrezgéseket számítógép-vezérelt hangszóróból a kilégzés végén a tracheába vezetnek, és mérik a tüdő bemenő impedanciáját. Az impedancia görbékhez történő modellillesztéssel határozzák meg a légutak (ellenállás) és a tüdőszövet (ellenállás, elaszticitás) mechanikáját jellemző paramétereket. A légutak és a tüdőszövet szeparált vizsgálatát a frekvenciafüggésük eltérő jellege teszi lehetővé.

## 1.4. Légzési gázok monitorozása

*Nem-invazív:* kapnometria/kapnográfia a kilégzett (kilégzés-végi)  $\text{CO}_2/\text{CO}_2$  nyomás görbét, és a légzési frekvenciát méri. Pulzoximetria az  $\text{O}_2$  szaturációt és a szívfrekvenciát méri (klinikumban használják).

*Invazív:* a vérgázanalízis célja a vérgáz státuszának ( $\text{O}_2$  felvétel,  $\text{CO}_2$  leadás, vér pH) megállapítása, a tüdő és a vese szerepének tisztázása a sav-bázis egyensúly fenntartásában. Az artériás kanulából, heparinizált fecskendőbe vett vérmintából speciális vérgázmérő készülék méri a vér  $\text{O}_2$  ( $\text{pO}_2$ ) és  $\text{CO}_2$  parciális nyomását ( $\text{pCO}_2$ ), és a pH-t, valamint kalkulálja az aktuális és standard bikarbonátot ( $\text{pCO}_2 = 40$  Hgmm-en), a bázis felesleget (azon sav vagy

bázis mennyisége, mely a normál pH-t állítja be; pozitív = alkalózis, negatív = acidózis), és az O<sub>2</sub> szaturációt (az O<sub>2</sub>-t megkötő hemoglobin százalékos aránya).

#### 1.4.1. A sav-bázis egyensúly

Normál vérgáz értékek: pO<sub>2</sub> 90-100 Hgmm, pCO<sub>2</sub> 36-44 Hgmm, pH 7,35-7,45, bikarbonát 22-26 mmol/l, bázis felesleg -2+2 mmol/l, O<sub>2</sub> szaturáció 96-100%.

Respirációs acidózis: emelkedett pCO<sub>2</sub>, csökkent pH (légúti obstrukció, ARDS vagy csökkent légzés).

Respirációs alkalózis: csökkent pCO<sub>2</sub>; pH nagyobb, mint 7,45 (hiperventilláció).

Metabolikus acidózis: bázis hiány; pH kisebb, mint 7,35; csökkent bikarbonát szint (gastrointesztinális betegségek).

Metabolikus alkalózis: bázis felesleg vagy savvesztés (pl. hányás).

### 1.5. Biokémiai analízisek

A tüdő funkció vizsgálata történhet vazo- és bronchoaktív mediátorok, enzimek (főleg neutrophil fehérvérsejtek által termelt proteázok és myeloperoxidáz), markerek (a tüdő sejtjeinek vagy szöveteinek a kóros állapotváltozását jelzik), proteinek, surfactant, és differenciált (pl. fehérvérsejtek, makrofágok) sejtszám meghatározásával a vérben, a tüdőszövetből vett biopsziában vagy a BAL-ban.

### 1.6. Bronchoalveoláris lavage

A BAL (vagy bronchoalveoláris lavage) egyszerű módszer a légzőrendszer betegségeinek (COPD-krónikus obstruktív tüdőbetegség, gyulladásos légúti kórképek) monitorozására és diagnosztizálására. A proximális légutakból, a kis disztális légutakból, és az alveolusokból is elvégezhető a mintavétel, mely kísérletes körülmények között egy vékony kanülnek a tracheatubuson keresztüli levezetésével történik. A mintavétel kis mennyiségű, testhőmérsékletű steril fiziológiás NaCl oldat befecskendezéséből és a folyadék visszaszívásából áll. Ez a művelet többször is ismételhető. Az első minta (bronchiális mosófolyadék) külön is analizálható, vagy a teljes visszanyert mintamennyiség kerül vizsgálatra. A BAL visszanyerése változó, rendszerint 30-50%-a a befecskendezett térfogatnak (COPD-ben kisebb). A BAL mintákból solubilis és sejtjes elemek vizsgálata történhet (mediátor/markert meghatározás, sejtszámlálás, sejtenyésztes). A BAL kis mértékű, átmeneti pO<sub>2</sub> csökkenést okoz.

### 1.7. A tüdő ödéma meghatározása

*Gravimetriás analízis.* Az állatokat túlaltatjuk, majd a tüdőszövetből mintát veszünk. A minta „nedves súlyának” lemérése (*wet weight* - WW) után a szövetet szárítóban súlyállandóságig szárítjuk, majd ismét lemérjük (*dry weight* - DW). A tüdőödéma paramétere a nedves és száraz súly aránya (WW/DW).

*Pulmonális kapilláris permeabilitás meghatározása.* Evans kék festék (EB) intravénás befecskendezését követően a festék a plazma fehérjéhez (albumin) kötődik. Megnövekedett érpermeabilitás esetén (ödéma) a keringésből plazmakiáramlás történik, melynek során a festék-fehérje komplex is a környező szövetekbe kerül. A kísérletek végén az állatokat túlaltatjuk, és a komplexet só perfúziójával kimossuk a tüdő erekből. A szövetből a festéket egy oldószer (formamid) segítségével extraháljuk, majd a festékkoncentrációt az extraktumból és a vérből spektrofotometriásan meghatározzuk. Permeabilitási index = EBSzövet / EBplazma.<sup>52</sup>

*Transthoracalis elektromos impedancia.* Elve: kis amplitúdójú, nagy frekvenciás áramot vezetve a mellkason és a nyakon elhelyezett elektródákra, a szív ciklus alatt a verőtér fogattal arányos impedancia (feszültség/áramerősség) változások mérhetők

(perctérfogatmérés). A mellkasban a nagy vezetőképességű vér, szív és nagy erek mellett nagy ellenállású szövetek (tüdő, izom, csont, zsír) is hozzájárulnak a mellkasi alapimpedancia ( $Z_0$ ) értékéhez. Bár a  $Z_0$  értéke nagy variabilitást mutat, de a változása jól jelzi a mellkasban bekövetkező folyadék és levegő térfogatváltozásokat. Így, mellkasi vérzés vagy tüdőödéma esetén a  $Z_0$  csökken, pneumothoraxban nő. Tehát, a  $Z_0$  folyamatos monitorozása mellkasműtött betegek posztoperatív szakaszában hasznos lehet a korai intrathoracalis folyadék és levegőtérfogatváltozás jelzésében, amikor még más paraméterek (hemodinamikai, vérgáz) nem változnak.<sup>53,54</sup>

## **2. A szabad légutak biztosítása, mesterséges lélegeztetés**

Itt az alábbi technikákat kell tárgyalni:

- Endotracheális intubáció
- Tracheostomia
- Thoracotomia
- Mesterséges lélegeztetés

### **2.1. Endotracheális intubáció**

Az endotracheális intubáció a szabad légút biztosításának legáltalánosabb és legbiztosabb módja, mely lehetővé teszi a légzőrendszer funkciójának folyamatos monitorozását (pl. a be- és kilégzett gázok összetételének mérése), légúti nyomásmérést, rövid idejű mesterséges lélegeztetést, a légúti váladék leszívását, a BAL-t, valamint gyógyszer beadását. Megfelelő méretű, plasztik, vagy gumi anyagú tubust (nagy állatok) vagy plasztik katétert (kis állatok) vezetünk a hanyatt fekvő, hátrahajtott fejű altatott állat tracheájába vagy valamelyik fő bronchusba, megfelelő feltárás mellett a szájon keresztül. Az intubáció nagy állatokon laringoszkóppal, kis állatokon csipesszel történő feltárás mellett történik. Egereken, a tracheának műtőlámpa segítségével történő, bőrön keresztüli megvilágítása megkönnyíti a művelet elvégzését. A tracheatubusok disztális végén felfújható mandzsetta biztosítja a veszteség nélküli légzést/lélegeztetést, valamint megakadályozza nyál vagy vér tüdőbe történő lejutását. A mandzsetta feszessége a tubus másik végén lévő kontroll ballonnal ellenőrizhető.

### **2.2. Tracheostomia**

A tracheostomia, altatásban végzett sebészi beavatkozás, melynek során (általában plasztik) tubust (nagy állatok) vagy plasztik katétert (kis állatok) vezetünk egy nyíláson keresztül a tracheába. Akkor van rá szükség, amikor az endotracheális intubáció nem végezhető el, vagy a szabad légutak biztosítására hosszabb ideig van szükség (tartós mesterséges lélegeztetés, légzésmechanikai mérések). A tracheostomia technikája, lépései röviden az alábbiak:

1. az altatott állatot hanyatt fektetjük,
2. a nyak bőrét lemossuk, fertőtlenítjük,
3. a pajzsporc és gyűrűporc alatti első és második tracheaporc között szikével haránt irányban bőrmetszést végzünk,
4. a nyakizmokat középvonalban tompán szétválasztjuk,
5. T-alakú metszést (stoma) végzünk: az első és második tracheaporc között a tracheát átvágjuk, majd a második (vagy a harmadik) tracheaporcot középvonalban lefelé bemetszük,
6. nagy állatoknál a porc csücskeibe egy-egy atraumatikus öltést helyezünk be a feltárás megkönnyítésére (kis állatoknál a trachea alá fonalat vezetünk, ennek megemelése elegendő feltárást biztosít a tracheakanül bevezetéséhez),
7. a tubus bevezetése után a betétet eltávolítjuk, a mandzsettát felfújjuk,
8. a tartóöltéseket megcsomózzuk,

9. a bőrt mindkét oldalon zárjuk.

### **2.3. Thoracotomia**

Thoracotomia a mellkas sebészi úton, mesterséges lélegeztetés alatt történő megnyitása, mely lehetővé teszi közvetlenül a tüdő felszínén végzett beavatkozások/mérések elvégzését. Kísérleti körülmények között a mellkas megnyitása általában a mellkasfalán keresztül történik, nagy állatoknál egyik oldali bordarezekcióval, vagy a bordák széles feltárásával, kis állatoknál (patkány, egér) a sternum középvonalában történő hosszanti metszéssel (gyors, kicsi a vérveszteség).

### **2.4. Mesterséges lélegeztetés**

Mesterséges lélegeztetés során respirátor segítségével juttatjuk a levegőt a tüdőbe (pozitív nyomású lélegeztetés). A lélegeztetés célja az oxigenizáció növelése, az optimális ventiláció biztosítása, az atelektázia (alveolusok kollapszusa, összeesése, mely csökkent alveoláris ventilációból vagy az alveolusok elzáródásából ered) megszüntetése. Mesterséges lélegeztetés alkalmazása elengedhetetlen azokban az esetekben, amikor az állat spontán légzése gátolt (izomrelaxáns) vagy a mellkas megnyitására (thoracotomia) van szükség. A térfogat-vezérelt készülékekben a belégzés addig tart, amíg a beállított levegőtérfogat (légzési térfogat) a tüdőbe kerül, míg a nyomás-vezérelt respirátorokban a beállított nyomás eléréséig. Az előbbieken beállítható még a légzési frekvencia vagy a percventilláció, és túlnyomásos szelep akadályozza meg a kóros nyomás kialakulását. Lélegeztetés során, ha a kilégzés néhány vízcmm-es nyomással (PEEP-positív kilégzés-végi nyomás) szemben történik, akkor az alveolusok megtelnek levegővel, javul az oxigenizáció, és nő a kilégzés-végi tüdő térfogat. Thoracotomia alatt, illetve nyitott mellkasú állatokon végzett kísérletekben elengedhetetlen a PEEP alkalmazása, mely javítja a gázcserét, kinyílnak az alsó tüdőterületekben lévő, a hanyattfekvés miatt elzáródott kis légutak, ezáltal biztosított a belégzett levegő homogén eloszlása.

## **3. A tüdő morfológiai vizsgálata**

Az alveoláris struktúrát kapilláris endothelium, alveo-kapilláris membrán (0,5  $\mu$  vastag; gázcsere), az epithelium I. típusú epitheliális sejtjei (lapos sejtek), és II. típusú epitheliális sejtek (kocka alakú pneumociták, mikrovillusokkal, a citoplazmában szekréciós szemcsék-surfactant szintézis) alkotják. Az alveoláris felszín 80-90%-át kapillárisok veszik körül. Az alveolusok falát vékony filmréteg, a surfactant borítja, mely a II. típusú epitheliális sejtek granulumaiban termelődik, és a tüdő humorális és celluláris védelmi rendszerének a része. A surfactant egy felület-aktív lipoprotein komplex, mely csökkenti a felületi feszültséget, növeli a compliancet (megkönnyíti a tüdő belégzését), fenntartja az alveolusok mechanikai stabilitását és megakadályozza, hogy a kilégzés végén összeessenek, biztosítja az optimális gázcserét. Az extracelluláris mátrix részei fehérje rostok és polimer makromolekulák (szénhidrát láncok és fehérjék, melyek folyadékot képesek megkötni). A fehérje rostokat (kollagén és elasztin) fibroblasztok termelik. A kollagén a tüdőszövet merevségét, az elasztin a rugalmasságot biztosítja. A mátrix hálózatos szerkezete a szövet strukturális integritását, az intersticiális folyadék a sejtek működéséhez szükséges folyadékot és ionokat adja. A morfológia vizsgálatára *in vivo* (intravitális videomikroszkópia, ortogonális polarizációs spektrális képalkotás) vagy *ex vivo*, szövettani módszereket (fénymikroszkópia, elektronmikroszkópia) alkalmazhatunk.

### **3.1. *In vivo* videomikroszkópia, ortogonális polarizációs spektrális képalkotás**

*In vivo* videomikroszkópiával mérhető paraméterek: alveoláris stabilitás (subpleurális alveolusok nagyságának változása a belégzés és kilégzés során), alveoláris falvastagság,

tüdőödéma.<sup>55</sup> A mérések elvégezhetők nyitott mellkasú állatokban, közvetlenül a tüdő felszínén, vagy a mellkason, a bordák közé beültetett "ablak"-on (műanyag lencse) keresztül, légzésszünetben (be- vagy kilégzés végén).

Az ortogonális polarizációs spektrális képalkotás alkalmas a subpleurális alveolusok megjelenítésére, és méreteinek vizsgálatára nyitott mellkasú állatokban. A méréseket végezhetjük statikusan, légzésszünetben, vagy a mikroszkóp lencsájének megfelelő beállításával dinamikusan, légzés közben is.

### 3.2. Szöveti vizsgálat

*Fénymikroszkópia.* Tüdőszövet fénymikroszkópos vizsgálatára pl. haematoxylin (a sejtmagot kékre festi) és eozin (a vörösvértestet világos pirosra, a citoplazmát és a kötőszövetet rózsaszínre vagy pirosra festi) festést használnak.

*Elektronmikroszkópia.* Az elektronmikroszkóp, fény helyett, nagy energiájú fókuszált elektronnyalábot használ a vizsgált szövet szerkezetének és összetételének a vizsgálatára. Kitűnő felvételek készíthetők a bronchiális és alveoláris struktúráról, és az epithel sejtek felépítéséről a pásztázó (scanning) elektronmikroszkóp segítségével.

## 4. Humán tüdőbetegségek állatkísérletes modelljei

Ahhoz, hogy egy betegség háttér mechanizmusait megismerjük és megértsük, az adott betegség fő jellemzőinek *in vivo* modellezésére van szükség. A tüdőbetegségek állatkísérletes modelljeiben vagy a kiváltott patofiziológiai folyamatokat, vagy e folyamatok által indukált légzőrendszeri paraméterek változását mérjük. A különböző légzőrendszeri betegségek kísérletes vizsgálatára elsősorban kis állat modelleket (egér, patkány, tengerimalac, nyúl) használunk.

### 4.1. ARDS – akut (vagy felnőttkori) respirációs distressz szindróma (shock tüdő)

Az ARDS fő tünetei: tachypnea, hipoxémia, diffúz bilaterális pulmonális infiltráció, tüdőödéma, csökkent tüdő compliance, nehézlégzés, hipotenzió és metabolikus acidózis.

#### 4.1.1. ARDS-hez társuló klinikai kórképek

Az ARDS kialakulhat közvetlenül a tüdőt ért károsodás, vagy indirekt módon, egyéb szerveket ért károsító tényezők hatására. Közvetlenül a tüdőt ért károsító tényezők/kórképek: a légzőrendszer infekciója, tüdőgyulladás, gyomortartalom aspirációja, tüdőzúródás, zsírembólia vagy mérgező gázok inhalációja. Ezekben az esetekben a gyulladásos folyamatok az alveoláris epitheliumban indukálódnak, és innen terjednek az endotheliális rétegre. Egyéb szerveket érintő kórképekben indirekt módon alakul ki az ARDS, pl. szepszis (40-50%), több szervet érintő trauma, különböző shock típusok, égési sérülés, akut pancreatitis vagy gyógyszer túladagolás. A gyulladásos folyamatok kialakulásában aktivált neutrophil és endothel sejtek, valamint gyulladásos mediátorok vesznek részt.<sup>56</sup>

Az ARDS kialakulásában szerepet játszó fő patofiziológiai mechanizmusok a kapilláris endothelium és az alveoláris epithelium károsodása, a kapilláris permeabilitás növekedése, intersticiális/alveoláris ödéma, az ödéma következményeként surfactant károsodás, atelektázia, shunt (normál tüdőben a ventiláló alveolusokat ellátó kapillárisokban a keringés megtartott = ventiláció/perfúzió egyensúly; kóros állapotokban ventiláció/perfúzió aránytalanság van, pl. normál alveoláris keringés mellett a légutak elzáródtak atelektázia vagy fokozott váladékszekréció miatt, így nincs gázcsere), funkcionális reziduális kapacitás és compliance csökkenés.

#### 4.1.2. A tüdőkárosodás markerei

A markerek mérésével a tüdő különböző alkotóelemeinek a károsodására következtethetünk.

*Kapilláris permeabilitás:* nő, ez intersticiális/alveoláris ödémát okoz; az (endotracheális tubusból vett) ödémaanyag fehérje tartalma, gyulladásos mediátorok és sejtek száma a BAL-ban.

*Endotheliális markerek:* plazma adhézions molekulák és vazóaktív mediátorok szintje (nő).

*Epitheliális markerek:* surfactant és a hozzá kapcsolódó specifikus fehérjék szintje a BAL-ban (csökken).

*Makrofágok:* cytokinek szintje nő a BAL-ban és a plazmában; NF-kappa-B, egy gyulladásos mediátor, mely normál állapotban a citoplazmában inaktív formában található. Endotoxin (lipopoliszacharid, a Gram-negatív baktérium külső sejtmembrán alkotórésze) vagy cytokin hatására aktiválódik, a sejtmagban DNS transzkripciót és mRNS translációt indukál, ezáltal a gyulladásos mediátorok (cytokinek, induktív nitrogénmonoxid szintetáz, adhézions molekulák) szintézise folyamatosan biztosított.

*Neutrophilok:* proteáz enzimek (elasztáz, kollagenáz) a BAL-ban, myeloperoxidáz a BAL-ban és a tüdőszövetben. A myeloperoxidáz szöveti aktivitása jól korrelál a szövettani károsodások mértékével.

#### 4.1.3. Az ARDS állatkísérletes modelljei

- Endotoxin vagy élő baktérium intravénás beadásával (injekció, infúzió): a neutrophilek kitapadnak a tüdő mikrokeringésében, gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, tüdőödéma alakul ki.
- Oleinsav (telítetlen zsírsav, a sejtmembrán foszfolipid része) intravénás beadásával (injekció vagy infúzió): a kapilláris permeabilitás nő, jellemző a fehérjében gazdag ödémaanyag és jelentős ventiláció/perfúzió inhomogenitás. Az oleinsav különösen pancreatitisz és súlyos csonttörések szövődeményeként fellépő ARDS modellezésére alkalmas.
- Intestinális ischemia-reperfúzióval, mely lokális gyulladásos reakciókat (neutrophil sejt aktiváció és akkumuláció, folyadék filtráció) indukál a bél mikrokeringésében, ezáltal csökken a bél mucosa barrier funkciója, a mucosa károsodás következtében baktériumok, és endotoxin kerül a bél lumenéből a keringésbe. Az aktivált neutrophilok és az endotoxin távoli szervekben, így a tüdőben is gyulladásos folyamatok generál, melynek gyulladásos sejtek kitapadása, kapilláris permeabilitás növekedése, tüdőödéma és légzésmechanikai változások a következményei.
- Akut pancreatitisszel, melyet kísérletes körülmények között nagy dózisu cholecystokininnel vagy annak analógjával, ceruleinnel, vagy cholecystokinin és alkohol kombinációjával váltanak ki, főleg patkányokon és egereken.
- Coecum ligáció/punkció indukálta szepszissel: a has megnyitása után a coecum tövét lekötjük, majd megfelelő vastagságú tűvel 1-2-szer átszúrjuk, majd a coecum megnyomásával ellenőrizzük a perforációt. A tünetek a hasfal réteges bezárása után 24 órán belül jelentkeznek.

#### 4.2. Emphysema

Az emphysema a COPD egyik típusa, melyre jellemző a terminális bronchiolusoktól disztálisan lévő alveoláris területek irreverzibilis, permanens megnagyobbodása. Mellkas röntgen és computer tomográf felvételeken hiperinfláció, megnagyobbodott légzsákok, és erőteljes tüdőkontúr látható.

Emphysemában a compliance nő, és a tüdő kevésbé képes összehúzódni. Kilégzés során a levegő nem tud eltávozni, így egyre több levegő marad vissza a tüdőben („trapped air”). Az alveolusok nem tudnak friss levegővel felfrissülni. Irreverzibilis betegség, mely fokozatosan alakul ki, és a folyamat csak lassítható. Az emphysema fő kiváltója a dohányzás;

egyéb okok között szerepel a légszennyeződés és, mint endogén tényező, a proteáz-antiproteáz egyensúly (a tüdő endogén védekezési mechanizmusa) felborulása.

#### 4.2.1. Emphysema modellek

##### 4.2.1.1. Exogén anyagok intrapulmonális expozíciója

- Az első állatkísérletes modellben (1990) dohányzás hatását vizsgálták tengerimalacokon (10 cigaretta/nap 1-12 hónapig). A kiváltott hatás: az epithelium megvastagodása, fokozott nyákszekréció, az alveolusokban nő a gyulladásos sejtek száma, a BAL-ban nő a neutrophil sejtek aránya. Az azóta elvégzett számos kísérlet eredménye bebizonyította, hogy kis állatokon ez a modell nem alkalmas az emphysema kiváltására. Ugyanis, a kis állatok obligát orrlégzők, így a patkányok rezisztensek, és az egerek érzékenysége törzstípustól függ.
- Irritáló (környezetszennyező) gázok inhalációs modelljeiben nitrogén dioxid, ózon vagy diesel kipufogógáz hatását vizsgálják. Az okozott pulmonális változások: nő a légutak ellenállása és érzékenysége, neutrophil infiltráció az alveolusokban, fokozott váladékszekréció, simaizom hipertrofia (a simaizom sejtek nagysága nő).
- Proteázok (elasztáz, papain: növényi eredetű, hatása lassabb az elasztáznál) alkalmazásával az elasztin lebomlik. Az elasztáz-indukálta változások: hemorrhagia, neutrophil és makrofág infiltráció, ödéma, alveolusok megnagyobbodása; nő a compliance, a funkcionális reziduális kapacitás és a teljes tüdő kapacitás; csökken a kilégzési áramlás és a tüdő elasztin tartalma.<sup>57</sup>
- Kis dózisú endotoxin után neutrophil szekvesztráció, migráció, neutrophilokból történő elasztáz felszabadulás, elasztin lebontása történik.

##### 4.2.1.2. Genetikai modellek

Mutáns egértörzsek megnagyobbodott légterrel.

- „Blotchy” egér: lysyl oxidáz enzim hiánya (réztartalmú enzim, mely a kollagén-elasztin szintéziséhez kell); kollagén-elasztin defektus
- „Tight skin” egér: fibrillin mutáns (fibrillin az extracelluláris mikrofibrillumok fő eleme); nem képződnek normális elasztin rostok, illetve nem megfelelően kapcsolódnak össze, neutrophil/makrofág migráció.

##### 4.2.1.3. Génmanipulált/transzgenikus modellek

A génmanipuláció a génterápia fő eszköze betegségek kutatásában, új kezelési eljárások kidolgozásában. Génmanipuláció során egy adott gén módosítása vagy hiányzó gén átvitele történik. Különösen az egérmodelleken végzett kísérletek elterjedtek, mivel az egerek genomja ismert, gyors és könnyű a szaporításuk, és a génmanipuláció/géntranszfer könnyen elvégezhető. Funkció-vesztés („knock-out”; „kiütött”, egy adott gént mesterségesen kikapcsolnak) során egy fehérjeszintézisért felelős gén kiiktatása (elasztin-/-: kevesebb, kitágult disztális légter; surfactant D fehérje-/-: makrofágok elasztáz szintézise nő) történik, míg többlet-funkció („knock-in”; fokozott fehérjeszintézis) során pl. nő az IL-13 szintézise (gyulladás, makrofágok elasztáz szintézise nő).

#### 4.3. Asztma

Az asztma komplex, idült légúti betegség, melynek jellemzői a gyulladásos folyamatok (fehérvérsejtek, hízósejtek számának és aktivitásának a növekedése a légutakban, gyulladásos mediátorok felszabadulása), bronchokonstrikció, fokozott váladékképződés és bronchiális túlérzékenység (hiperreaktivitás). Asztmában elsősorban az eosinophil sejtek száma növekszik, az aktivált sejtekből mediátorok szabadulnak fel, és ezek okozzák a gyulladásos reakciókat és a fokozott reaktivitást. Az eosinophil sejtek granulumaiból

felszabaduló anyagok citotoxikusak, károsítják az epitheliumot, fokozzák az érpermeabilitást és fokozzák a hízósejtekből történő hisztamin és cytokin kiáramlást. A gyulladásban lévő légutak beszűkülnek, főleg a spazmus és a fokozott váladékképződés miatt. Csökken a tüdőterefogat és a vitálkapacitás. Az asztma rizikófaktorai: allergének (állati szőr, toll, poratka, pollen, penészgomba), irritáló anyagok (dohányfüst, levegőszennyeződés, erős szagok/illatok, stressz), egyéb (gyógyszerek, ételek, vegyszerek, fertőzés).

#### **4.3.1. Asztma markerek**

BAL-ban: lymphociták, makrofágok, neutrophil és eosinophil sejtek (főleg a bronchiális mosófolyadékban), váladék, vér; a kilégzett levegőben: nitrogén monoxid. Ez utóbbi nő asztmában és jól korrelál a gyulladásos folyamatokkal.

#### **4.3.2. Asztma modellek**

A leggyakrabban alkalmazott asztma modell kis állatok (nyúl, tengerimalac, egér) ovalbuminnal (OA, szintetikus tojás fehérje) történő szenzitizálása. Különböző patkánytörzsek pulmonális reakciói között jelentős eltérések lehetnek, melyek a törzsek légúti simaizom mennyiségében lévő különbségekből adódnak. Nagy állat modelleket (majom, juh, kutya) ritkábban alkalmaznak.<sup>58</sup>

Először OA intraperitoneális vagy szubkután injekciójával szenzitizálják az állatokat. Adjuvánsként  $Al(OH)_3$ -t adnak, mely elősegíti az antitest reakció kialakulását. Majd, a kezelést 7 nappal később megismétlik. Újabb 7 nap múlva, az állatok porlasztó segítségével legalább 7 napig naponta OA kezelést kapnak aerosol formájában. A szenzitizálás biokémiai és fiziológiai hatását, és légzésmechanikai (bronchiális provokációs teszt) következményeit vizsgálják, valamint differenciált (eosinophil, leukocita, granulocita, és vörösvértest) sejtszámlálást végeznek a BAL-ból. A szenzitizálás sikeressége az OA intravénás beadásával ellenőrizhető.

#### **4.4. Tüdőödéma**

A tüdőödéma folyadék felhalmozódása a tüdőben, mely gázcsere csökkenéséhez és légzési zavarokhoz vezet. Kialakulhat a keringési zavarok miatt (hidrosztatikai), fokozott fehérjevesztés, veseproblémák következtében (onkotikus, plazma kolloid ozmotikus nyomása csökken), és a kapilláris permeabilitás növekedése miatt (permeabilitási). A tüdőödéma közvetlen oka a megemelkedett pulmonális kapilláris nyomás, a csökkent plazma onkotikus nyomás, az intersticiális nyomás csökkenése, az alveo-kapilláris membrán károsodása, fokozott kapilláris permeabilitás vagy nyirok elzáródás. Először, a folyadék az erekből az intersticiális térbe (intersticiális ödéma), majd a folyamat súlyosbodásával, az alveoláris térbe (alveoláris ödéma) szivárog. Az ödémafolyadék gyulladásos sejteket (neutrophilok, makrofágok), vörösvértesteket, fehérjét és proteáz enzimeket tartalmaz. Az extracelluláris térben felgyülemlett folyadék gátolja a tüdő normál működését, az alveoláris ödéma inaktíválja a surfactant-t, ami az alveolusok kollapszusához vezet.

##### **4.4.1. Tüdőödéma modellek**

Kísérletes körülmények között tüdőödéma váltható ki pl. endotoxin intravénás (infúzió, injekció) adásával. Az endotoxin beadását követően vizsgálható az endothel/neutrophil interakció, a neutrophil adhézió/aktiváció és a gyulladásos mediátorok felszabadulása. Más modellekben, pl. oleinsav intravénás infúziója növeli a kapilláris permeabilitást, a fehérje beáramlást az alveolusokba és ventiláció/perfúzió aránytalanságot okoz.



## **XI. Sejt és szövettenyésztés (Dr. Torday Csilla)**

### **1. Általános háttér**

Napjainkban folyamatosan nő az igény, hogy az élő állaton végzett kísérleteket *in vitro* modellek és metodikák váltsák fel. A társadalom nagy többsége elfogadja, hogy szükség van állatkísérletekre, azonban szorgalmazza számuk csökkentését. A kutatók között természetesen egyetértés van abban, hogy csakis a legszükségesebb és másképpen meg nem válaszolható kérdések tisztázása történjenek állatokon. Ugyanakkor egyes állatvédő szervezetek csakis azt a megoldást tekintik "alternatívnak", ha a kutatás egyáltalán nem használ fel állatot kísérleti céllal. Ezek a javaslatok általában azt tartalmazzák, hogy sejtenyészeteken történjenek vizsgálatok élő állat helyett. Bizonyos kutatási feladatok megoldásában a sejtenyészet valóban megfelelő alternatíva lehet. Vannak azonban olyan tudományos felvetések, melyek megválaszolására a sejtenyészet nem alkalmas.

A sejtenyésztés módszerét egy adott sejttípus tisztán, vagy kevert kultúrában történő előállítására alkalmazzák. Ezek a sejtek élő környezetükből kiragadva, az őket körülvevő sejtektől, az immun- és hormonrendszerrel megfosztva csak egy adott, szűk tudományterület számára jelentenek megfelelő alternatívát. *In vivo* kísérlet esetén az adott kérdést nemcsak egy bizonyos aspektusból, hanem a maga komplexitásában vizsgálhatjuk. Az állatvédőket jószándékuk és állatszeretetük vezérli, amikor a sejtenyészetek alkalmazását alternatívaként ajánlják, de a fentieket általában nem veszik figyelembe (és természetesen a sejtenyésztéshez is szükség van kísérleti állatra).

Bár a sejtenyészetek csak korlátozottan alkalmasak bizonyos kérdések megválaszolására, a tudomány nagyon sokat köszönhet ezeknek a módszereknek. A sejtenyésztés képezi az alapját a hatalmas ütemben fejlődő géntechnológiának és a mára ipari méreteket öltő biotechnológiának. Egyre nagyobb szükség van sejtkultúrákra az állatokon végzett toxicitási tesztek kiváltásához is. A nagymennyiségű koncentrált monoklonális ellenanyag termelés legegyszerűbb és legköltséghatékonyabb módja az *in vitro* szövettenyésztés. Az utóbbi években az érdeklődés a specifikus monoklonális ellenanyag termelő hibridóma sejtvonalak felé fordult, a diagnosztikus valamint az új terápiás célokra alkalmas monoklonális ellenanyagok iránt a kereslet óriási. A hibridóma olyan sejttípus, amelyet egy tumoros (rendszerint myeloma vagy limfóma) valamint egy normál sejt (limfocita) fúziójából hoznak létre azzal a céllal, hogy az új sejt hordozza mindkét szülői sejttípus kívánt tulajdonságait, így a daganatos sejt gyors osztódási képességét, valamint a normál sejt azon tulajdonságát, mellyel az monoklonális antitest-termelést diktálni képes. A hibridóma laboratóriumi körülmények között halhatatlan, immortális sejt és ugyanazt a produktumot képes előállítani tenyésztése, fenntartása során, amit a szülői sejtek. A fentiek figyelembevételével tehát mind a kutatók, mind az állatvédők szempontjából is érdemes a szövettenyésztés módszerével, lehetőségeivel és határaival megismerkedni.

### **2. Az állatkísérletek helyettesítésére alkalmazható *in vitro* lehetőségek**

- Biokémiai tesztek
- Immunkémiai technikák (bakteriális toxinok azonosítására)
- Szerv, szövet vagy sejtkultúrák (biokémiai kutatások céljára)
- Mikroorganizmusok (karcinogén ill. mutagén anyagok tesztelésére)
- Magasabbrendű növények, néhány metazoa parazita alkalmazása
- Komputer szimulációs modellek (pl. komputer-vezérelt próbababák)

#### **Állatkísérleteket már helyettesítő alternatív eljárások**

- Monoklonális ellenanyag előállítás
- Terhességi teszt
- Vakcina hatékonysági teszt

- Vakcina termelés vírussal

### 3. A szövettenyésztési technika rövid története

- 1907** Ross Harrison létrehozza az első szövettenyészetet (az eredeti Harrison módszert Alexis Carrel és Montrose Burrows módosította).
- 1947** Az Amerikai Szövettenyésztő társaság megalakulása Hershey-ben (USA, Pennsylvania).
- 1949** G. W. Hyatt létrehozta az Amerikai Tengerészeti Szövetbankot ortopédiai műtétekből származó csontszövet tárolására.
- 1950** Az első humán tumoros sejtvonal elindítása ('HeLa' - Henrietta Lacks cervix tumor sejtvonala)
- 1962** Leonard Hayflick létrehozza az első normál humán diploid sejtvonalat.
- 1980** Ananda Chakrabarty a *genetikai engineering* módszerével nyersolajat emésztő baktériumtörzset hozott létre.

### 4. A szövettenyésztés fogalma

A sejt illetve szövettenyésztés olyan technika, melynek révén a növényi vagy állati szervezetből eltávolított sejtek kontrolált körülmények között a legtöbb szükséges tápanyagot tartalmazó steril médiumban növekednek. A sejt és szövettenyésztés általános technika, melyet a biotechnológia mint iparág, széles körben alkalmaz.<sup>59, 60, 61</sup>

#### 4.1. Sejt és szövettenyésztés céljai

- Magának a sejtnak a vizsgálata (sejtanalízis)
- A sejt-sejt kölcsönhatás (sejtkommunikáció) vizsgálata
- A sejtek különböző kémiai anyagokra adott válaszáinak analízise
- Különböző sejt-eredetű fehérje termékek előállítására (biotechnológia ipar)



#### 4.2. A sejt / szövettenyésztéssel kapcsolatos alapfogalmak

A sejtenyészetek készülhetnek szöveti explantokból ("*explant kultúrák*") és sejtuszupenzióból ("*uszupenziós kultúrák*").

*Szövettenyésztés*: a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehetővé teszi a sejtek differenciálódását ill. a struktúra és/vagy funkció megőrzését.

*Sejtenyésztés*: diszpergált sejtek fenntartása *in vitro* körülmények között.

*Monolayer*: a tenyésztőedény felszínén egy sejtréteg növekszik.

*Subkultúra*: a sejtek egyik kultúrából a másikba történő átvitele (passzázs) többnyire szaporítás céljából.

*Primer tenyészet*: egy állatból direkt módon eltávolított sejtől, szövetből, vagy szervből induló sejt-kultúra.

*Szervtenyészet*: szövet, egész szerv, vagy szervdarab fenntartása a differenciálódási készség, a funkció és architektúra megőrzése mellett.

*Explant tenyészet*: egy szervből kimetszett szövetdarab, mely a szöveti struktúrát bizonyos mértékben megtartja, ugyanakkor sejtek vándorolnak ki belőle és alkotnak új sejt-együtteseket.

*Sejtvonal*: primer sejtenyészetből indul az első passzázsor, de még véges élettartammal rendelkezik

*Folytonos sejtvonal*: transzformálódott, korlátlan élettartamú sejtvonal.

#### 4.3. A sejtenyészetek típusai

- *Primer sejtenyészetek*: készülhetnek embrionális ill. felnőtt szövetből. Minden egyes preparátum kicsit eltér egymástól, teljesen homogén idegen sejtet nem tartalmazó tiszta

tenyészetéről nem beszélhetünk. Előnyük, hogy a sejteket más hatás, mint a tenyésztés kezdő lépéseként alkalmazott enzimatis, vagy mechanikus disszociáció nem érte, a sejtek nem tekinthetők módosított ill. transzformált sejteknek. Hátrányuk, hogy ezek a kultúrák korlátozott ideig tarthatók csak fenn, élettartamuk tehát véges (hetek, néhány hónap).

- *Sejtvonalak*: abnormális, gyakran transzformált sejtek, élettartamuk korlátlan.

## 5. A sejtenyésztés módszerei és feltételei

### 5.1. A sejtenyésztő laboratórium legfontosabb eszközei

- Laminaris fülke ("laminar box"): a steril munka, azaz a steril oldatok készítése, szűrése, összeállítása, a sejtek preparálása, tehát maga a sejtenyésztési folyamat minden lépése kizárólag itt, a steril levegő-áramot biztosító fülkék alatt történik. Két fajtája van, a vertikális, valamint a horizontális típusú laminaris box (a steril levegő másként áramlik bennük). A vertikális box-ban (*biology safety cabinet*) a steril levegő a fülke tetejéről, tehát fentről lefelé, vertikálisan áramlik; veszélyes anyagokkal való munkára ez a legalkalmasabb típus. A horizontális box veszélyes anyagokkal való munkára nem alkalmas, de a tenyészetek számára legbiztonságosabb feltételeket nyújtja. A steril levegő horizontálisan, a tenyésztő irányába, kifelé áramlik. Mindkét steril tenyésztő fülke típus esetében a levegő folyamatosan kicserélődik szűrt, steril levegőre, ugyanis ezek a steril fülkék el vannak látva ún. HEPA (*high efficiency particle*) filterrel, amely a nemkívánatos partikulákat kiszűri. A steril fülkék természetesen fel vannak szerelve rövid-hullámhosszú UV lámpákkal, hogy a munka szünetében a fülkét sterilizálni lehessen.<sup>59, 60</sup>
- CO<sub>2</sub> inkubátorok: a sejtek 5-10% CO<sub>2</sub> tartalmú, közel 100%-os páratartalmú légtérben növekednek. A tenyésztő médium nátriumbikarbonát/szénsav puffer rendszerrel van az optimális fiziológias pH értékre beállítva. Ezeket a feltételeket szigorúan be kell tartani és folyamatosan ellenőrizni. A megfelelő, folyamatos gázcserét a tenyésztőflaskák sapkáinak meglazításával biztosítani kell a tenyésztés folyamán.
- Mikroszkóp: a tenyészetek vizualizálására fáziskontraszttal ellátott invertoszkópot használunk.

### 5.2. Sejtpreparálás szövettenyésztés céljából

Az egyes lépések az alábbiak:

1. A szövettenyésztéshez szükséges *oldatok* elkészítése.
2. A tenyésztés céljára felhasználandó *szövet* előkészítése.
3. Sejtdisszociálás:
  - *Mechanikus disszociáció* a sejtek enzimatis kezelés nélküli szétválasztása mechanikus úton:
    - a szövet megfelelő átmérőjű tűn keresztül fecskendőbe történő fel-le szívogatásával (pl. lágy, könnyen diszpergálható agyszövet esetén);
    - a szövet megfelelő pórusméretű műanyag szitán történő átpréselésével.
  - *Enzimatis disszociáció* enzimatis kezeléssel, kollagenáz, tripszin, tripszin-EDTA, diszpáz, proteáz enzimek alkalmazásával történik.
4. A sejtuszpenzió steril nylon szűrőn át történő *szűrése* a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt, nagyobb szövetdarabok szétválasztása céljából.
5. A sejtek alacsony fordulaton történő *ülepítése*.
6. A sejtledek *reszuszpendálása*, a felülszót ekkor friss tápfolyadékra cseréljük.
7. *Sejtszámolás* (az össz-sejtszámot ill. az élő sejtek számát mikroszkóp alatt, hemocitométer segítségével határozzuk meg és beállítjuk a kívánt sejtsűrűséget a tenyésztéshez. Trypánkéket használunk az ún. festék-kizárásos tesztben, hogy meg tudjuk határozni az

elpusztult sejtek számát. Az ilyen sejtek nem festődnek, nem veszik fel a festéket. A tenyészetek morfológiai változását, növekedését naponta ellenőrizzük. Tápfolyadékot általában hetente két alkalommal cserélünk a sejt kultúrákon. Ha elérték a megfelelő sejtsűrűséget, szubkultúrákat készítünk belőlük, ill. tartós tárolásra lefagyaszthatjuk, amint azt a feladat megkívánja.

### 5.3. Sejtadhéziós molekulák, a sejtek letapadását segítő faktorok

Ezeket az anyagokat a tenyésztőedények felületének kezelésére használjuk:

- Kollagén
- Fibronektinek (sejtfelszíni és plazmafehérjék)
- Laminin (heteromer glikoprotein)
- Poly-L-Lizin (polikationos természetű poliaminosav, 70.000-150.000 kDa MW)
- Poly-L-Ornitin (polikationos természetű poliaminosav, 30.000-70.000 kDa MW)

## 6. Tenyésztő oldatok és alkalmazásuk

### 13. Táblázat Médiumok típusai és alkalmazásuk

| Médium típusa                     | Példák                                                                                | Alkalmazásuk                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Balanced (egyensúlyi) só oldatok) | PBS (Phosphate Buffered Solution)<br>DPBS (Dulbecco PBS)<br>Hank's BSS,<br>Earl's BSS | A komplex médiumok alapját képezik                                                                                                                                                |
| Alap médium                       | MEM (Minimal Essential Medium) - ld. részletesen a 6.3. pont alatt                    | Primér és diploid kultúrák fenntartásához                                                                                                                                         |
|                                   | DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)                                               | Dulbecco által módosított MEM oldat, emelt koncentrációban tartalmaz aminosavakat és vitaminokat. A legkülönbözőbb sejtek tenyésztéséhez (beleértve a hibridómákat is) megfelelő. |
|                                   | GMEM                                                                                  | A Glasgow MEM tápoldat a BHK-21 típusú sejtek optimális médiuma. A MEM módosítása, 10% triptóz foszfátot és a normális vitamin és aminosav koncentráció kétszeresét tartalmazza.  |
| Komplex medium                    | RPMI 1640                                                                             | Eredetileg humán leukémiás sejtek számára fejlesztették ki. Az emlős sejtek széles skálája (beleértve a hibridómákat) jól növekszik benne.                                        |
|                                   | Iscove's DMEM                                                                         | A DMEM oldat módosítása, mely még hatékonyabban támogatja a sejtnövekedést (B-limfocita, timocita).                                                                               |
|                                   | Leibovitz (L-15)                                                                      | CO <sub>2</sub> -mentes környezetre, CO <sub>2</sub> termosztáton                                                                                                                 |

|                                     |                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     |                                                                     | kívüli munkákhoz fejlesztették ki                                                                                                                                                                                                   |
|                                     | TC 100<br>Grace's Insect<br>Medium,<br>Schneider's<br>Insect Medium | Rovarsejt kultúrákra fejlesztették ki                                                                                                                                                                                               |
| Szérum-mentes<br>tenyésztő médiumok | CHO (Chinese<br>hamster ovary)                                      | Szérummentes körülmények biztosítására,<br>speciálisan aranyhörcsög ovarium sejtek<br>tenyésztéséhez. <i>Megjegyzés:</i> szérum helyett<br>különböző szupplementumokat mint fetuin,<br>insulin, BSA, transferrin adnak a médiumhoz. |
|                                     | Ham F10 és<br>származékai,<br>Ham F12<br>DMEM/F12                   | <i>Megjegyzés:</i> ezekhez a médiumokhoz szérum<br>helyett más szupplementumokat, mint pl.<br>inzulin, transferrin, epidermális növekedési<br>faktort adnak. Általában Hepes-sel puffereltek.                                       |
| Rovarsejt tenyésztő<br>médiumok     | Sf-900 II SFM,<br>SF Insect-<br>Medium-2                            | Speciálisan Sf9 Sf21 rovarsejtvonalakra<br>fejlesztették ki                                                                                                                                                                         |



### 6.1. A sejtenyésztő oldatok alapvető komponensei

- Szervetlen sók (nátrium, kalcium, kálium, magnézium klorid, szulfát, ill. foszfát sói)
- Szénhidrátok (glukóz, fruktóz)
- Aminosavak
- Vitaminok
- Zsírsavak és lipidek
- Fehérjék és peptidek
- Szérum



### 6.2. A sejtenyésztő oldatokhoz adott tenyésztést segítő elemek

Mindegyik konstituensnek speciális funkciója van:

- Fötális borjúsavó (FCS), újszülött borjúsavó, lószérum, az alap tenyésztőoldathoz leggyakrabban hozzákevert komponensek. A sejtnövekedéshez nélkülözhetetlen nutritív anyagokat ill. növekedési faktorokat (*growth factor*) tartalmazzák. Sejttípusonként változó, hogy melyik szérumfajta kedvez az adott sejt növekedésének.
- Növekedési faktorok
- Inzulin
- Transzferrin
- Szérum albumin

### 6.3. A MEM oldat (Minimum Essential Medium Eagle)

A Minimum Essential Medium (MEM), melyet Harry Eagle fejlesztett ki, egyike a legszélesebb körben, monolayer kultúrák fenntartására alkalmazott szintetikus sejtenyésztő oldatoknak. A Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a MEM továbbfejlesztett változata, ma az emlős sejt kultúrák leggyakrabban használt sejtenyésztő oldata (**33. ábra**).

| <b>Dulbecco's Modified Eagle Medium /DMEM/</b>       |             |
|------------------------------------------------------|-------------|
| <b>összetevők</b>                                    | <b>mg/L</b> |
|                                                      |             |
| <b>inorganikus sók</b>                               |             |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                 | 264,00      |
| Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O | 0,10        |
| KCl                                                  | 400,00      |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 200,00      |
| NaCl                                                 | 6400,00     |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 3700,00     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O  | 141,00      |
| <b>egyéb</b>                                         |             |
| D-Glükóz                                             | 1000,00     |
| Na-Piruvát                                           | 110,00      |
| <b>aminosavak</b>                                    |             |
| L-Arginin*HCl                                        | 84,00       |
| L-Cisztin                                            | 48,00       |
| Glicin                                               | 30,00       |
| L-Histidin-HCl*H <sub>2</sub> O                      | 42,00       |
| L-Isoleucin                                          | 105,00      |
| L-Leucin                                             | 105,00      |
| L-Lisin-HCl                                          | 146,00      |
| L-Metionin                                           | 30,00       |
| L-Fenilalanin                                        | 66,00       |
| L-Szerin                                             | 42,00       |
| L-Treonin                                            | 95,00       |
| L-Triptofán                                          | 16,00       |
| L-Tirozin                                            | 72,00       |
| L-Valin                                              | 94,00       |
| <b>vitaminok</b>                                     |             |
| D-Ca-Pantotenát                                      | 4,00        |
| Kolin-klorid                                         | 4,00        |
| Folsav                                               | 4,00        |
| Inositol                                             | 7,20        |
| Niacinamid                                           | 4,00        |
| Piridoxin-HCl                                        | 4,00        |
| Riboflavin                                           | 0,40        |
| Tiamin-HCl                                           | 4,00        |

**33. ábra**      *A Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oldat összetevői*

## 7. A leggyakrabban használt tenyésztőedények



**34. ábra** Sejttenyésztő „flaskák”. A tenyésztőfelszín nagyságában, a sejtfilm felett lévő folyadékréteg térfogatában térnek el egymástól.



**35. ábra** Petri csészék. A méret, azaz a tenyésztőfelszín szerint térnek el egymástól.





**36. ábra** Soklyukú tenyésztőedények. Több kútban, azonos körülmények között növekedő, párhuzamos minta vizsgálatát teszik lehetővé. A tenyésztőkutak száma 6, 12, 24, 48 ill. 96 lehet.

## 8. Szubkultúra készítése

A sejtenyésztő laboratóriumban alkalmazott proteázok (tripszin, kollagenáz, pronáz) általában EDTA-val együtt alkalmazva a sejtek fellazulását, majd a tenyésztőfelszínről történő leválását okozzák. Az enzimatis emésztés egy nagyon hatékony módszer, de ha nem a megfelelő ideig történik, károsíthatja, lebonthatja a sejtfelszíni fehérjéket. Az enzimatis emésztés folyamata a szükséges időben bármikor leállítható, ha a sejtekhez szérumot tartalmazó teljes tápoldatot adunk.<sup>59-61</sup>

1. Elkészítjük a megfelelő koncentrációjú enzimoldatot (tripszin - EDTA oldat) egy olyan, csak az alapvető sókat tartalmazó oldatban, amely nem tartalmaz  $\text{Ca}^{2+}$  ill.  $\text{Mg}^{2+}$  ionokat (kalcium és magnézium-mentes PBS oldat), hanem EDTA-t, a vízben elkerülhetetlenül jelenlévő kalcium és magnézium eltávolítására.
2. Szívjuk le a tenyésztő oldatot a tenyészetről, fecskendővel, vagy egyéb módszerrel, majd mossuk meg a sejtenyészeteket (azaz cseréljük le a tápfolyadékot)  $\text{Ca}^{2+}$ -t ill.  $\text{Mg}^{2+}$ -t nem tartalmazó sóoldatra, hogy a szérum nyomait maradéktalanul eltávolítsuk (ugyanis a szérum különféle proteáz inhibitorokat tartalmaz).
3. A sejtekről eltávolított mosóoldat helyébe mérjük a sejtekre annyi, kívánt koncentrációjú tripszin-EDTA oldatot, hogy a sejt-monolayer teljesen befedje.
4. Tegyük be a sejteket a 37 °C-os inkubátorba. Addig hagyjuk a sejteket inkubálódni, amíg le nem válnak a tenyésztőedény felszínéről, ügyelve arra, hogy az enzimhatás ne legyen túlzottan erős (maximum 2 perces).



5. Kövessük invert mikroszkóp alatt a folyamatot. A sejtek lekerekedése jelzi a leválási folyamat megkezdődését.
6. Adjunk a sejtekhez szérumot (10%-os végkoncentrációban) vagy hígítsuk a sejtsuszpenziót szérum-tartalmú friss médiummal, hogy meggátoljuk a további enzimhatást. Gyűjtsük össze a sejtsuszpenziót steril centrifugacsőben.
7. Alacsony fordulatszámon (800-1000 g) centrifugáljuk le a sejteket, távolítsuk el a felülúszót, majd reszuszpendáljuk a sejteket friss, szérumot (általában 10%) tartalmazó tenyésztő oldatban vagy fagyasztó médiumban (ha a sejteket le kívánjuk fagyasztani tárolás céljából).
8. Sejtszámolás után hígítsuk a sejtsuszpenziót a kívánt koncentrációra (általában 1:4 - 1:20 hígítás a legtöbb sejtvonal esetén megfelelő), vagy primer kultúráknál az adott kísérleti kívánalmaknak megfelelően.
9. Pipetázzuk a sejteket Petri csészébe, soklyukú (ún. *multiwell*) tenyésztőedénybe, ill. tenyésztő flaskába, vagy más, az igények szerinti tenyésztőedénybe.

## 9. A sejtek tárolása

### 9.1. Lefagyasztás

1. A sejteket a tenyésztőfelszínről a szokásos enzimatis emésztéssel eltávolítjuk ("harvesting"), majd megmossuk szérumot tartalmazó komplett oldattal, hogy a fehérjebontó enzimet eltávolítsuk.
2. A mosás során centrifugálással ülepített sejteket komplett oldatban reszuszpendáljuk, majd meghatározzuk a sejtszámot és az életképességet (*viabilitást*).
3. Újból centrifugáljuk a sejteket, reszuszpendáljuk jéghideg "fagyasztó médiumban" (90% foetalis borjú savó és 10% Dimetilszulfoxid (DMSO) keveréke. A sejtszám ismeretében beállítjuk a kívánt sejtsűrűséget ( $10^6$  -  $10^7$  sejt/ml). Az egyes lépések során végig jégen hűtve tartjuk a sejteket. *Megjegyzés:* az ún. krioprotektív ágensek, mint a glicerol, vagy a DMSO, csökkentik a fagyáspontot. Optimális a log fázisban növekvő, egészséges sejtek használata.
4. Pipetázzuk a sejtsuszpenzió 1 ml-es aliquotjait speciális fagyasztó edényekébe.
5. Helyezzük a sejteket egy éjszakára  $-80^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóba. *Megjegyzés:* a fokozatos lehűtés módszerével a víz még a sejtek megfagyása előtt távozik a sejtekből. A hűtés optimális sebessége  $1-3^{\circ}\text{C}$  /perc.
6. A következő napon helyezzük a sejteket tartalmazó fagyasztó edényt a  $-80^{\circ}\text{C}$ -s fagyasztóból a folyékony nitrogént tartalmazó tárolóba. Mind a folyadék fázisú ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) mind a gázhalmazállapotú nitrogén ( $-156^{\circ}\text{C}$ ) megfelelő hűtést biztosít.

### 9.2 Sejtek felolvasztása

A módszer a hosszabb-rövidebb ideig tárolt sejtek, sejtvonalak életképes, továbbtenyésztésre alkalmas formában történő visszanyerésére alkalmas. Az óvatos, lépcsőzetes lefagyasztással ellentétben, a felolvasztás gyorsan történik.<sup>59-61</sup>

1. Távolítsuk el a sejteket tartalmazó tárolóedényt a fagyasztóból, majd gyorsan olvasszuk ki  $37^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben, kíméletes rázatás közben.
2. Amint a jégkristályok kiolvadnak, pipetázzuk át óvatosan a sejteket egy előmelegített komplett tenyésztőoldatot tartalmazó centrifugacsőbe (1 ml fagyasztott sejtet tízszeresére hígítunk azaz fokozatosan adunk hozzá 10 ml médiumot).
3. Alacsony fordulatszámu centrifugálással ülepítsük a sejteket, majd dobjuk el a krioprezervatív anyagot tartalmazó felülúszót (ugyanis jelenlétükben a sejtek törékenyek).
4. Óvatosan reszuszpendáljuk a sejteket a tenyésztő médiumban, határozzuk meg a sejtszámot és a viabilitást.

5. Ültessük ki a sejteket a kívánt számban a megfelelő tenyésztőedénybe. A sejt-inoculum legalább  $3 \times 10^5$  élő sejt /ml legyen.



## 10. Mesterséges szövetek létrehozása („tissue engineering”)

Az utóbbi évtizedekben forradalom zajlott a biológiai tudományok területén, létrejött a biotechnológia új, multidiszciplináris területe, a humán „tissue engineering”. Ez a kifejezés összekapcsolja a medicina, a sejt-és molekuláris biológia, anyag, valamint a mérnöki tudományok („engineering”) különféle aspektusait. Célja, hogy szövetpótló anyagokat hozzon létre, melyek segítségével a károsodott humán szövet regenerálható, funkciója megtartható, illetve javítható lehet.

A *tissue engineering* definíciójával Langer és Vacanti összefoglaló közleményében<sup>62</sup> találkozhatunk először, ahol a következőképpen fogalmazták meg a kifejezés lényegét "*an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ*". MacArthur és Oreffo<sup>63</sup> a fogalmat úgy definiálta, mint a szövetszaporodás elvének megértését és alkalmazását, funkcionális, szövetpótló anyagok létrehozása céljából ("*understanding the principles of tissue growth, and applying this to produce functional replacement tissue for clinical use*").

1. A *tissue engineering* (regeneratív medicina) javítja, vagy pótolja a károsodott, illetve kiesett strukturális szöveti (pl. csont, porc, erek, hólyag, stb.) funkciót. Erre a célra mindig élő sejtet használ, többnyire különböző módon, de azonos céllal (pl. élő fibroblaszt sejtekből épít fel mesterséges bőrt, vagy élő kondrocitákkal pótolja, illetve javítja, állítja helyre a károsodott porcszövet funkcióját).
2. A szövet transzplantáció (pl. őssejtet használva) specifikus biokémiai funkciót ellátó sejtek (pl. mesterséges máj ill. pancreas) transzplantációját jelenti.
3. A biológiai engineering egy szélesebb területet jelent, mely magába foglalja a magát a *tissue engineering*-et és más, rokon területeket, mint pl. a bioanyagok létrehozását, alkalmazását.

A sejtek akkor váltak igazán alkalmassá a *tissue engineering* céljára, amikor 1998-ban felfedezték, hogy milyen módon lehet a telomereket olyan irányba befolyásolni, hogy immortalizált sejtvonalak jöjjenek létre. Ezelőtt egészséges, nem tumoros emlős sejtkultúrák csak egy az ún. „Hayflick limit” –nek megfelelő, korlátozott számú osztódáson mentek keresztül (Leonard Hayflick 1965-ben megfigyelte, hogy tenyésztett sejtek kb. 50 alkalommal osztódnak mielőtt elpusztulnak). Ennek a limitnek a közelében a sejtek az öregedés jeleit mutatják (kivéve az őssejtek és a daganatos sejtek). A sejtosztódási limit sejttípusról sejttípusra, organizmusról organizmusra változik. A humán sejtek osztódási limitje kb. 52, és a telomerek (a kromoszómák végén található DNS régió) rövidülésével áll összefüggésben.

A mesterséges szövet létrehozása egy új, feltörőben lévő területe a biotechnológiának, mely magában hordozza a lehetőségét a jelenleginél korszerűbb orvosi terápiás eljárások létrejöttének. A technika magában foglalja az ún. 3-D biokompatibilis *scaffoldok* létrehozását amelyek megfelelő mennyiségben hordozzák az implantálandó sejtet (ld. alább), valamint az így létrehozott „mesterséges” szövet *in vivo* implantációját.<sup>64, 65</sup> Jelenleg világméretű kutatás folyik az újabb és jobb *tissue engineering* technikák kifejlesztésére, amelyek a csontvelő, a máj, a szívizom, porc, az idegrendszer sejteinek pótlására, vagy mesterséges bőr, szív, a keringést támogató egységek, szívbillentyű protézisek előállítására irányulnak.



### 10.1. A „tissue engineering” számára alkalmas sejtforrások

- Autológ sejtek nyerhetők ugyanabból az egyedből, mely a reimplantáció alanya, melybe a reimplantáció történik. Autológ sejtek inplantációja okozza a legkevesebb problémát a rejekció illetve a patogén transzmisszió tekintetében.
- Allogén sejtek: ugyanannak a fajnak a donorjától származnak.
- Szingén vagy izogén sejteket genetikailag azonos organizmusból (ikrek, klónok, ill. ún. beltenyésztett, “*inbred*” kísérleti állat modellek) izolálják.
- Primer sejtek: egy adott organizmusból származnak.
- Szekunder sejtek: sejtbankból vagy többszörösen passzált primer kultúrákból származnak.
- Xenogén sejtek: egy másik faj egyedeiből lettek izolálva. Pl. kardiovaszkuláris implantátumok létrehozására irányuló kutatásokban állati sejteket (elsősorban sertés eredetű sejteket) használnak.
- Össejtek: differenciálatlan sejtek, melyek sejtenyészetben osztódnak és képesek létrehozni a specializált sejtek legkülönbözőbb formáit. Forrásuktól függően az össejtek “felnőtt” és embrionális sejté alakulhatnak osztódásuk során. Az előbbi elsősorban multipotens, az utóbbi főleg pluripotens; néhány sejt totipotens az embrionális állapot legkorábbi szakaszán. Az össejtek ígéretes eszközök lehetnek a sérült ill. súlyosan károsodott szöveti funkció helyreállításában, ill. új szervek létrehozásában.<sup>64, 65</sup>



## 10.2. A “scaffold” technika

E technikával a sejteket egy mesterségesen létrehozott struktúrába implantálják, ill. tenyésztik (ezt nevezik állványzatnak - *scaffold*-nak), ami támogatja a háromdimenziós szöveti struktúra létrejöttét, és legalább egynek megfelel az alábbiakban felsorolt három cél közül:

1. biztosítja a sejtkitapadást és migrációt,
2. szállítja és visszatartja a sejteket és biokémiai faktorokat,
3. biztosítja a sejtek vitális tápanyagainak és a sejtek által expresszált anyagok diffúzióját.

A sejtnövekedést hatékonyan támogató biológiai scaffoldokat természetes anyagokból állítják elő, alapanyagként elsősorban az extracelluláris mátrix (ECM) komponensek szolgálnak. Az ECM a mikrokörnyezet vitális komponense, mely a sejtek ill. a szövetek számára a sejtnövekedéshez és fejlődéshez megfelelő 3-D architektúrát biztosítja. Ami azonban az *in vivo* milieu visszaállítását illeti, ezek a scaffoldok ma még gyakran tökéletlenek. Nem képesek olyan körülményeket teremteni, amely lehetővé teszi, hogy a sejtek befolyásolni tudják saját mikrokörnyezetüket. Az anyagok biológiai lebomlása (biodegradabilitása) is lényeges elem. A scaffoldokat a körülöttük lévő szövet abszorbeálja, eltünteti, ha már betöltötték szerepüket, így sebészeti eltávolításukra nincs szükség. A scaffold technika nagy ígéret a medicina számos területén, azonban még hosszabb időnek kell eltelnie ahhoz, hogy ez a módszer emberi használatra szélesebb körben elérhetővé váljon. A biológiai scaffoldok típusai a következők:

- Protein scaffoldok (kollagén vagy fibrin-alapú). A kollagén alapú biológiai scaffoldok előnye, hogy a kollagén gél matrix a tenyésztést követően megtartja formáját, permeabilis, és szöveti implantátumként a rekonstruktív és kozmetikai sebészet alkalmazhatja implantátumként (pl. gerincvelői *repair*).
- Poliszacharid polimer scaffoldok (glukozaminoglikánok, pl. hialuronsav).
- Hidrogél scaffoldok (polipeptid alapú, pl. PuraMatrix™).

### 10.2.1. A scaffoldok szintézise

Számos módszert dolgoztak ki háromdimenziós porózus struktúrák előállítására, melyek alkalmasak lehetnek a *tissue engineering* céljaira. A „molekuláris ön-összeszerelődés (*self*

*assembly*”) technika olyan tulajdonságú bioanyagot állít elő, mely hasonló az *in vivo* ECM tulajdonságaihoz (ún. *nanofiber cell-assembly*).

Az összeitek enkapszulációja (azaz a megfelelően összeállított peptid hordozóba történő beültetés) lehetővé teszi, hogy ezek a sejtek a kívánt sejttypussá differenciálódjanak, és specifikus növekedési faktorokat és citokineket expresszáljanak. Ezeknek a sejt-scaffold rendszereknek a kívánt szövetbe történő beültetése egy új és széles alkalmazási területet nyit meg, beleértve a szövet-helyreállítást is.<sup>66, 67</sup>

#### **10.2.2. Biológiai scaffoldok az idegi/idegsejt regenerációban**

Ezek a peptid scaffoldok az idegsejt kitapadását és az axonok növekedését támogatják. A gerincsérülésből eredő bénulás és más idegi károsodások még az utóbbi időkben is visszafordíthatatlannak, irreverzibilisnek tűntek. Jelentős lépés történt a paralízis visszafordíthatósága felé azáltal, hogy kifejlesztettek egy olyan biológiai scaffoldot, amely támogatja az idegsejtek letapadását, stimulálja az idegsejt növekedést és az idegsejt hálózat kialakulását - és ezáltal az idegsejtek regenerációját. Zhang, Holmes és munkatársaik<sup>67</sup> dolgozták ki azt a *self-assembling* biokompatibilis és biodegradábilis peptid scaffold technikát, amely lehetővé teszi az idegsejtek számára hogy növekedjenek, funkcionális szinapszisokat és kommunikációs csatornákat hozzanak létre.<sup>68, 69</sup>

#### **10.2.3. Biológiai scaffoldok a szívizom helyreállítására**

A kísérletek arra irányultak, hogy segítsék a szívinfarktus áldozatainak rehabilitációját az ischemizált vagy elhalt szívizom pótlása révén. A biológiai scaffold technika klinikai alkalmazása forradalmasíthatja a kardiológiát. Sertésen végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy új szívizom rostok nőnek be a scaffoldot, a sejtproliferációs ráta megnő és a károsodott szívben a gyógyulás ill. regeneráció jelei mutatkoztak. Kidolgoztak egy poliszaccharid (cukor) polimer scaffoldot, mely megfelelően támogatja a transzplantált sejteket, segíti túlélésüket, osztódásukat, megfelelő struktúrába történő szerveződésüket és segíti az új szövetet vérrel ellátó kapillárisrendszer kialakulását. A technikával tehát lehetőség nyílik az emberi testen kívüli humán szövet előállítására különféle szervekből, mely éppúgy szekretál és metabolizál biokémiai anyagokat, mint az adott szerv<sup>68</sup>.

#### **10.2.4. Biológiai scaffoldok és csontvelő eredetű összeitek a csontkárosodások kezelésére**

Az öregedés alatt fellépő csonttömeg veszteség megnöveli a csonttörések rizikóját. A csont regenerációs folyamat idősebb korban lassú és korlátozott az osteoblastok csökkent aktivitása miatt. Osteoprogenitor sejteket szelektáltak patkány csontvelőből, és ezeket DMEM médiumban hidrogél scaffoldon tenyésztették, majd transzplantálták a csontdefektus területére. 6 héttel a transzplantáció után a defektus helyén új csont képződött, így az oszteogen csontvelő sejteket hordozó biokompatibilis scaffold ígéretes megoldás lehet, amivel a csont helyreállításával járó komplikációk minimálisra csökkenthetők.

#### **10.2.5. Scaffoldok porc szövet *in vitro* előállítására**

Bizonyos peptidek alacsony (0.1–1%) koncentráció mellett stabil hidrogélekké szerveződnek. Ilyen önszerveződő (*“self-assembling”*) peptideket az alternáló, hidrofób ill. hidrofil karakterű oldalcsoporthoz váltva hordozó aminosav szekvencia jellemzi.<sup>70</sup> A traumás sérülésekből vagy degeneratív betegségekből eredő porcdefektusok kezelésére, a szövet biológiai és mechanikai funkciójának megőrzésére ill. helyreállítására új orvosi stratégiára van szükség. A beültetett porcsejtek *repair* választ iniciálhatnak a sebágyban *de novo* celluláris reguláción keresztül. A kondrociták eljuttatásához a porcdefektus helyére szükség van egy biokompatibilis scaffoldra, mely a sejteket hordozza és magába zárja. A scaffoldot egy 3-D templátként alkalmazzák,

amelyben a kondrociták ECM-et termelnek. A sejt /scaffold rendszer strukturális stabilitását a scaffold tartja fent mindaddig, amíg a tenyésztett kondrociták az implantátumot átszövő, összefüggő ECM hálót létre nem hozzák. Ideális körülmények között a scaffold degradációja akkor következik be, amikor az ECM háló éretté válik a regeneráció irányítására a scaffold minden pontján. A sikeres porcpótlás feltétele az integrálódás a normális porc szövetbe.

## 11. Biokémiai folyamatok, melyek vizsgálatára alkalmas eszköz a sejtenyésztés

1. Sejt-sejt kommunikáció
2. Intracellularis szabad kalcium koncentráció  $[Ca^{2+}]_i$  mérése
3. *In situ* szabadgyök detektálás

### Az intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ koncentráció $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedésének fiziológiás ill. patofiziológiás szerepe, a $Ca^{2+}$ -szint változás detektálása<sup>71</sup>

A sejt környezetének változásaira különféle komplex és egymással összefüggő szignál transzdukciós folyamatok beindításával válaszol. A sejtmembránon átjutó jel a sejten belüli események sorozatát indítja el így az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint megemelkedését, enzimek aktivációját, gén expressziót indukál. A  $Ca^{2+}$  egyike a számos intracelluláris szignál molekulának, amely képes olyan fontos biológiai folyamatokat modulálni, mint pl. a sejtproliferáció, differenciálódás, exocitózis, metabolizmus. Patológias körülmények között a kialakult szöveti károsodások oka többnyire a kalcium homeosztázis zavara, a szabályozhatatlan, megnövekedett szabad kalcium ion-szint, azaz az oxigén-eredetű szabadgyökök indukálta "Ca-overload" és a citoszkeleton károsodása. Az ischemia-reperfúziós károsodásokban is ezek a mechanizmusok érhetők tetten. A  $Ca^{2+}$  szignalizáció, az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$ -szint mérése, változásának detektálása egyike a legfontosabb in vitro mérési technikáknak. A bazális intracellularis  $Ca^{2+}$  koncentráció alacsony szinten tartott (10-100 nM), azonban fiziológiás stimulusra, hormonok, neurotranszmitterek növekedési faktorok hatására az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  koncentráció megemelkedik, de csak olyan mértékben, amely bizonyos szignál-transzdukciós folyamatok beindításához szükséges (100-2000 nM). Ez a növekedés átmeneti, a másodperc tört része alatt lecseng, visszatér az alapállapotba. Patológias körülmények között az intracellulárisan szabad, tehát nem kötött formában lévő  $Ca^{2+}$  koncentráció akár a millimólos (mM) nagyságrendet is elérheti, ami "Ca<sup>2+</sup> overloadot" eredményezhet, és sejthalálhoz vezet. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció regulálásához a sejt két fontos  $Ca^{2+}$  forrást használ: 1.  $Ca^{2+}$  lép be a sejtbe az extracelluláris térből vagy 2.  $Ca^{2+}$ -t mobilizál az intracelluláris raktárakból (endoplazmás reticulum, mitochondrium). Módszerek az intracellularis szabad  $Ca^{2+}$ -szint mérésére:

- Flow citometria (áramlási citometria)
- Spektrofluorometria
- Konfokális pásztázó laser mikroszkóp

Az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  koncentráció szerepének megértését és koncentrációjának detektálását forradalmasította a különböző, ún.  $Ca^{2+}$ -szenzitív fluoresszcens indikátorok, mint a INDO-1 AM, FURA-2AM és FLUO-3AM bevezetése. A módszer lényege, hogy ezek a  $Ca^{2+}$ -specifikus fluoresszcens festékek AM-észter (acetoximetil) formájukban nem képesek  $Ca^{2+}$ -t kötni, ami nagy technológiai előnyt jelent, hiszen az extracelluláris térben 4 nagyságrenddel magasabb a  $Ca^{2+}$ -koncentráció mint a sejten belül, nyugalmi állapotban. A sejtbe bejutott festék nem specifikus hidrolázok hatására elveszti észter csoportját. Szabad formájában a festék már meg tudja kötni a szabadon, ionos formában jelenlévő  $Ca^{2+}$ -t, és így jelezni tudja a sejt egy adott stimulusra  $Ca^{2+}$ -szint emelkedés formájában adott válaszát. Ma már számos kémiai anyag áll rendelkezésre az intracellular  $Ca^{2+}$  szintek manipulálására és mérésére. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint mesterségesen megemelhető a szelektív  $Ca^{2+}$  ionophorok, mint az Ionomycin and A23187 alkalmazásával, ill. csökkenthető intracellular  $Ca^{2+}$  chelator BAPTA-AM használatával, és így hatékony eszközként szolgálnak a kérdéskör vizsgálatára.

## **XII. Beltenyésztett állattörzsek, transzgenikus és génkiütött állatok, klónozás** **(Dr. Jánossy Tamás)**

### **1. Bevezetés**

Az állatkísérleteken alapuló biológiai és orvostudományi kutatásokban rendkívül fontos, hogy a biológiai tulajdonságok, jelenségek tanulmányozására, a feltett tudományos kérdések megválaszolására a legmegfelelőbb kísérletes modellt alkalmazzuk. Ebben az optimális állatfaj kiválasztása mellett döntő jelentősége van annak, hogy a kísérleti állatok genetikai jellemzői megfeleljenek a kísérlet célkitűzéseinek. Genetikai tényezők határozzák meg az állatok tulajdonságait, beleértve a különböző fizikai hatásokkal (pl. fény, hő, ionizáló sugárzások, elektromos áram stb.), kémiai anyagokkal (pl. a szervezet működésében, szabályozásában, válaszreakcióiban szerepet játszó mediátorok, hormonok, valamint károsító anyagok stb.), kórokozó mikrobákkal (baktériumok, vírusok, gombák stb.) és idegen, illetve saját antigénnel szembeni érzékenységet. A genetikai tulajdonságok befolyásolják a kóros elváltozásokra, a betegségekre való hajlamot, de a kezelés (pl. gyógyszerek) hatékonyságát és mellékhatásait is. Természetesen nem csak a reakció kiválthatóságát, hanem annak mértékét is befolyásolják a genetikai tényezők. Emiatt egy genetikailag változatos populációban (amilyen pl. az emberi faj is) az egyes egyedek válaszreakcióik tekintetében mind minőségileg (válaszképes vagy válaszképtelen), mind mennyiségileg (alacsony, közepes, magas válasz) különbözhetnek egymástól. Ezért pl. ha egy kórokozó által előidézett betegséget akarunk tanulmányozni, olyan állatpopulációt (törzset vagy törzseket) kell választanunk, amelynek valamennyi egyede hordozza a kórokozóval szembeni fogékonyságért felelős géneket. Ezzel szemben a betegséggel szembeni ellenállóképesség vizsgálatára célszerű a kórokozóval szemben rezisztens populációt (törzset vagy törzseket) alkalmazni. Ha viszont azt kívánjuk meghatározni, hogy a kórokozó milyen gyakorisággal idéz elő betegséget egy fajban, akkor genetikailag változatos, nem szelektált kísérleti állatokat kell választanunk.

A kísérleti állatok genetikai tulajdonságait, a populáció egységességét, illetve változatosságát befolyásolni tudjuk a tenyésztési módszerek megválasztásával. Az állatok genetikai tulajdonságait tervezett módon módosítani is tudjuk (transzgenikus állatok, génkiütött állatok stb.- ld. később).

### **2. Genetikai alapfogalmak, definíciók**

Az ivaros úton szaporodó fajok esetén az utód egy-egy teljes kromoszómakészletet örököl mindkét szülőjétől, amelyek a szervezet valamennyi testi sejtjében jelen vannak. A testi kromoszómákon lévő gének esetében minden tulajdonságot egy apai és egy anyai génből álló pár kódol. Az azonos funkciójú gének a kromoszómápar mindkét tagjának ugyanazon a helyén helyezkednek el (génhely vagy lokusz). A polimorf géneknek két vagy több alléljük van. A különböző allélekben a DNS-t felépítő bázisok sorrendje (szekvenciája) eltér egymástól. Ha az utód mindkét szülőjétől egyforma DNS-szekvenciájú, vagyis azonos génallélt örököl, amely a két szülő közös ősétől származik, akkor *homozigótának*, ellenkező esetben *heterozigótának* tekinthető az adott génlokuszra nézve. Ha egy génnek van domináns és recesszív génallélje is, a domináns génallél által kódolt tulajdonság a heterozigótákban is megjelenik, míg a recesszív génallél által meghatározott tulajdonság csak akkor fejeződik ki, ha az egyed homozigóta az adott génre nézve, vagyis a kromoszómápar mindkét tagján ugyanazt a recesszív génallélt hordozza. Kodomináns öröklődés esetén a heterozigótákban mind a két szülőtől örökölt génallél által kódolt tulajdonságok megjelennek.

#### **2.1. Kültenyésztés**

Kültenyésztés esetén a rokontenyésztést igyekszünk a lehető legnagyobb mértékben elkerülni. Rokontenyésztésről akkor beszélünk, ha négy nemzedéken belül közös ős van a családfában. Ha a tenyészpárok száma 100-nál kevesebb, akkor a rokontenyésztés lehetőségét teljes mértékben ki kell zárunk, ha 100-nál több, a rotációs vagy a taláalomra történő (random) tenyésztés módszerét alkalmazzuk. A rotációs tenyésztésnél az alomtestvérek pároztatását úgy

kerüljük el, hogy a testvérpárok hím és nőstény tagjait az állatházi ketrecek között következetesen ellentétes irányban mozgatva párosítjuk, és ezt a módszert nemzedékről nemzedékre alkalmazzuk. A kültenyésztés genetikailag változatos állományt eredményez: a beltenyésztettség növekedésének (a homozigóta génhelyek gyarapodásának) mértéke nemzedékenként kisebb, mint 1%. Ezt beltenyésztési együtthatónak ( $F$ ) nevezzük. A kültenyésztett (outbred) állomány egyedei tehát a génhelyek túlnyomó részében heterozigóták, az apai (A) és az anyai gének (B) alléljai különbözőek (AB). A populáció *anizogén*, ami azt jelenti, hogy egyedei különböző genotípusúak.

## 2.2. Beltenyésztés

Beltenyésztés esetén szigorú rokontenyésztést végzünk. Leggyakrabban sorozatos testvér-testvér párosztatást alkalmazunk (a tenyészpár tagjai alomtestvérek), esetleg a fiatalabbik szülőt párosítjuk egy ellenkező nemű utóddal (a fiatalabb szülő esetén kisebb a mutáció fellépésének és ezáltal a szülő és az utód közötti genetikai eltérés kialakulásának esélye). Ez egyre növekvő homozigótaságot (genetikai sodródás) eredményez: a genotípus egyre több génhelyen egyforma génallélt tartalmaz (AA vagy BB az AB helyett). A homozigótaság zárt tenyészetben is növekszik. Zárt tenyészetéről akkor beszélünk, ha kívülről sem rendszeresen, sem időszakonként nem juttatunk be tenyészállatokat. Egyensúlyban lévő zárt tenyészetben az egyedek fele heterozigóta (AB), másik fele homozigóta (AA és BB).

## 2.3. Beltenyésztett törzs

Ha a beltenyésztést (testvér-testvér vagy szülő-utód párosztatást) több, mint 20 nemzedéken át folytatjuk *beltenyésztett (inbred) törzs* jön létre, amelyben az összes génlokusz 98,4%-a homozigóta ( $F=98,4\%$ ). Ezt a törzset - a fennmaradó genetikai eltérések ellenére – azonos genetikai állományúnak, azonos genotípusúnak vagyis *izogénnek* tekintjük. Az ugyanabból a beltenyésztett törzsből származó állatokat *szingéneknek* is szoktuk nevezni.

Izogén törzsek esetében a törzs bármely tagja a kilökődés jele nélkül elfogadja a törzs bármelyik másik azonos nemű tagjából átültetett szöveteket, mivel a törzs minden egyedének hisztokompatibilitási (szöveti egyezőségi) antigénjei azonosak. A hím állatokból származó transzplantátumok az Y kromoszómán található, gyenge hisztokompatibilitási antigént kódoló génlokusz miatt kilökődhetnek nőstény egyedekben. A Silvers által bevezetett bőrtranszplantációs módszer kiválóan alkalmas az izogenitás ellenőrzésére.

A teljes homozigótaság elérését késleltethetik a spontán bekövetkező mutációk. Ezek ritkák, de előfordulhatnak. A spontán mutációk előfordulásának lehetősége miatt a beltenyésztett állattörzsek fenntartása is testvér-testvér párosztatással történik. A beltenyésztett állattörzsek létrehozása a kis laboratóriumi emlősök (egér, patkány, tengerimalac, hörcsög, nyúl) esetén a legkönnyebb, mert ezek – különösen az egerek és patkányok – szaporák és rövid tenyészidejűek.

## 3. A beltenyésztett rágcslótörzsek története

Történetük összefügg a daganatkutatók (egerek) és a multifaktoriális öröklődés (tengerimalacok) tanulmányozásának történetével. Mendel munkásságának újrafelfedezése vezetett 1900-ban a tumoroknak, mint örökletes betegségeknek a vizsgálatához. A kezdeti kísérletekben az egértényészetekben spontán keletkezett daganatokat kezdték el vizsgálni. Jensen, Loeb, Ehrlich, Tyzzer megkísérelték ezeket az egértumorokat más egerekbe átültetni, az átültetett daganat azonban többnyire nem eredt meg, vagy átmeneti növekedés után visszafejlődött. Jensennek (1903), majd Loebnek (1908) sikerült egy-egy egértumort sorozatos áoltásokkal fenntartani viszonylag beltenyésztettnek számító egerekben. Little (1914) megállapította, hogy a daganatok kilökődése (rejekció), illetve a tumortranszplantátumok elfogadásával szembeni fogékonyság több dominánsan öröklődő génen alapul. Ez később elvezetett a hisztokompatibilitási gének felfedezéséhez és a sejtek által közvetített, celluláris immunválasz tanulmányozásához.

Időközben Rommel (1906) beltenyésztési kísérletbe kezdett tengerimalacokkal. Ezeknek az állatoknak a leszármazottai a ma is széles körben használt 2-es és 13-as törzsű tengerimalacok. Munkáját Wright folytatta,



aki megalkotta a beltenyésztés általános matematikai elméletét. Az ő nevéhez fűződik a beltenyésztési egyűthetőség bevezetése (1922).

Helen King 1909-ben kezdett hozzá a patkányok beltenyésztéséhez (PA és WKA törzsek). Little ugyanebben az évben indította el azoknak az egereknek a beltenyésztését, amely DBA törzs kialakulásához vezetett. Bagg 1913-ban hozta létre albinó egereiből a BALB törzset, amelyből Snell laboratóriumában az 1930-as években jött létre a BALB/c törzs. Strong 1920-ban egy DBA nőstény egérnek Bagg-albinó hímmel történt keresztezéséből létrehozta a CBA és a C3H törzset, majd 1921-ben Bagg-albinóknak Cold Spring Harbor albinókkal való keresztezésével kialakította az A törzset is. Little teremtette meg a C57 törzsek családját (C57BL, C57BR, C57L, C58). 1937 előtt jött létre a C57BL törzs 6-os és 10-es alvonala. 1920-1930 között fejlesztették ki a ma is használt beltenyésztett egér- és patkánytörzsek jelentős részét. 1929-ben Little Bar Harbor-ban (Maine) megalapította a Jackson-laboratóriumot, amely a beltenyésztett törzseket állandóan továbbfejlesztette, új mutációkat izolált, a törzsek jellemzőit tanulmányozta. A laboratórium rendelkezik a legnagyobb gyűjteménnyel beltenyésztett egértörzsekből, és ezek beszerzésének egyik fő forrása.

#### 4. A beltenyésztett törzsek nevezéktana

A törzsek nevezéktanának szabályait a nómenklatúra bizottság alkotta meg 1952-ben. A törzsek nevét 1-4 nagybetű jelöli (pl. egértörzsek: A, AKR, CBA, DBA stb.; patkánytörzsek: LEW, WAG, BN, PVG stb.). Számokat csak a korábban elterjedt és elnevezett törzsek nevében szabad alkalmazni (pl. egér: C3H, C57BL stb.; patkány: F344, AS2, M520 stb.). *Altörzsekről* beszélünk, ha a beltenyésztés során a törzs a 8-19. testvérpároztatás között két vagy több ágra oszlik, vagy ha ugyanabban a tenyészetben két párhuzamos vonal genetikailag eltér. Ezt a törzsnév utáni törtjelet követő szám vagy szimbólum jelöli (pl. C57BL/6, illetve C57BL/10). Új *alvonal* jön létre, ha egy törzs átkerül egy másik laboratóriumba, ahol hosszú ideig tenyésztik. Ennek során genetikai változások is kialakulhatnak. Az alvonal nevét a tenyésztő vagy a laboratórium nevének rövidítése jelöli (pl. Sc = Scott, Sn = Snell, He = Heston, J = Jackson-laboratórium, Ca = Cambridge), amelyek történeti sorrendben követik egymást (pl. C57BL/10ScSn). Új alvonal keletkezik akkor is, ha a törzset valamilyen manipulációnak vetik alá (pl. az utódokat más törzshöz adják ki dajkaságba). Ezek a beavatkozások ugyanis változásokat idézhetnek elő a törzsben (pl. a dajkaság befolyásolhatja a vírushordozást). Ezért a tenyésztés során végzett különböző beavatkozásokat ugyancsak meg kell jelölni a névben. A leggyakoribb törzsmanipulációk és szimbólumaik a következők:

- f (foster nursing): Az utódok dajkaságba adása egy másik törzshöz: pl. C57BL/10fC3H. Ez az eljárás alkalmazható pl. a specifikált patogénmentes (*specified-pathogen-free* = SPF) törzsek létrehozásakor. A magzatokat megszületésük előtt a terhes méhvel együtt steril körülmények között eltávolítják, és dajkaságba adják egy SPF törzsű anyának.
- e: A törzset egy másik törzsbe történő embriótranszfer révén hozták létre.
- h (hand rearing): A mesterséges táplálást jelöli.
- o: Az ováriumtranszplantációt jelöli.
- p (preservation): A petesejt cseppfolyós nitrogénben való tárolását jelöli.

Az alvonalakat jelölő szimbólumok időrendi sorrendben követik egymást (pl. C57BL/10ScSnfC3H: a C57BL/10-es törzset átadták tenyésztésre J. P. Scott-nak, aki továbbadta G. D. Snell-nek, majd dajkaságba adták C3H törzsű egereknek).

##### 4.1. Rövidített törzsnevek

Ha a törzs neve túl hosszú, célszerű rövidíteni, de a teljes nevet is meg kell adni a szövegben. Ajánlott rövidítések egértörzsek esetén: AKR=AK, BALB/c=C, C3H=C3, C57BL=B, C57BL/6=B6, C57BL/10=B10 stb.

##### 4.2. Beltenyésztési depresszió (leromlás)

A szaporodási képesség, életképesség, egészség stb. csökkenése a beltenyésztés első néhány generációjában. Ennek oka az, hogy beltenyésztés kezdetén a káros recesszív gének



homozigótasága is létrejön. A későbbiekben ezek kisselektálódnak, ezért a kialakult törzsben már nem fordul elő.

#### 4.3. F<sub>1</sub> hibridek

Két különböző beltenyésztett törzs keresztezéséből származó utódok. Minden egyed izogén és heterozigóta mindazon génlokuszokra, amelyekben a két szülői törzs különbözik (pl. a hisztokompatibilitási génekre). Az F<sub>1</sub> hibridekben megfigyelhető *hibrid vigor* vagy heterózis a beltenyésztési depresszió ellentéte: a káros recesszív gének elfedésén alapul. Az F<sub>1</sub> hibrid törzsek nevét a következőképpen képezzük: (anyai törzs neve x apai törzs neve)F<sub>1</sub>, pl. (BALB/c x C57BL/6)F<sub>1</sub>, amelynek rövid neve CB6F1.

#### 5. A beltenyésztett törzsek alkalmazása a biológiai és orvosi kutatásokban

- A faj tulajdonságainak, a genetikai tényezőknek a vizsgálata
- Biológiai hatások, válaszreakciók tanulmányozása
- Élettani törvényszerűségek, mechanizmusok vizsgálata
- Immunológiai, immunogenetikai törvényszerűségek, az immunrendszer működésének tanulmányozása, a transzplantációs és a tumorimmunitás vizsgálata
- Gyógyszerek hatásainak, hatásmechanizmusának elemzése
- Kóros állapotok, betegségek modellezése: patomechanizmus, terápiás lehetőségek vizsgálata

A fajok (egér, patkány, tengerimalac, hörcsögök, nyulak, csirkék stb.) és a törzsek széles választéka (elsősorban egerek és patkányok) áll rendelkezésre.

##### 5.1. Koizogén törzsek

Ha egy beltenyésztett törzsben egyetlen gént érintő mutáció lép fel, a mutációt fenntarthatjuk egy új beltenyésztett törzs kialakítása révén. Az új törzset, amely az eredetől egyetlen génlokuszban különbözik, koizogén törzsnek nevezzük. A koizogén törzs nevét úgy képezzük, hogy az eredeti törzs (altörzs, alvonal) nevéhez kötőjellel hozzákapcsoljuk a gén jelét, amelyet dőlt betűkkel jelölünk. A CBA/Ca-*nu* egértörzs pl. a CBA/Ca törzs koizogén törzse, amely a *nu* (*nude* = meztelen) szőrtelenséget és a tímuszhiányt meghatározó génmutációkat hordozza e gének normális alléljai helyett. A mutáció betegség alapját képezheti (ld. a következő példákat):

*Egér:*

Anémia (nemhez kötött vérszegénység = sex-linked anemia): *sla* gén

Cukorbetegség (diabétesz): *db* gén

Elhízás (obezitás): *ob* gén

Aminosavanyagcsere-zavarok: *his* (hisztidinémia), *pro* (prolinémia) gén

Vesebetegség (kidney): *kd* gén

Izomsorvadás (dystrophia muscularis): *dy* gén

Embrió-rendellenesség: *t*-allél

Szőr- és thymusmentes (*nude*): *nu* gén

*Patkány:*

Diabetes insipidus (fokozott vizeletürítés): *di* gén

Szőr- és thymusmentes: *rnu* gén

Bilirubinémia (sárgaság): *j* gén

A koizogén egértörzsek lehetőséget nyújtanak a gén fenotípust meghatározó szerepének vizsgálatára, a betegségeket előidéző géneket hordozó törzsek pedig kiválóan alkalmasak a betegség tanulmányozását biztosító modellek kialakítására.

## 5.2. Kongenikus törzsek, kongenikus rezisztens törzsek

Ebben az esetben a "donor" törzs (nem kell feltétlenül beltenyésztettnek lennie) egy kiválasztott génjét vagy génrégióját megfelelő tenyésztési módszerrel juttatjuk be egy beltenyésztett ("recipiens") törzsbe. Az alkalmazandó tenyésztési módszer függ attól, hogy domináns, kodomináns vagy recesszív génről van-e szó. Rendszerint a visszakeresztezést alkalmazzuk. Domináns vagy kodomináns gének esetén először a két törzs keresztezésével  $F_1$  hibrideket állítunk elő, majd ezeket a "recipiens" törzzsel visszakeresztezzük (*backcross*). Az utódok közül kiválasztjuk azokat, amelyek hordozzák a „donorgént”, és ezeket visszakeresztezzük a „recipiens” törzzsel. Ezt legalább 12-szer meg kell ismételni (minden alkalommal szelektálva a „donorgénre”). Az utolsó visszakeresztezést követően az utódok közül egy olyan hímet és nőtényt kell kiválasztanunk, és egymással pároztatnunk, amelyek heterozigóták a „donorgénre” nézve, majd az utódok közül két homozigóta testvért kell pároztatnunk (intercross). Az új kongenikus törzs tartalmazza a „donorgént” (a „recipiens” törzs ennek megfelelő génjét viszont nem), az összes többi génje (háttérgén) a sorozatos visszakeresztezések következtében megegyezik a „recipiens” törzs háttérgénjeivel.

Snell 1946-ban ezzel a módszerrel hozta létre kongenikus rezisztens egértörzseket. A szelekció az átültetett tumorokkal szembeni ellenállóképességen, rezisztencián (a tumor nem eredt meg vagy visszafejlődött a recipiensekben), illetve a bőrtranszplantátumok kilökődésén (rejekció) alapult. Ezek segítségével igazolta, hogy a transzplantátumok rejekciójáért elsősorban egy polimorf génrégió, a fő hisztokompatibilitási komplex (*major histocompatibility complex* = MHC) felelős. Ez egerekben megegyezett a Gorer által leírt II. vércsoportantigén kódoló polimorf génnel, melyet H-2-nek neveztek el.

A kongenikus törzsek elnevezése a következőképpen történik: recipiens törzs neve.donor törzs neve. Leggyakrabban a rövid neveket használjuk, pl. B10.D2. Ebben az esetben a recipiens törzs a C57BL/10 (B10), a donor törzs a DBA/2 (D2). A B10.D2 törzs háttérgénjei a megegyeznek a B10-ével, a H-2 génjei pedig a D2-ével ( $H-2^d$ ), vagyis a B10.D2 törzs csak a H-2 génkomplexben különbözik a B10-től, amely a  $H-2^b$  haplotípust hordozza. A H-2 kongenikus egértörzsek kiválóan alkalmasak a traszplantációs immunológiai és immungenetikai kutatásokra.

## 5.3. Rekombináns beltenyésztett törzsek

E törzseket két nem rokon beltenyésztett törzs keresztezéséből származó  $F_2$  nemzedékből állítják elő több mint 20 generáción át végzett testvér-testvér pároztatással. Az első széles körben használt rekombináns egértörzseket a BALB/cBy (C) és a C57BL/6By (B6) törzs keresztezéséből állították elő, és CXBD-nek, CXBE-nek, CXBG-nek, CXBH-nak, CXBI-nek, CXBJ-nek és CXBK-nak nevezték őket (Bailey, 1971). A rekombináns törzsek elnevezése úgy történik, hogy a két szülői törzs rövid nevét egy X nagybetűvel választjuk el, amelyet egy kötőjellel kapcsolt szám követ (pl. az AKR/J és C57L keresztezéséből előállított törzsek neve AKXL-1, -2, -3 stb.). Ez utóbbi szabályt nem alkalmazzuk a régóta használt CXB törzsekre. A rekombináns törzsek random eloszlásban „összekeveredve” hordozzák a két szülői törzs génjeit. Mivel beltenyésztett törzsek, az egyes törzsek minden tagjának genetikai állománya azonos, vagyis izogének. Alkalmazásuk lehetővé teszi új polimorf génlokuszok azonosítását és térképezését, a több gén által meghatározott, ún. poligénes tulajdonságok tanulmányozását (pl. élettartam, spontán fellépő és kiváltott betegségek iránti fogékonyság), valamint morfológiai, élettani, biokémiai és viselkedési jellemzők biometriai elemzését, gyógyszerhatások vizsgálatát.

## 5.4. Transzgenikus állatok

Transzgenikusnak azokat az állatokat nevezzük, amelyek genomja kívülről bejuttatott idegen gén(ek)e)t tartalmaz. A transzgén (*transgene*) szó *transferred genetic material* (átvitt

genetikai anyag) kifejezésből származik. Gordon és munkatársai 1981-ban számoltak be arról, hogy sikerült idegen DNS-t bejuttatniuk emlősállatokba, és ezáltal transzgenikus egereket létrehozniuk. Később transzgenikus patkányokat, birkákat, kecskéket, szarvasmarhákat, nyulakat és csirkéket is előállítottak. A transzgenikus állatok a biológiai és orvostudományi kutatásokban lehetővé teszik a gének, illetve termékeik funkcionális hatásainak *in vivo* vizsgálatát, betegségek állatkísérletes modelljeinek a létrehozását; a mezőgazdaságban kedvezőbb tulajdonságú (pl. nagyobb tejhozam, hústermelés, ill. ellenállóképesség a betegségekkel szemben) állatok létrehozását; a biotechnológiai és gyógyszeriparban specifikus emberi fehérjék (pl. hormonok, véralvadási faktorok, enzimek, citokinek stb.) termeltetését és pl. a tejjel való kiválasztását. A tejből az emberi fehérjék nagy tisztasággal kivonhatóak.

A bejuttatni kívánt génkonstrukció előállítása *in vitro*, rekombináns DNS technológia segítségével történik. Ez a funkcióért felelős struktúrgénen (pl. inzulingén) kívül tartalmazhat a génnek a genom megfelelő helyéhez való célzott kötődését irányító vektorgénszakaszt, továbbá a génműködést szabályozó (regulátor) promoter (elindító) és enhancer (fokozó) DNS-szekvenciákat is. Ezek biztosítják, hogy a gén expressziója (kifejeződése) csak bizonyos szövetekben következzen be. Például a limfoid promoterek és enhancerek teszik lehetővé az átrendeződött antigénreceptor-gének expresszióját a limfocitákban, az inzulinpromoter az inzulingének kifejeződését a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben. Olyan promoter elemeket is beépíthetünk, amelyek gyógyszerekkel (pl. tetraciklin, dexamethason), hormonokkal (pl. inzulin), citokinekkal stb. kapcsolhatók be, ami lehetővé teszi a transzgén átíródásának akaratlagos befolyásolását. A génkonstrukciókba beépíthetők a sejteket bizonyos sejtölő gyógyszerekkel szemben ellenállóvá (pl. neomicinrezisztencia-gén), illetve fogékonyá tevő gének (pl. a ganciclovir-érzékenységet biztosító timidinkinázgén) is. Ez a génbevitt (transzfekció) követően lehetővé teszi a sikeresen transzfektált sejtek *in vitro* szelekcióját: a neomicin hatására a génkonstrukciót nem tartalmazó, normál emlőssejtek, ganciclovir jelenlétében pedig timidinkinázgént kifejező sejtek pusztulnak el (ld. később).

A génkonstrukciót háromféle módon juttathatjuk be: 1. mikroinjekcióval; 2. embrionális őssejtek transzfekciójával és átvitelével; 3. vírus (adenovírus, retrovírus) által közvetített génátvitellel.

*Transzgenikus állatok létrehozása mikroinjekciós módszerrel:* Gonadotrophormon-kezeléssel előidézett szuperovulációt követően hímmel pároztatják a nőtényt. A petevezetékéből nyert megtermékenyített petesejtek hím előmagjába mikroinjekcióval több száz transzgén DNS-molekulát juttatnak. A kétsejtes embriókat álvemhes nőtények petevezetékébe ültetik be. Az álvemhességet vazektómiával nemzőképtelenné tett hímekkel történő pároztatással idézik elő. A transzgén 1-50 molekulája egymást követve (tandem) illeszkedik be a kromoszóma egy random törési helyére, és egy mendeli egységként öröklődik. Mivel az integráció általában a DNS-replikáció előtt történik, a transzgenikus utódok kb. 75%-ának minden sejtje, így az ivarsejtjei is tartalmazzák a transzgént. Az idegen DNS integrációja legtöbbször nem teszi tönkre az endogén génfunkciót. A transzgént hordozó mindegyik állat heterozigóta, amelyekből homozigóta vonalat lehet kitenyészteni. A mikroinjekciós módszer minden emlős faj esetén alkalmazható. Egerek esetén a megszületett utódok kb. 2,6%-a transzgenikus, más fajok esetén ez az arány 0,7-1,6%.

A transzgenikus állatok nevezéktana a következő: A recipiens törzs nevéhez kötőjellel kapcsoljuk a transzgén szimbólumát, pl. C57BL/10J-*TgN*(XXXX)*Y*, ahol *Tg* = transzgenikus, *N* = nem homológ (vagy *H* = homológ) beillesztés, XXXX = a gén neve, *Yyy* = a laboratórium kódja

## 5.5. Génkiütött (*knockout*, KO) állatok

A transzgén célzott beillesztése egy endogén gén közepébe általában szétrombolja a gént (géndisruptió), megszünteti a gén kifejeződését, illetve funkcióját. Ezt leggyakrabban a homológ rekombinációval érik el. Ennek lényege, hogy a célba vett génnel majdnem azonos szekvenciájú, ún. homológ gént készítenek, amely a sejtbe juttatva kicserélődik a megcélzott génszakasszal. A vektort úgy is meg lehet tervezni, hogy a homológ rekombináció az endogén gén egy vagy több exonjának eltávolítását (delécióját) idézze elő. A génkiütött állatokban a génfunkció megszűnésének következtében létrejövő változásokból következtethetünk a gén, illetve termékeinek fiziológiás szerepére. E módszerrel „egygénés” rendellenességeken alapuló betegségek állati modelljei is létrehozhatók.

### 5.5.1. Génkiütött állatok létrehozása az embrionális őssejtes módszerrel

Először egy célba juttató vektort használnak a gén diszruptiójára egy embrionális őssejtvonalban. Ez a homológ génszakaszok között tartalmazza a neomicinrezisztenciát kódoló gént (*neo*) és az egyik homológ génhez kapcsolódva a ganciclovirrel szembeni érzékenységet felelős timidinkináz génjét (*tk*) is. Az embrionális őssejteket a hólyagcsíra belső sejtjeiből nyerik. Ezek pluripotens őssejtek, amelyek *in vitro* szövetkultúrában tenyésztethetők. Képesek differenciálódni is, és így létre tudják hozni az érett szervezet valamennyi sejtjét, beleértve az ivarsejteket is. A vektorgént hozzáadják az őssejttenyészethez, amely a sejtek egy részébe beépül. Homológ rekombináció esetén a genomba beépült idegen gén tartalmazza a *neo* gént, a *tk* gént viszont nem. Emiatt a transzfektált sejtek rezisztensek lesznek mind neomicinre, mind ganciclovirre. Random, nem homológ beépülés esetén viszont nem csak a *neo*, hanem a *tk* is gén beillesztődik. Az ilyen sejtek neomicinre rezisztensek, ganciclovirre viszont érzékenyek lesznek. Ha a transzfekciót követően neomicint és ganciclovirt adnak a sejttenyészethez, a neomicin elpusztítja nem transzfektált sejteket, a ganciclovir pedig azokat transzfektált sejteket, amelyekbe vektor nem homológ rekombinációval épült be. Így csak a homológ rekombináción átesett, génkiütött embrionális őssejtek maradnak életben. A kívánt rekombináció jelenléte igazolható DNS-vizsgálattal [Southern blot hibridizációval, illetve polimeráz-láncreakcióval (polymerase chain reaction, PCR)]. A szelektált őssejteket hólyagcsírába fecskendezik *in vitro*, és átlátszó nőstényekbe ültetik. A kifejlődő állatok kimérák lesznek, azaz egyes szöveik a génkiütött embrionális őssejtekből, míg mások a normál hólyagcsírasejtekből alakulnak ki. Az ivarsejtek szintén kimérák lesznek, de mivel ezek haploidok (csak egy kromoszómakészletet tartalmaznak), csak egyes sejtek hordozzák a szétrombolt gént tartalmazó kromoszómát. Ha a kiméra állatokat normál állatokkal pároztatják, és akár a spermium, akár a petesejt tartalmazza génkiütött kromoszómát, a normál partner ivarsejtjével való egyesülést követően az utódok heterozigóták lesznek a mutációra. Ha ilyen heterozigótákat pároztatnak, a mendeli szabályoknak megfelelő arányban kapnak homozigóta génkiütött egereket, amelyekben az adott gén nem fejeződik ki.

## 5.6. "Génbeültött" (*knock-in*) állatok

A homológ rekombinációt lehet használni egy normál génszekvenciának egy másik funkcióképes exogén génnel való kicserélésére is. A knock-in állatok a transzgént a genom meghatározott helyén tartalmazzák, szemben a konvencionális transzgenikus egerek esetén megfigyelt random beépüléssel. Ezt a módszert alkalmazzák, ha a transzgén expresszióját endogén promoter vagy enhancer régióknak kell befolyásolniuk. Ebben az esetben a célba juttató vektor tartalmazza a bejuttatni kívánt külső gént, ezen kívül egy olyan endogén génnel homológ szekvenciákat is, amelyek szükségesek a génnek a rekombináció helyéhez való kötéséhez.

A fenti konvencionális génmanipulációs technikák rendkívül hasznosnak bizonyultak, de vannak bizonyos hátrányaik is: 1. A gén mutációját a fejlődés során kompenzálhatja más géntermékek megváltozott expressziója, így a módosított gén funkciója rejtve maradhat. 2. Egy konvencionális génkiűtött állatban a gén jelentőségét nem lehet csak egyetlen szövetben vagy az egyedfejlődés egy adott időpontjában könnyen meghatározni. 3. A működőképes szelekciós marker gén - mint pl. a *neo* gén - permanensen beépül a genomba, amely befolyásolhatja az állat fenotípusát. A génkiütéses módszer finomítását teszi lehetővé a bakteriofág eredetű Cre/*loxP* rekombinációs rendszer alkalmazása, amely a fenti hátrányok egy részét kiküszöböli. A Cre enzim egy DNS-rekombináza, amely a *loxP* DNS-szekvenciát ismeri fel, és az enzim kivágja az olyan génszakaszokat, amelyeket két *loxP*-szakasz határol. Az ezen az elven alapuló rekombinációs rendszer segítségével eltávolítható a *neo* gén a hozzákapcsolódó homológ szekvenciákkal együtt a génkiűtött állatokból. Megfelelő promoterek segítségével a *cre* gén kifejeződése, vagyis a Cre enzim szintézise és a géndelécio a kívánt szövetekre korlátozható. Szteroid által indukált promotert is lehet használni, ilyenkor a gén eltávolítása csak akkor következik be, ha az állatoknak megfelelő dózisban dexametasont adunk. A Cre/*loxP*-módszer alkalmazható knock-in állatok létrehozására is. Ebben az esetben a *loxP*-szekvenciát a *neo*-gén és a célba juttató homológ szekvencia mellé helyezik, a bevinni kívánt génszakasz mellé viszont nem. Ezért az exogén gén a kívánt helyen marad a genomban a Cre által közvetített delécio után.

### 5.7. Klónozott állatok

A klón lényegi tulajdonsága, hogy az utód(ok) genetikai állománya teljesen megegyezik a kiinduló szervezetével. A sejtek osztódásakor (pl. megtermékenyített petesejt, testi sejtek osztódása) lényegében ugyanannak a kiinduló sejtnak a klónjai jönnek létre. A többsejtű szervezet klónozásának módszerei a következők:

1. *Az embrióosztási (embryo splitting) technika.* A jó tulajdonságokkal rendelkező háziállatok - pl. szarvasmarhák - esetében rutinszerűen használt klónozási eljárás, amellyel mesterségesen állítanak elő egypetűjű ikreket. A módszer lényege, hogy egy petesejtet mesterségesen termékenyítenek meg egy spermiummal, majd a megtermékenyített petesejtet (zigóta) osztódni hagyják nyolc sejtből álló embrióig. Ekkor az embriót két négysejtes, vagy leggyakrabban négy kétsejtes darabra osztják. A nyolcsejtes állapotig még nem indul meg a sejtek differenciálódása, és az így kapott embriók genetikailag teljesen azonosak lesznek egymással, mint az egypetűjű ikrek. Ezért az eljárást ikerkészítésnek is nevezik (embryo twinning). Az utódok elsősorban nem is szüleikre, hanem egymásra hasonlítanak. Az elválasztott embriókat ezután addig engedik fejlődni, amíg beültethető lesz egy álvemhes nőstény állat méhébe. Ezt követően már egy normális lefolyású terhesség és szülés következhet.

2. *Szomatikus sejt magjának átvitele [somatic cell nuclear transfer (SCNT)].* Ezt a módszert alkalmazták a skóciai Roslin Intézetben Ian Wilmut és Keith Campbell 1997-ben a Dolly nevű bárány létrehozásakor. A sejtmagátvitelhez két sejt szükséges: egy sejtmagdonor sejt és egy megtermékenyítetlen petesejt. Ez könnyebben befogadja a beültetett sejtmagot, mint a megtermékenyített petesejt. A petesejt alkalmasabb recipiens sejtnak, mint az egyéb sejtek, mert könnyebb osztódásra készíteni. A sejtmagátvitel lépései a következők:

1. Donorsejtként egy testi sejt szolgál. Dolly esetében ez egy emlőmirigysejt volt, amelyet *in vitro* tenyésztettek. A donor sejtet ezután főtális borjúsavó nélküli tápfolyadékba helyezték, amelyben a sejtosztódás leállt, és a sejtek G<sub>0</sub> vagy nyugalmi fázisba kerültek. Ez szükséges ahhoz, hogy a nyugvó petesejt befogadja a donorsejtből származó sejtmagot.
2. A petesejtből el kell távolítani sejtmagot. A genetikai információ legnagyobb részét ez tartalmazza, de a mitokondriális DNS is tárol kódokat. A donorsejtet az enukleált

petesejt közelébe helyezik, majd 1-8 órával a mag eltávolítása után elektromos stimulust alkalmaznak. Ennek hatására a donorsejt (vagy kivett magja) összeolvad az enukleált petesejttel, és aktiválja a sejtosztódást. A differenciált donorsejt magjának genetikai programja a petesejtben lenullázódik, a sejt differenciálatlan állapotba kerül, ismét pluripotenssé válik. Ha az embrió túlél, 5-6 napig egy birka petevezetékében növekedni hagyják (itt jobban túlélnek, mint szövettényészetben).

3. Amikor eléri a kb. 100 sejtből álló blasztoméra-állapotot, egy dajka anyabirka méhében ültetik az embriót, amely kihordja a terhességet. A megszülető utód genetikailag pontos másolata a sejtmagdonor állatnak. Ezt az eljárást reprodukív klónozásnak nevezik. Dolly a 277 próbálkozásból született meg. A blasztoméra sejtjei embrionális őssejtforrásként is felhasználhatók.

1998-ban Teruhiko Wakayama and Ryuzo Yanagimachi a Hawai Egyetemen Ian Willmut módszerét (Roslin-módszer) módosítva kidolgozta a Honolulu-módszert, amelynek segítségével sikerült egereket klónoznia. A klónozott utódok képesek voltak szaporodni, és ivaros úton fenntartani a klónt.

Állatokban a klónozás alacsony sikerességének fő oka valószínűleg az, hogy a donor sejtmag nem mindig reprogramozódik teljesen. A kromatintranszfer egy új klónozási technika, amelynek célja, hogy csökkentse ezeket a problémákat. Ennek során a klónozendó állat sejtjét kezelik a célból, hogy a sejt differenciálódási molekulákat eltávolítsák, mielőtt a sejtmagot kiveszik.<sup>30, 72-74</sup>

### **XIII. Neurológiai modellek (Dr. Farkas Tamás, Dr. Kis Zsolt, Dr. Toldi József)**

E fejezet célja, hogy áttekintést adjon a csökkent agyi keringés következményeinek kísérletes vizsgálatáról, a gyakorlatban alkalmazható neurológiai kísérletes modellekről, a fontosabb módszerekről és kivitelezésükről. A keringési rendszer betegségei között jelentős arányban szerepelnek az elégtelen agyi keringésre visszavezethető problémák. Az agyi ischaemia a harmadik leggyakoribb halálok a fejlett ipari országokban. Becslések szerint évente 4.7 millió ember hal meg a Földön elégtelen agyi keringés következtében, de beszédes adat hogy évente mintegy 700000 ember kap első alkalommal, vagy ismételten szélütést (*stroke*-ot). A túlélők között nagyon sokan szenvednek végleges fizikai és/vagy szellemi károsodást, és szorulnak hosszú évekre ápolásra, gondoskodásra. Mindezek aláhúzzák az elégtelen agyi keringés tanulmányozásának szükségességét. Az agyi ischaemia következményeinek megfigyelésére sokféle modell alkalmazható, az alábbiakban a leggyakrabban használtak közül is csak néhányat tudunk ismertetni.

#### **1. Globalis ischaemiás modellek**

Az elnevezés arra utal, hogy időlegesen a teljes agy keringése csökken, vagy megszűnik. Az agyi keringés megszűnése pl. a szívműködés leállásakor fordul elő, ez az állapot mindaddig fennáll, míg az újraélesztés el nem kezdődik. A központi idegrendszeri következményeket jól lehet vizsgálni az ún. *four vessel occlusion* (4VO) modellben.

##### **A 4VO modell**

Patkányok esetében az agy vérellátását alapvetően négy nagy artéria biztosítja: a két arteria vertebralis és a kétoldali a. carotis communisból eredő a. carotis internák. Ha az agy vérellátását időlegesen szüneteltetni kívánjuk, akkor az erek közti összeköttetést biztosító Willis-kör miatt mind a négy ellátó artériában fel kell függeszteni a keringést (ha bármelyikük átjárható marad, akkor az – ha csökkent mértékben is – de biztosít bizonyos szintű vérellátást).

Meg kell itt említeni, hogy ugróegérben súlyos globális ischaemia idézhető elő a két a. carotis communis lekötésével vagy leklippelésével, minthogy ezeknek az állatoknak inkomplett a Willis körük; nincs összeköttetés az a. basilaris és az a. carotis communis rendszere között.

A 4VO modell készítése során altatásban feltárjuk a kétoldali a. vertebralist, és kauterezéssel irreverzibilisen megszüntetjük bennük a vérátáramlást. Néhány napi gyógyulás (*recovery*) után – szintén rövid idejű altatásban - feltárjuk a kétoldali a. carotis communist, és rövid ideig (pár másodperctől 4-5 percig terjedően) leszorítjuk őket. A carotisok leszorítása alatt az agy gyakorlatilag vérellátás nélkül marad.

Itt kell megjegyezni, hogy ez a modell nemcsak a klinikai halál alatti, ill. azt követő központi idegrendszeri változások tanulmányozására alkalmas, hanem az ún. prekondicionálás mechanizmusának vizsgálatára is. Az ischaemiás prekondicionálás (IPC) vagyis rövid idejű, ismételt ischaemiás periódusok ischaemiás toleranciát (IT) eredményezhet. Ennek lényege, hogy a prekondicionáláson átesett szövet (pl. agy) kevesebb károsodást szenved el egy későbbi súlyosabb, hosszabb ideig tartó ischaemiás attack alatt.

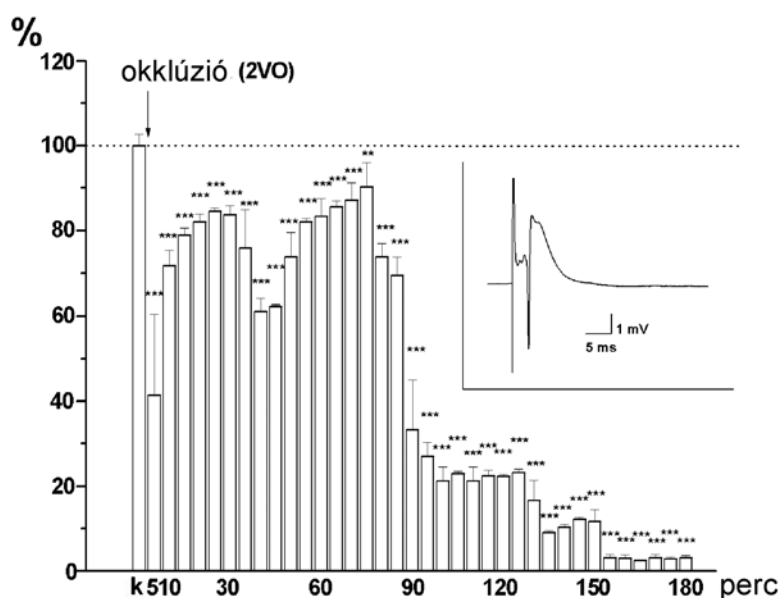
##### **A 2VO modell patkányon**

Ezzel a modellel a tranziens vagy végleges agyi hipoperfúzió következményeit tanulmányozhatjuk. A fent ismertetettnél egyszerűbb beavatkozás: a kétoldali a. carotis communis időleges, vagy végleges lekötésével a lekötés idejére nagymértékben lecsökkentjük az agyi vérátáramlást. A módszer kiválóan alkalmas a krónikus cerebrális hipoperfúzióhoz kapcsolódó neurodegeneratív betegségek tanulmányozására<sup>75</sup>.

#### **2. A globális ischaemia következményeinek vizsgálata**

### a) Elektrofiziológiai módszerek

A globális ischaemia hatásainak *in vivo* elektrofiziológiai módszerrel történő tanulmányozásához az állatokat elaltatjuk. Mindez történhet közvetlenül a 2VO/4VO előtt, után, vagy napokkal, hetekkel később<sup>76</sup>. Az állatot sztereotaxiás készülékbe helyezzük, mely lehetővé teszi a különböző agyi struktúrák pontos (tized mm felbontású) célzott elérését. Kis lyukakat fúrva a koponyán, az ingerlő/elvezető elektródokat a kívánt agyi struktúrába juttathatjuk. Patkányban a hippocampális formáció rendkívül érzékeny az ischaemiára, amit a sejtek megzavart metabolizmusa (pl. 2VO alatti lecsökkent citokróom enzim-aktivitás) és funkcionális károsodása is jelez. Mindez jól demonstrálható a hippocampus CA3-as régiójának elektromos ingerlésével és a kiváltott válaszok (un. populációs *spike*-ok) ellentétes oldali CA1-es régiójából történő elvezetésével (37. ábra). Megfelelő körülmények között lehetőség nyílik a populációs *spike*-ok akár 3-4 órás folyamatos nyomon követésére is. Akut körülmények között a válaszok amplitúdóit összehasonlíthatjuk közvetlenül az ischaemia előtt mért amplitúdókkal (önkontrollós mérés egy állatcsoporton belül), ill. hosszú túlélés esetén (2VO) az amplitúdókat az álműtött állatcsoport adataival vethetjük össze. A 2VO/4VO által okozott neuronális károsodás (hisztológia) és a hippocampális funkcióserülés (magatartási tesztek) valamint a populációs *spike*-ok amplitúdóinak csökkenése (elektrofiziológia) között pozitív korreláció állapítható meg.

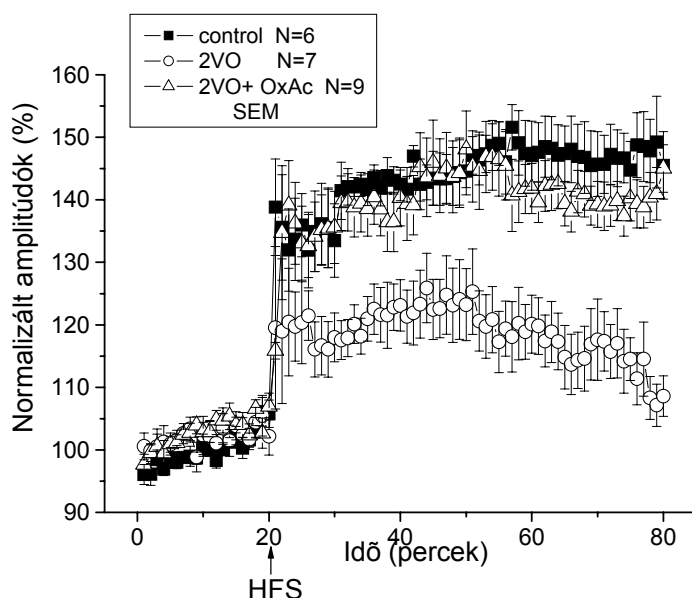


**37. ábra** A populációs *spike* amplitúdók változása 2VO-s patkányban leszorítás előtt és után. Inszet: hippocampális populációs *spike*. Kalibráció: 1 mV; 5 ms. Az oszlopok amplitúdó változásokat jeleznek (5 x 5 potenciál átlaga  $\pm$  S.D. \*P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\*P < 0.001) a kontrollokhöz viszonyítva.

Túlélő agyszelet preparátum készítésével, *in vitro* körülmények között olyan elektrofiziológiai vizsgálatokra nyílik lehetőség, amely altatott állaton nem, vagy csak sok zavaró körülmény mellett lenne végrehajtható. Az agyszeletek készítésének módszertani leírása meghaladná a fejezet kereteit, azt azonban meg kell jegyezni, hogy *in vitro* kísérletek során számos kompromisszumot kell tenni. A két legfontosabb az állatok kora és az agyszelet vastagsága. *In vitro* kísérletekhez fiatal állatok használata, de ezek (patkány esetében 20-30 napos) agyszövetének ischaemia-toleranciája sokkal jobb, mint a felnőtt állatoké. Vastag szeleteket (>400  $\mu$ m) használva mindenképp kialakul egy középponti ischaemiás góc a szelet belsejében, mivel ebben az esetben az O<sub>2</sub>, a glükóz és a káros anyagcseretermékek csak



passzív diffúzióval vándorolnak a szövetben. Vékonyabb (<300  $\mu\text{m}$ ) szeletekben pedig alig található olyan idegsejt, melynek arborizációja ne sérülne. Mindezeket figyelembe véve, készíthetünk használható hippocampális szeleteket olyan állatok agyából, melyekben előzetesen 2VO/4VO-t alakítottunk ki. E szeletekben a kizárólag excitatórikus tulajdonságú Schaffer kollaterálisok nagyfrekvenciás elektromos ingerlésével (HFS) a kiváltott válaszok amplitúdóinak tartós, több órán át megmaradó növekedését hozhatjuk létre a CA1 régióban (38. ábra). A jelenséget hosszú időtartamú potencírozódásként (*long-term potentiation*), vagy röviden LTP-ként ismerjük. Az LTP (a szinaptikus áttevődés hatékonyságának tartós megnövekedése) mindmáig a tanulás és a memória folyamatok legelfogadottabb és legintenzívebben tanulmányozott modellje, melyet először ebben a struktúrában írtak le az 1970-es években. Kétféleképp tanulmányozhatjuk az LTP indukálhatóságát a globális ischaemián átesett hippocampusban. Az álműtött állatcsoport adataival összevetve mérjük az LTP nagyságát és tartósságát az ischaemiás állatcsoportban ugyanolyan intenzitású HFS-el kiváltva, illetve vizsgálhatjuk azt is, hogy ugyanolyan mértékű LTP kiváltáshoz mennyivel intenzívebb HFS szükséges (a pulzusok számát mennyivel kell megemelni).



**38. ábra** Nagyfrekvenciás ingerléssel LTP (hosszú időtartamú potencírozódás) alakítható ki (a fekete négyzetek). Ha előzőleg 2VO-t alkalmaztunk, a potencírozódás nagymértékben csökkent és nem bizonyul tartósnak. Érdekességképpen: oxalecetsav 2VO utáni alkalmazása kivédi a globális ischaemia okozta LTP csökkenést, tehát a kezelés protektív. A kontroll csoportban LTP-t a Schaffer kollaterálisok nagyfrekvenciás ingerlésével (HFS, nyíl, 500 db, 100 Hz) alakítottuk ki. A 2VO-s csoport tagjai ezt 3 nappal megelőzően egy 30 perces 2VO kezelésben részesültek. A 2VO+OxAc csoport a 2VO kezelés után nyomban intravénás oxálecetsav injekciót (1 M, 1.5 ml) is kapott. Az ábrázolt pontok a populációs spike-ok normalizált átlagai  $\pm$  S.D.

## b) Hisztológiai módszerek

### Fluoro-Jade B (FJB) festés

Az FJB festék anionos fluoreszcein származék, amely specifikusan festi a degenerálódott idegsejteket. A jelölődött sejtek megfelelően gerjesztett fény hatására fluoreszkálnak, ami

fluoreszcens mikroszkóp alkalmazásával megfigyelhető. A módszer előnye más hisztológiai eljárásokkal szemben abban rejlik, hogy a jelölés nem antigén-antitest reakció eredménye, tehát nem immunfestés, ezért gyorsan kivitelezhető. Az FJB festéssel az ischemiás terület jól körülhatárolható. Mivel a hippocampus CA1-es régiója az egyik legérzékenyebb agyi struktúra, globalis agyi ischemia (pl. 4VO) esetén FJB festéssel ez a terület fog legkorábban jelölődni.

### **NeuN immunfestés**

Ép idegsejtek kimutatására alkalmas. A gerinces állatok idegsejt specifikus magfehérjéje elleni antitesttel (NeuN) az ép idegsejtek láthatóvá tehető. Az immunfestés során főleg az ép idegsejtek magja jelölődik, de halvány festődés a citoplazmára is jellemző. Mivel az FJB festés és a NeuN immunfestés ugyanazon metszeten egymás után is alkalmazható, a két módszer együttes alkalmazásával lehetőség nyílik az ischaemia által érintett és a teljesen ép agyi területek elkülönítésére.

### **c) Magatartásvizsgáló módszerek**

Az agy vérellátásának tranzienst kisése vagy a hosszabb-rövidebb ideig fennálló hipoperfúzió súlyos agyi károsodásokat idézhet elő, ami a kísérleti állat magatartási, memória és tanulási funkcióiban is megnyilvánulhat. A hippocampus az ischaemiás állapotokra az egyik legérzékenyebb struktúra a központi idegrendszerben, és a tanulási, tájékozódási és memóriafunkciókban mindenképpen involvált. Mindezen funkciók tesztelésére különböző magatartásvizsgáló módszereket dolgoztak ki, ezek között az egyik leggyakrabban használt az ún. Morris-féle úszó teszt (*Morris water maze*). Ennek lényege, hogy egy kör alakú medencében úszatják a kísérleti állatot (patkányt vagy egeret). Közvetlenül a vízfelszín alatt, az állat számára láthatatlan módon, elhelyeznek egy 6-8 cm átmérőjű szigetet, amin meg lehet pihenni. A szigetet kezdetben véletlenszerűen találják meg az állatok, később pedig egyre inkább megtanulják a szigetnek a környezet tárgyaihoz viszonyított helyzetét (a medence körül található tárgyak, lámpák, képek, berendezési eszközök alapján, amiket lát az állat). A sziget megtalálásának idejét vagy a megtalálásáig megtett útvonalat vizsgálva, képet kaphatunk az tanulási és memóriafunkciókról: a teszt rendkívül érzékeny a hippocampus épségére. Használatosak még az *open field* arénában és a különböző labirintusokban tett megfigyelések is („Y”, „T” maze - és ezek passzív elkerülései).

### **3. Lokális ischaemia modellek**

Ezek lényege, hogy az agynak csak bizonyos területeire, struktúráira korlátozódik az ischaemiás állapot. Lényegében ezek a kísérleti megközelítések modellezik pl. a thrombus által okozott érelzáródást és a következményként kialakuló infarktust.

#### **Az artéria cerebri media elzárása (MCAO - *Middle Cerebral Artery Occlusion*)**

Az MCAO során egy megfelelően elvékonyított, általában 4-0-ás nylon szálát vezetünk az artéria carotis internába, egészen az artéria cerebri mediáig, míg az artéria carotis externa ágát lekötjük. Ebben az esetben az okklúzióval azonos oldali hemiszfériumban viszonylag nagy kiterjedésű, fokális léziót tudunk létrehozni, ami legtöbbször érinti a hippocampust és a striátumot is.

#### **Fototrombotikus lézió**

Ezzel az eljárással viszonylag kis kiterjedésű, jól körülhatárolható fokális ischemiás léziót lehet létrehozni agykéregben, ami az egyik leggyakrabban alkalmazott *stroke* modell. A módszer alapja, hogy a fényérzékeny bengáli vörös festék (Rose Bengal - di-nátrium-tetrajodo-tetrakloro-fluoreszcein) megvilágítás hatására a vért koagulálja, belőle oxidatív

szabadgyökök szabadulnak fel, amely általában nem-nekrotikus, hanem apoptotikus sejtpusztulást eredményez (ld TUNEL festés, alább). A módszer előnye, hogy a koponya felnyitása nélkül lehet reprodukálható ischaemiás területet létrehozni. A festéket intravénásan adjuk be, majd a koponyacsonton keresztül az adott agyterületet hideg fehér fénnyel megvilágítjuk. A fény hatására az érben trombus képződik, ami az adott eret elzárja. Így az ér által ellátott agyi terület véglegesen hipoxiás lesz, kialakul az ischaemiás terület, ami általában két jól elkülöníthető területre osztható: az elhalt sejteket tartalmazó mag régióra ill. apoptózis jeleket mutató, de még működő sejteket tartalmazó ún. penumbra régióra. A két régió hisztológiai módszerekkel egymástól megkülönböztethető.

### **3.1. A lokális ischaemia következményeinek vizsgálata**

#### ***a) Elektrofiziológiai módszerek***

Az agykérgen kialakuló ischaemiás góc esetén az elektrofiziológiai elvezetésekben markáns jelek észlelhetők, a legjellemzőbb a hiperexcitabilitás. Kísérleti körülmények között mindez jól tanulmányozható a kérgi kiváltott potenciálok módszerével. Legegyszerűbb a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok használata, ui. ebben az esetben mind a szomatoszenzoros kérgen, mind a motoros kérgen vizsgálódhatunk. Az attack után, különösen az ischaemiás centrum körüli ún. penumbra régióban, fokozott az excitabilitás az ischaemia kialakulása előtti állapothoz képest, ami a kiváltott potenciálok amplitúdójának növekedésében nyilvánul meg, és ez órákon át megfigyelhető. A módszer alkalmas a neuroprotektív beavatkozások elektrofiziológiai monitorozására is<sup>77</sup>.

#### ***b) Hisztológiai módszerek***

Nagyobb ischaemiás terület kimutatására az ún. TTC-festés (trifenil-tetrazolium-klorid) módszerét alkalmazzák, mely inkább makroszkopikus vizsgálatokra (a lézió kiterjedésének meghatározása) alkalmas. A módszer lényege a minden élő szövetben megtalálható dehidrogenáz enzim működése. A működő enzim a trifenil-tetrazolium-kloridot redukálja és piros színű trifenil-formazánná alakítja, ami a szövetet is megfesti. Ahol az enzim nem működik – pl. az ischaemiás területek elhalt sejteiben – a TTC festék nem redukálódik, ezért az elhalt szövetet nem tudja pirosra színezni, így az ischaemiás terület fehér színű marad.

Gyakran alkalmazott festési eljárás a konvencionális Nissl-festés is, amely szintén áttekintő képet ad a lézióról és környezetéről. A reakció tulajdonképpen sav-bázis reakció, ahol a főleg pozitív töltésű Cresyl-ibolya festék kötődik a Nissl-testek - zömmel negatív töltésű - RNS-éhez.

Az MCAO és a fototrombotikus kérgi lézió is kiválóan vizsgálható a fentebb részletesen ismertetett Fluoro-Jade B festéssel és a NeuN immunfestéssel is.

## **4. Agyi trauma modellek**

### **Hideglézió**

A módszer alkalmazásával főleg a nekrotikus folyamatokat ill. az agyödéma kialakulását lehet vizsgálni. Az eljárás során a feltárt koponya felszínére rézből készített nikkelezett termódot helyezünk, általában 2 mm átmérőjűt, amit szárazjég és aceton 1:1 arányú keverékével előzőleg -78°C-ra hűtünk. A hűtés időtartama általában kevesebb, mint egy perc.

### **Traumás fejsérülés**

Ez a módszer a hideglézióhoz hasonlóan, inkább a nekrotikus folyamatok vizsgálatára alkalmas. Kísérleti körülmények között, erre a célra kifejlesztett szerkezet segítségével

szilikon bevonatú kis rudat ejtenek szabadeséssel a koponya egy meghatározott pontjára. A készüléket úgy állítják be, hogy kb. 0.5 J energiájú ütést tudjanak a fejre mérni.

Az agyi trauma modellekben is jól használhatók a korábban részletesen ismertetett elektrofiziológiai, továbbá hisztológiai (FJB és NeuN) vizsgálati módszerek. Elterjedt azonban az ún. TUNEL módszer is (ld. alább).

#### **Az ISEL (*In situ* End Labeling) vagy TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) technika**

Igen gyakran alkalmazott eljárás apoptotikus sejtek kimutatására. Az apoptózis kaszkád-mechanizmusának egy szakaszában a sejtek DNS állománya fragmentálódik, feltöredezik. Ilyenkor a DNS-lánc 3'-OH végei megfelelő reagensek alkalmazásával felismerhetővé válnak. Hagyományos diamino-benzidin (DAB) – tormaperoxidáz reakcióval az apoptotikus sejtek barnára színeződnek és fénymikroszkóppal láthatóvá válnak.

#### XIV. Irodalom

1. James Watson tanácsa szerint „*Take real joy in the discoveries of others; what matters most is whether the result is important*”! Idézi Judah Folkman a Nature Medicine 2003 áprilisi számában (Watson and DNA: Making a scientific revolution).
2. Ez a filozófiai elv a redundáns dolgok lehasítására szolgál (vagyis abból kell kiindulni, ami rendelkezésünkre áll - „*pluralitas non est ponenda sine necessitate*” - William of Ockham (vagy Occam) angol tudós, filozófus után).
3. Az *in vitro* kifejezést először 1934-ben alkalmazta az amerikai Gregory G. Pincus (1903–1967) a fogamzásgátló tabletta atyja (*Father of the Pill*), aki akkoriban az emberi peteérés folyamatát tanulmányozta.
4. Russel és Burch (1959) munkássága alapján elterjedt kifejezés.
5. Peters-Volleberg et al. Reg Tox Pharmacol 20:248-258, 1994.
6. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. Shock 9:1-11, 1998.
7. Schulz MJ et al. Animal and human models for sepsis. Ann Med 34:573-581, 2002.
8. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? Crit Care Med 34:S219-S222, 2004.
9. Cannon et al: The preventive treatment of wound shock. J Am Med Assoc 15:1392-1395, 1918. (“*if the pressure is raised before the surgeon is ready to check the bleeding that may take place, blood that is sorely needed may be lost*”)
10. Wiggers CJ. The present state of the shock problem. Physiol Rev 22:74-123, 1942.
11. Angle et al: Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. Shock 14:81-90, 2000.
12. Gainer et al. Hemorrhagic shock in rats. Lab Animal Sci 45:169-172, 1995.
13. Watts et al. Am J Physiol 281:G498-G506, 2001.
14. Custalow et al. Shock 15:231-238, 2001.
15. WMA - DECLARATION OF HELSINKI - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
16. Hellemans A, Bunch BH: The Timetables of Science. Simon & Schuster, New York 1988.
17. Nicoll CS, Russell SM: Editorial: Analysis of Animal Rights Literature Reveals the Underlying Motives of the Movement: Ammunition for Counter Offensive by Scientists. Endocrinology 127:985-989, 1990.
18. Newkirk I. in: Washington Post, November 13, 1983.
19. Newkirk I. in: Chronicle of Higher Education, 1999. November 12.
20. Newkirk I. in: Washingtonian 1986. August.
21. Fox M. in: The Inhumane Society, New York 1990.
22. Pacheco A. in: Gazette Mail, Charleston, 1989 January 15.
23. Matthews D. in: USA Today 1994. July 27).
24. Vlasak J. 2003 National Animal Rights Conference, Los Angeles, 2003.
25. Regan T. The Case for Animal Rights. University of California Press, Berkeley 1983.
26. Singer P. Animal Liberation. Avon Books, New York 1977.
27. Bentham J. Introduction to the Principles of Morals and Legislation. Athlone Press, London 1970.
28. Cohen C. The Case for the Use of Animals in Biomedical Research. New Engl J Med 315: 865-870, 1986.
29. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18. III. 1986, <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>.
30. Kállai László: Laborállat könyv, Royal Press Hungary Kft, Budapest, 2003.

31. NRC ILAR Commission: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Natl. Academy Press, Washington DC, 1996.
32. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA: Guide to the Care and Use of Experimental Animals I-II., Canadian Council on Animal Care, Ontario, 1993.
33. Tuffery AA: Laboratory Animals, J.Wiley, London, 1995.
34. NRC ILAR Commission: Laboratory Animal Management: Dogs, NAP, Washington DC, 1994.
35. NRC ILAR Commission: Laboratory Animal Management: Rodents, NAP, Washington DC, 1996.
36. NRC ILAR Commission: Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals, NAP, Washington DC, 1992.
37. Hellebrekers L: Állatfájdalom. A fájdalom felismerése és hatékony kezelése a gyakorlat szemszögéből. Sík Kiadó, Budapest, 2002.
38. University of Minnesota, Academic Health Center, Research Animal Resources: Restrain and Handling of Animals. Full text: <http://www.ahc.umn.edu/rar/handling.html#Restraint>
39. University of Minnesota, AHC, RAR: Euthanasia Guidelines. Full text: <http://www.ahc.umn.edu/rar/euthanasia.html>
40. EU ECC 86/606/ECC Direktíva, 1986.
41. „Biostatisztika előadás és gyakorlat. Kézirat az Interneten: <http://www.szote.u-szeged.hu/dmi>. Biostatistikai módszerek alkalmazása neuropsychiátriai vizsgálatokban, Ph.D. disszertáció. SZOTE, 56/1999.
42. Gondos T, Bede Antal, Péntes István: Monitorozás az anaesthesiában és az intenzív terápiában. In: Aneszteziológia és intenzív terápia (szerk. Péntes István), 371-390, 1998.
43. Orvostechnika és monitorozás. Egyetemi tankönyv. Szerk: Boros Mihály; 11-29, 2007.
44. Tompsett DH. Improvements in corrosion casting techniques. Ann R Coll Surg Engl. 24:110-23, 1959.
45. Kallskog O et al. Single glomerular blood flow as measured with carbonized <sup>141</sup>-Ce labelled microspheres. Acta Physiol Scand 85:408-13, 1972.
46. Hartley CJ et al. An ultrasonic pulsed Doppler system for measuring blood flow in small vessels. J Appl Physiol 37:626-9, 1974.
47. Clark ER. et al. Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. Am J Anat 57:385-437, 1935.
48. Groner W et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. Nat Med 5:1209-1212, 1999.
49. Harris AG et al. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. J Vasc Res 37:469-476, 2000.
50. Forster II RE et al. The Lung. Physiologic Basis of Pulmonary Function Tests. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, London. 1986.
51. Hantos Z et al. Mechanical impedance of the lungs and chest wall in the cat. J Appl Physiol 73: 427-433, 1992.
52. Duncan FG et al. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. J Pharmacol Meth 21: 309-315, 1989.
53. Baker LE. Applications of the impedance technique to the respiratory system. IEEE Eng Med Biol Magazine 8:50, 1989.
54. Davidson KG et al. Measurement of tidal volume by using transthoracic impedance variations in rats. J Appl Physiol 86: 759-766, 1999.
55. Halter JM et al. Positive end-expiratory pressure after a recruitment maneuver prevents both alveolar collapse and recruitment/derecruitment. Am J Respir Crit Care Med 167:1620-1626, 2003.

56. Gattinoni L et al. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158:3-11, 1998.
57. Groneberg DA et al. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 5:18, 2004.
58. Kips JC et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 22: 374-382, 2003.
59. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed. (ed. Davis J), Oxford University Press, 416, 2002.
60. *Animal Cell Culture and Technology*, 2nd ed (ed. Butler M), BIOS Scientific, 256, 2004.
61. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3rd ed (ed. Masters J), Oxford University Press, 336, 2000.
62. Langer R et al. Tissue Engineering. *Science* 260: 920-926, 1993.
63. MacArthur BD et al. Bridging the gap. *Nature* 433:19, 2005.
64. *Animal Cell Biotechnology: Methods And Protocols* (ed. Jenkins N), Humana Press, US, 320, 1999.
65. Bronzino JD: *Biomedical Engineering Handbook*. Vol 1-2. CRC/Taylor & Francis, 2006
66. *Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications*. Surya K. Mallapragada, Balaji Narasimhan (eds). Iowa State University, Ames, USA.
67. Zhang S et al. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3334-3338, 1993
68. Leor J, Cohen S: Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann NY Acad Sci* 1015:312-319, 2004.
69. Cui O et al. Cerebrum repair with PHPMA hydrogel immobilized with neurite-promoting peptides. *J Bioactive and Compatible Polymers* 18: 413-432, 2003.
70. Kisiday J. et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9996–10001, 2002.
71. Hansen CA et al. Measurement of intracellular free calcium to investigate receptor-mediated calcium signaling, *Methods in Enzymology* 191:691-706, 1990.
72. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Saunders, Philadelphia, 2003.
73. Altman PL, Dittmer Katz D. Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part 1. Mouse and Rat. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, 1979.
74. Festing MFW. Inbred strains in biomedical research. The MacMillan Press Ltd., London, Basingstoke, 1979.
75. Farkas E et al. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54:162-180, 2007.
76. Marosi M et al. Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods* 156:231-235, 2006.
77. Lür G et al. Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on the evoked cortical activity of controls and of brain-injured rats. *Cell Mol Neurobiol* 26:1505-1519, 2006.

## Táblázatok és ábrák jegyzéke

1. Táblázat „Spontán” modellek (lényegében hasonló, vagy teljesen azonos mechanizmusok működnek emberben és állatban).
2. Táblázat „Indukált” modell (ahol valamilyen manipulációra van szükség).
3. Táblázat „Negatív” modell (“miért nem?” modellek).
4. Táblázat “Árva” modellek (jellegzetességek, melyeknek fontos biológiai jelentőségük lehet - a mutáció indukció itt fontos kutatási terület lehet).
5. Táblázat Az állati (patkány) és az emberi modell közötti eltérések.
6. Táblázat Fajok közötti összehasonlítást elősegítő dózis-skálázási faktorok a testsúlyhoz viszonyítva.
7. Táblázat Rágcsáló modellek a humán szepszis tanulmányozására
8. Táblázat Eltérések a modell (kísérletes szepszis) és a valóság (humán szepszis) között.
9. Táblázat Állatkísérletes modellek a vérzéses shock tanulmányozására.
10. Táblázat Az adatbázis felépítése
11. Táblázat Az adhéziós molekulák néhány jelenleg ismert csoportja, amelyek szerepet játszanak a leukocita migráció fázisaiban.
12. Táblázat Intravitális videomikroszkópos módszerek összehasonlítása
13. Táblázat Médiumok típusai és alkalmazásuk

## Ábrák jegyzéke

1. ábra Frances Power Cobbe
2. ábra Az Állatfelszabadító Front
3. ábra Kutató bombamerényletben megsérült autója
4. ábra Állatkísérletek ellen tüntetők
5. ábra Jeremy Bentham
6. ábra Mesenterialis keringési vizsgálat kísérleti elrendezése patkány modellben
7. ábra Negatív és pozitív kontroll, valamint kezelt csoport adatainak szemléltetése 'box-whisker' diagramon (magyarázatot lásd a szövegben)
8. ábra Két, egymástól függő mérés összehasonlítása egy beavatkozás előtt és után
9. ábra Két, egymástól független csoport összehasonlítása
10. ábra Többször ismételt, egymástól függő mérések protokoll típusa egy csoporton belül
11. ábra Többször ismételt mérések összehasonlítása kettőnél több csoport esetén
12. ábra Harang (Gauss-görbe) formájú normális eloszlás, amelyet az adatok átlagával és szórásként a standard deviációval jellemezhetünk
13. ábra Torzult harang-görbe formájú nem-normális eloszlás, amelyet az adatok medián értékével és szórásként a kvartilisekkel jellemezhetünk
14. ábra Két minta esetén választható statisztikai próbák áttekintése
15. ábra Kettőnél több minta, illetve ismételt mérések esetén alkalmazható statisztikai próbák összegzése
16. ábra A kisvérköri nyomásgörbe szakaszai és jellegzetességeik
17. ábra A transzpulmonális perctérfogat mérés sémája
18. ábra A szisztémás keringés és a mikrokeringés sematikus rajza
19. ábra A mikrokeringés sematikus ábrázolása
20. ábra A transendotheliális transzport
21. ábra Az oxigén koncentrációja csökken a kapilláristól az extracelluláris folyadékon (EF) át a sejtek irányában
22. ábra A hidrosztatikus és onkotikus nyomás változása a kapillárisok mentén
23. ábra Diffúzió a kapilláris membránon keresztül.



24. ábra Leukociták a vérben és a szöveti migrációt követően
25. ábra A leukocita – endothelsejt interakció mechanizmusa
26. ábra A leukociták rollingjában, kitapadásában és transzmigrációjában szerepet játszó fő adhéziós molekulák.
27. ábra A PMN-ek transzmigrációja az endotheliumon.
28. ábra A mikrovaszkuláris vérellátás károsodása patkány vékonybélben érelzáródás hatására (India ink foltok jelzik a kapilláris károsodást)
29. ábra Mikrokeringési zavar által kiváltott sejtkárosodás kimutatása elektronmikroszkóppal.
- 30a. ábra Érhálózat a műgyanta beinjektálásakor és a szövet feloldását követően.
- 30b. ábra A vese (bal felső), vese glomerulusok (bal középső), a gyomor (bal alsó), a szív (jobb felső) és a szemfenék (jobb alsó) kapillárisainak corrosion casting képe.
31. ábra A testis laser-Doppler áramlásgörbéje
32. ábra Fluoreszcens (bal felső: leukocyták a venulákban; jobb felső: máj) és OPS intravitális mikroszkópos képek (bal alsó: a vékonybél izomrétege, jobb alsó: bél villusok)
33. ábra A Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) összetevői
34. ábra Sejtenyésztő „flaskák”
35. ábra Petri csészék
36. ábra Soklyukú tenyésztőedények
37. ábra A populációs spike amplitúdók változása 2VO-s patkányban leszorítás előtt és után
38. ábra Hosszú időtartamú potencírozódás (LTP) alakítható ki hippocampus régiókban a Schaffer kollaterálisok nagyfrekvenciás ingerlésével (HFS).

## XV. Rövidítések jegyzéke

|                  |                                                                    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 4VO modell       | four vessel occlusion modell                                       |
| ARDS             | akut (vagy felnőttkori) respirációs distressz szindróma            |
| BAL              | bronchoalveoláris folyadék                                         |
| COPD             | krónikus obstruktív tüdőbetegség                                   |
| DW               | száraz súly                                                        |
| EB               | Evans kék                                                          |
| FJB              | Fluoro-Jade B festés                                               |
| FRC              | funkcionális reziduális kapacitás                                  |
| HFS              | nagyfrekvenciás elektromos ingerlés                                |
| IL-13            | interleukin-13                                                     |
| IVM              | intravitális videó-mikroszkópia                                    |
| KO               | génkiütött (knockout) állatok                                      |
| LTP              | hosszú időtartamú potencírozódás ( <i>long-term potentiation</i> ) |
| MHC              | hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)   |
| OA               | ovalbumin                                                          |
| OPS              | orthogonális polarizációs spektrális képalkotás                    |
| P                | nyomás                                                             |
| pCO <sub>2</sub> | a széndioxid parciális nyomása a vérben                            |
| pH               | hidrogén ion koncentráció mértéke a vérben                         |
| PMN              | polimorf magvú leukociták                                          |
| pO <sub>2</sub>  | az oxigén parciális nyomása a vérben                               |
| TLC              | teljes tüdő kapacitás                                              |
| TTC              | trifenil-tetrazolium-klorid festés                                 |
| V                | térfogat                                                           |
| WW               | nedves súly                                                        |
| Z <sub>0</sub>   | a mellkas alapimpedanciája                                         |