

PATOLOGICKÁ FYZIOLOGIE

Praktikum

Pavel Sobotka a kolektiv



Patologická fyziologie
Praktikum

**prof. MUDr. Pavel Sobotka, DrSc.
a kolektiv**

Recenzovaly:

MUDr. Marie Pometlová, CSc.

doc. MUDr. Jana Slavíková, CSc.

Autorský kolektiv:

MUDr. Jan Barcal, Ph.D.

MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.

Dana Jelínková, Ph.D.

MUDr. Alena Křížková, Ph.D.

MUDr. Věra Markvartová

MUDr. Zdeňka Purkartová

MUDr. Jaroslav Voller

doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

(†) doc. MUDr. Jan Záhlava, CSc.

Ing. Václav Žalud

Technická spolupráce:

Miluše Volterová

Vydala Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum

jako učební text pro Lékařskou fakultu UK v Plzni

Praha 2012

Sazba DTP Nakladatelství Karolinum

4., upravené vydání

© Univerzita Karlova v Praze, 2012

© Pavel Sobotka a kolektiv, 2012

Text neprošel jazykovou ani redakční úpravou nakladatelství

ISBN 978-80-246-2128-9

ISBN 978-80-246-2651-2 (online : pdf)



Univerzita Karlova v Praze
Nakladatelství Karolinum 2014

<http://www.cupress.cuni.cz>

Obsah

Předmluva	5
1. Základní metody	7
1.1 Historický úvod do experimentální medicíny	7
1.2 Laboratorní zvířata	9
1.2.1 Dělení laboratorních zvířat	9
1.2.2 Kvalita laboratorních zvířat	10
1.2.3 Etika práce s pokusnými zvířaty	10
1.2.4 Někteří pokusní obratlovci	12
1.2.5 Manipulace se zvířaty	13
1.3 Vedení protokolu	14
1.4 Základy anestézie	14
1.4.1 Celková anestézie (CA)	15
1.4.2 Lokální anestézie (LA)	17
1.5 Injekční technika	18
1.6 Základní chirurgické instrumentarium a šicí materiál	19
1.7 Chirurgická technika u laboratorních zvířat	25
1.7.1 Všeobecné zásady	25
1.7.2 Příprava k operaci	25
1.7.3 Operace	26
1.7.4 Zavádění cévních kanyl	29
1.7.5 Zavedení tracheální kanyly	30
1.8 Základní hodnocení naměřených veličin	31
2. Obecná patologická fyziologie	34
2.1 Měření kožního odporu a kožní galvanická reakce	34
2.2 Poruchy termoregulace – horečka	36
3. Krev	38
3.1 Patofyziologie krevního obrazu	38
3.2 Experimentální hemolytická anémie	43
3.3 Prodloužení doby srážení krve při snížení množství protrombinu	45
3.4 Změny tvorby fibrinu po podání heparinu	46
3.5 Hemorrhagické diatézy při poruše stěn cév	47
3.6 Test fagocytární schopnosti bílých krvinek	48
4. Krevní oběh	49
4.1 Vyšetření funkčních schopností oběhového systému	49
4.2 Výstupový test (step-test)	50
4.3 Letunovova zkouška	51
4.4 Telemetrické sledování změn tepové frekvence	53
4.4.1 Monitoring oběhových funkcí (Holter)	54
4.5 Základy EKG	55
4.5.1 Na EKG zápisu hodnotíme	57
4.5.2 Změny na EKG	59
4.6 Experimentálně vyvolané poruchy srdeční činnosti	75

5. Dýchání	79
5.1 Vyšetření plicní ventilace	79
5.2 Volní apnoe	82
5.3 Vliv sníženého parciálního tlaku kyslíku	82
6. Trávicí systém	84
6.1 Zkoumání vlastností slin	84
6.2 Operace žaludku – zavedení žaludeční kanyly	85
7. Metabolismus a termoregulace	87
7.1 Obezita po hypotalamické lézi za využití stereotaxe	87
7.2 Závislost termoregulace na věku	89
8. Vylučování	91
8.1 Operace vyvedení močových	91
8.2 Zředovací pokus u člověka	92
9. Vnitřní sekrece	94
9.1 Metabolické a oběhové změny při experimentálních změnách funkce štítné žlázy	94
9.2 Epinefektomie u potkana	96
9.3 Kastrace samců potkana	97
10. Nervová soustava	98
10.1 Jednostranné vyřazení labyrintu u morčete	98
10.3 Testování motorických schopností myši	98
10.4 Registrace bioelektrické aktivity mozku u člověka – elektroencefalografie	99
10.5 EEG – evokované potenciály u člověka	101
10.6 Spontánní a evokovaná elektrická aktivita mozku u laboratorního potkana.	
Experimentální epilepsie	103
10.8 Podmíněné reakce úniku a vyhnutí se bolestivé stimulaci	105
10.9 Testování prostorového učení v Morrisově vodním bludišti	106

Předmluva

Výuka patologické fyziologie vychází z předpokladu, že si již studenti osvojili základní poznatky přírodních věd v oblasti biofyziky, biologie a chemie a prokázali znalosti o stavbě a funkci organismu složením zkoušky z anatomie, histologie a fyziologie. Patologická fyziologie se zabývá studiem obecných a speciálních zákonitostí mechanismu vzniku, průběhu a zakončení patologických procesů. Rozborem etiologie a patogeneze nemocí vytváří předpoklady pro studium klinických oborů.

Základní formou výuky patologické fyziologie jsou přednášky, praktická cvičení, semináře a konzultace. Pro studium je k dispozici řada českých i cizojazyčných učebnic patologické fyziologie. Pro praktickou výuku vydávají fakulty vlastní skripta. Starší vydání skript ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni jsou zcela rozebraná. Považujeme proto za nezbytné připravit nové vydání. Toto vydání obsahuje úkoly, které se osvědčily v praktickém provozu. Vzhledem k novým metodikám a dostupnosti přístrojové techniky, chemikálií a pokusných zvířat byly některé úkoly vyřazeny a jiné naopak zařazeny nově.

Praktická cvičení jsou nedílnou součástí výuky patologické fyziologie. Doplnují teoretický výklad přednášek, usnadňují pochopení vzniku a průběhu patologického děje v podmínkách modelového pokusu, přispívají k získání manuální zručnosti a k osvojení základních pracovních postupů, které lze uplatnit v klinické praxi. Na rozdíl od přednášek umožňují bezprostřední kontakt učitele se studenty; vzájemný dialog má nejen odborný význam, ale má také umožnit získání medicínských postojů a myšlení.

Praktická cvičení poskytují také možnost seznámit posluchače s vědeckou problematikou ústavu. Instruktivní jsou úkoly, které demonstrují poruchy motoriky, prostorové orientace a učení myší kmene Lurcher s olivocerebelární degenerací, která je vyvolána mutací genu glutamátového receptoru.

Patologická fyziologie patří do souboru fyziologických věd. Bez pochopení normální funkce není možné rozumět jejím patologickým úchylkám: proto naše cvičení, zejména v úvodních kapitolách, zdůrazňují toto hledisko.

Úkoly, při nichž jsou použita pokusná zvířata, jsou prováděny v souladu s mezinárodní konvencí, českými předpisy a etickou komisí LF UK v Plzni. Některé pokusy jsme nahradili demonstracemi na videozáznamech.

Uvítáme připomínky a náměty ke zlepšení.

Plzeň 2012

1. Základní metody

1.1 Historický úvod do experimentální medicíny

Dřívější název oboru patologické fyziologie byl experimentální patologie. Vycházel ze skutečnosti, že ke studiu etiologie a patogeneze chorobných stavů byly u zvířat navozovány stavy analogické lidským onemocněním. Základní poznatky o anatomii některých zvířat byly získávány již ve starém Egyptě při mumifikaci zvířat. První písemné zmínky o pokusech na zvířatech jsou v díle Corpus Hippocraticum ze 4. století před naším letopočtem. Již ve 2. st. n. l. prováděl Claudius Galén pokusy na primátech a na prasatech. Například dokázal, že moč se tvoří v ledvinách. Zvířata byla až do doby renesance jediným zdrojem poznatků o anatomii, protože pitvy lidí byly z náboženských důvodů nepřípustné. Přestože od dvacátého století s rapidním rozvojem medicínské techniky i možností diagnostiky význam experimentální patologie ve vlastním slova smyslu postupně klesal (etiopatogenezi řady lidských onemocnění bylo možné studovat přímo na pacientech) význam pokusů na zvířatech pro pokrok medicíny trval a řada významných objevů byla uskutečněna díky nim. Za příklad může sloužit objev inzulinu, který by nebyl možný bez pokusů na psech (za objev udělena Nobelova cena v r. 1926). V dalších desetiletích pak také techniky nezbytné pro úspěšné transplantace tkání a orgánů u lidí byly předem vypracovány a vyzkoušeny na zvířatech. A v neposlední řadě ani vznik tzv. kosmické medicíny a počátky úspěšných letů člověka do vesmíru by nebyly možné bez předchozího využití zvířat v této oblasti výzkumu. Od konce osmdesátých let minulého století s rozvojem genového inženýrství pak význam zvířat dále narůstal, zejména díky cíleným manipulacím (např. vnášení lidských genů do zvířecích organismů), umožňujícím tak studovat patologické stavy analogické lidským.

V průběhu celé historie je také možné najít doklady o pokusech prováděných na lidech. Jednalo se zejména o vězně nebo jedince s mentálním postižením. Do nejzvrůdnějších rozměrů byly tyto experimenty dovedeny během druhé světové války v Japonsku (Jednotka 731, pokusy na čínských zajatcích) a v nacistickém Německu (eugenika, rasové hodnocení, kategorizace méněcenných jedinců, projekty eutanázie dětí a duševně chorých, experimenty v koncentračních táborech). Z těchto zločinných a nelidských experimentů dokonce vzešlo obrovské množství poznatků (řada lékařů si na takto získaných datech a sbírkách materiálu vybudovalo poválečnou akademickou kariéru). Nicméně, poválečné vypořádání se zločinci provádějícími experimenty na lidech v nacistickém Německu bylo vzhledem k rozsahu těchto zločinů zcela nedostačující (v Norimberském procesu bylo např. odsouzeno pouze 16 lékařů). I dnes jsou prováděny pokusy na lidech, podléhají však přísné regulaci. Jde o testování nových léků, které, než se dostanou do běžného používání, musí projít několika stupni testování na lidech, počínaje zdravými dobrovolníky (viz obecná farmakologie, klinické testy léčiv).

Pokusy na zvířatech jsou dle definice zákroky na živých zvířatech nebo manipulace s nimi za účelem ověření vědecké domněnky a získání nových poznatků, stanovení diagnózy, vývoje a ověřování

biologického produktu včetně zjištění jeho účinku a získání výrobku tohoto charakteru, testování, použití zvířete v rámci pokusného zkoumání jeho reakcí, výuky.

V patologické fyziologii, respektive experimentální patologii slouží laboratorní zvířata k vytváření modelů.

Biologický model je živý systém, který umožňuje reprodukovat normální nebo patologické vlastnosti jiného živého systému včetně člověka. Zvířecí model nemoci je buď spontánní (s přirozeně získanou poruchou, patologickým procesem nebo s genetickou dispozicí k onemocnění) anebo navozený (s uměle navozenou poruchou či nemocí). Genetický model nemoci umožňuje studovat nemoci, na jejichž vzniku se u člověka podílí přenos genetické informace (zvířata se spontánní hypertenzí, obezitou apod.). Metodami genového inženýrství lze připravit tzv. GMO (geneticky modifikované organismy) zvířata – „knock-out“ nebo „transgenní zvířata“. Podrobný výklad viz praktická cvičení.

Pokusy na zvířatech mají také své odpůrce. První hnutí odpůrců pokusů na zvířatech se datuje do roku 1789 a jeho zakladatelem byl anglický právník a filosof Jeremy Bentham. V současnosti existuje celá řada neziskových organizací či hnutí, celosvětově nejznámější je hnutí PETA (People for the Ethical Treatment of Animals, www.peta.org), založené v USA v roce 1980. V České Republice jsou to například Svoboda zvířat (www.svobodazvirat.cz) nebo Nadace na ochranu zvířat (www.ochranazvirat.cz). Podobné organizace mají významnou úlohu v dohledu na dodržování zákonů týkajících se pokusů na zvířatech (ale také chovu a zacházení s hospodářskými zvířaty, nakládání se zvířaty v kosmetickém průmyslu, cirkusech atd.) a přinášení podnětů pro zákonné úpravy. Na druhou stranu, řada organizací a sdružení do svých postojů a jednání promítá své politické a ideologické názory a namísto racionální argumentace používá prvky propagandy. Vyloženě zločinné je jednání zvané Direct action (přímá akce), kdy dochází k útokům proti laboratořím, ničení majetku, vypouštění zvířat do přírody (kde nemají šanci přežít), vyhrožování fyzickým násilím atd. Nejznámější takovou organizací je Animal Liberation Front, která je americkou FBI vedena jako „eko-teroristická organizace“.

Přehled legislativy:

Již v r. 1876 byl v Anglii přijat zákon na ochranu zvířat před týráním. Nyní jsou pokusy na zvířatech a ochrana zvířat obecně celosvětově velice přísně legislativně ošetřeny.

V České republice je základním dokumentem zákon č. 246/1992Sb., na ochranu zvířat proti týrání, který byl několikrát novelizován, (zákony: 77/2006Sb., 312/2008 Sb.). Důležitá je vyhláška č. 311/1997Sb., o chovu a využití pokusných zvířat. Zatím poslední novelizace je z r. 2012 s tím, že jejím důvodem je nutnost adaptovat právní řád České republiky na nařízení Rady (ES) o ochraně zvířat při usmrcování, které nabývá účinnosti dnem 1. 1. 2013, a naplnit tak směrnici Evropského parlamentu a Rady o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

Úplný přehled zákonů týkajících se ochrany zvířat je k dispozici na stránkách Ministerstva zemědělství (<http://eagri.cz/public/web/mze/>). Podle trestního zákoníku (§ 302 Zákona č. 40/2009Sb.) hrozí za týrání zvířat odnětí svobody až na 5 let.

Veškeré pokusy na zvířatech eviduje a kontroluje mezirezortní Ústřední komise pro ochranu zvířat. Řídit a kontrolovat pokusy na zvířatech smí pouze osoby vlastníci osvědčení podle § 17 zákona č. 246, které prokazuje, že byli seznámeni (pomocí odborného školení zakončeného písemnou a ústní zkouškou) s metodami chovu a práce na pokusných zvířatech. Každý pokus na zvířatech musí probíhat podle přesně vypracovaného Projektu pokusu (podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat). V projektu musí být experiment podrobně popsán (druh zvířete, počet jedinců, průběh pokusu, osud zvířat po ukončení pokusu) a vyčerpávajícím způsobem musí být vysvětlen přínos pokusu a zdůvodněna nezbytnost použití zvířat. Projekt musí být schválen místní odbornou komisí a následně příslušným státním orgánem.

1.2 Laboratorní zvířata

Pokusné je každé zvíře, které je předmětem zkoumání, například slon v Africe, jehož sleduje zoolog v rámci studia populací volně žijících chobotnatců. Laboratorní zvíře je užší pojem. Je to zvíře s přesně známými vlastnostmi genetickými, fyziologickými a jinými, které je speciálně chováno pro experimentální účely. Takové zvíře je standardizováno po stránce výživy a prostředí a zůstává po všechny generace v prostorech laboratorního chovu.

V historii byly experimenty prováděny víceméně náhodně, bez jakýchkoliv závazných pravidel. Zásady experimentů na zvířatech definoval poprvé teprve v polovině 19. století Claude Bernard. Ještě počátkem 20. století byla zvířata používána v pokusech bez jakékoliv standardizace. Byla používána zvířata náhodně odchycená a běžná domácí zvířata. S rozvojem experimentální medicíny během 20. století vedla nemožnost získávat dostatečný počet zvířat z výše zmíněných zdrojů a potřeba standardizace pokusných zvířat k rozvoji laboratorních chovů. Postupně vznikl samostatný vědní obor zvaný Laboratory Animal Science (LAS) a odborné společnosti zabývající se všemi aspekty LAS. Tyto společnosti vydávají závazná doporučení a postupy pro podmínky chovu a množení laboratorních zvířat, jejich pravidelné zdravotní testování, pro manipulaci s nimi atd. V Evropě je to Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA, <http://www.felasa.eu>), jejíž členem je i česká Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech (Czech Laboratory Animal Science Association – CLASA, <http://svlz.eu24.cz>).

1.2.1 Dělení laboratorních zvířat

Laboratorní zvířata lze klasifikovat z různých pohledů. Nejdůležitější je genetická výbava zvířat a mikrobiální osídlení. Základní dělení z pohledu genetiky je na izogenní (= geneticky totožné, například inbrední) a neizogenní (= geneticky heterogenní, např. outbrední) kmeny zvířat.

Inbrední kmeny se získávají příbuzenskou plemenitbou (bratr + sestra nebo potomek + jeden z rodičů) po více než 20 generací. Tato zvířata jsou genotypově uniformní, mají nízkou variabilitu fenotypu a tedy i reaktivity. Výhodou v experimentu je homogenita souboru a tedy možnost použití menšího počtu zvířat (viz níže, 3R). Nevýhodou je riziko, že zjištěné skutečnosti jsou pouze kmenově specifické (například u nejpoužívanějšího laboratorního zvířete, myši, je popsáno více než 100 kmenů) a nelze je použít pro tvorbu obecného závěru. Inbrední zvířata jsou náchylnější k nemocem a mají obvykle nízkou fertilitu.

U outbredního kmene je každý jedinec geneticky unikátní. Zde je nežádoucí příbuzenské křížení, což je zajištěno speciálními chovnými schémata (neustálý přísun nepřibuzných jedinců do populace, kruhová schémata páření atd.). Tato zvířata jsou fenotypově variabilní, jejich produkce je levnější a výsledky jsou obecněji platné. Fertilita a odolnost vůči nemocem je vyšší než u inbredních kmenů. Pro menší homogenitu souboru je v experimentu potřeba použít více zvířat.

Existují i další typy kmenů podle genetické výbavy, podrobně budou diskutovány v praktických cvičeních.

Z hlediska mikrobiálního osídlení existují tři základní skupiny laboratorních zvířat, kterým odpovídá i příslušný systém chovu. Základní skupinou jsou tzv. konvenční zvířata. U nich není známo mikrobiální osídlení, jsou však prosta patogenů přenosných na člověka a zvířecích infekčních onemocnění, což se prokazuje pravidelným zdravotním vyšetřováním. Držena jsou v otevřených neboli konvenčních chovech, kde je volný pohyb personálu i materiálu za dodržení základních hygienických podmínek.

SPF (Specified-pathogen free) zvířata jsou definována negativně – jsou vyjmenovány mikroorganismy, které nejsou součástí mikroflóry laboratorního zvířete a odpovídá jim tzv. bariérový chov. V tomto systému jsou zvířata oddělena od zevního prostředí, pohyb materiálu a potravy, které jsou sterilizovány, je jednosměrný a zvíře se po opuštění chovu již nevrací zpět. Zvířata v tomto typu chovu přicházejí do kontaktu s člověkem (ošetřující personál, experimentátor), jsou dodržována přísná hygienická pravidla (vstupní filtr, osprchování a převléknutí).

Gnotobiotická zvířata jsou chována v izolátorech, kde jsou zcela oddělena od vnějšího prostředí včetně člověka. Tato zvířata jsou získávána sterilní hysterektomií nebo hysterotomií s vybavením přímo do sterilního prostředí izolátoru. Tento typ chovu je finančně a technicky vysoce náročný (mláďata jsou chována v inkubátoru, pravidelně krmena, musí se jim pomáhat při defekaci atd.). Takto získaná a chovaná zvířata mohou být zcela bez mikrobiálního osídlení (Axenická neboli Germ Free, GF zvířata), nebo mohou být cíleně osidlována (asociována) jedním (monoxenická), nebo více mikroorganismy (dixenická, polyxenická), a definice je pak na rozdíl od SPF zvířat pozitivní.

1.2.2 Kvalita laboratorních zvířat

Kvalitu laboratorních zvířat ovlivňují faktory fyzikální, chemické a biologické, které tvoří tzv. zoohygienické podmínky. Bylo prokázáno, že různé zoohygienické podmínky mohou způsobit rozdílnost výsledků jinak úplně stejných experimentů, což znemožňuje srovnávání výsledků získaných v různých laboratořích. Proto jsou podmínky pro laboratorní zvířata standardizovány.

Mezi fyzikální faktory patří například teplota prostředí, která ovlivňuje metabolismus zvířat, což může měnit farmakokinetiku aplikovaných látek. Proto jsou definována teplotní rozmezí pro jednotlivé druhy, při jejichž dodržování je organismus v klidovém stadiu bez zapojení termoregulačního systému. Velkou roli hraje rovněž světelný cyklus, protože střídání světla a tmy ovlivňuje sekreci hormonů a tím aktivitu a chování zvířat. Běžně používané schéma v laboratořích je 12 h světlo/12 h tma. Přílišná intenzita osvětlení může negativně ovlivnit fertilitu. Významným faktorem je prašnost prostředí, která závisí na druhu a kvalitě steliva a na možnostech filtrace vzduchu. Kromě přímého iritativního působení se prach uplatňuje jako nosič škodlivin a místo pro přebývání a množení mikroorganismů (viz výše, typy chovů a mikrobiologie pokusných zvířat). Další fyzikální faktory jsou například vlhkost a proudění vzduchu, hluk atd.

Z chemických faktorů je důležité složení vzduchu, významně mohou být zvířata ovlivněna nejrůznějšími pachy, například z desinfekčních přípravků či kosmetiky používané zaměstnanci laboratoře. Přítomnost neznámých pachů může prostřednictvím vyvolaného stresu značně ovlivnit výsledky experimentu. Chemické složení potravy hraje rovněž roli v kvalitě laboratorních zvířat. Běžně se používá krmné schéma *ad libitum*, kdy je zvířatům umožněn nepřetržitý přístup k vodě a potravě. V případě potřeby je aplikován zvláštní krmný program, kdy je složení, kvantita nebo časová dostupnost potravy uzpůsobeno požadavkům experimentu (například speciální diety při studiu obezity, diabetu a jejich následků). Existuje nepřeberné množství komerčně vyráběných různých typů krmiva pouze pro laboratorní zvířata.

Biologické faktory lze dělit na vnější – které ovlivňují podmínky chovu –, a na vnitřní, což je genetická výbava chovaných zvířat. Z vnějších faktorů se významně uplatňují mikroorganismy (bakterie, viry, plísňe, roztoči, paraziti). Podle požadavků na přítomnost či absenci mikroorganismů se zvířata chovají v odpovídajících podmínkách (viz výše). Důležitým biologickým faktorem je člověk – ošetřovatel, experimentátor, či kdokoliv, kdo se pohybuje v chovném prostoru. Handling je souhrnné označení pro jakoukoliv manipulaci s laboratorním zvířetem (přemísťování při čistění chovných prostor či přesunu do laboratoře, manipulace při administraci farmak či experimentech). Handling působí jako silný stresový podnět. Proto je nutné se zvířaty manipulovat co nejméně a pouze pokud to není nezbytné a způsobem odpovídajícím doporučeným postupům pro dané laboratorní zvíře. Nesprávný handling způsobuje nadměrný stres a vede ke zvýšené agresivitě zvířat.

1.2.3 Etika práce s pokusnými zvířaty

V roce 1959 vydali Angličané Russel a Burch publikaci *The Principles of Humane Experimental Technique*, ve které zformulovali základní teze přístupu k laboratorním zvířatům vycházející z přiznání zvířeti tzv. vnitřní hodnoty. Souhrn poznatků z této práce je znám jako teze „3 R“ (Reduction, Replacement,

Refinement) a je základní zásadou odpovědného přístupu v experimentální práci. Publikace je k dispozici online na adrese http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.

Reduction

V redukci počtu použitých pokusných zvířat hraje především kvalitní design studie, výběr vhodných druhů a kmenů laboratorních zvířat, pečlivé provádění pokusů a správný výběr statistických metod pro hodnocení. Možné je i sdílení pokusných zvířat v rámci téhož pracoviště. Významným prvkem v redukci jsou i databáze experimentů, takže plánování pokusu vždy předchází rešerše literatury, aby nebyl zbytečně prováděn experiment, který již někdo provedl a publikoval.

Replacement

Náhradu užití laboratorního zvířete v experimentu umožňují tzv. alternativní metody. V experimentálním výzkumu se jedná zejména o in vitro metodiky, kdy se namísto s celým organismem pracuje například pouze s enzymy, buněčnými či tkáňovými strukturami nebo s celými orgány. Orgány a tkáně pro kultivaci se samozřejmě získávají z živého zvířete, ale kultury lze pak dlouhodobě kultivovat a množit, z jednoho zvířete lze odebrat více typů tkání a orgánů. Aby byly alternativní metody pro daný typ výzkumu použitelné, musí projít tzv. validačním řízením mezinárodního panelu Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Užití alternativních testů nutně postrádá celkovou a komplexní reakci celého organismu, kde se v reakci podílí celá řada různých systémů, které mohou působit vzájemně jak agonisticky, tak antagonisticky a výsledná reakce na aplikace testované látky může být odlišná oproti studii provedené in vitro. Proto je také počet validovaných alternativních metod omezen (26 validovaných metod v roce 2009) a jsou používány pro testování zejména v oblasti fototoxicity a kožní dráždivosti, tedy relativně jednoduchých pokusech. Konkrétní příklady alternativních testů jsou podrobně probírány během praktických cvičení. Dále se používají výpočetní, tzv. in silico metody a počítačové modely. Tyto modely jsou však závislé na datech, která byla získána pokusy na živých zvířatech, navíc jsou právě tímto faktem nejvíce omezeny, protože nemohou svými výstupy postihnout veškerou variabilitu živého organismu. Matematicko-geometrické modely jsou využívány ve farmacii, kde se pomocí počítačů designují funkční skupiny chemických sloučenin. Jejich účinnost však musí být ověřena na živém materiálu (na buněčných nebo tkáňových strukturách) a pak i na zvířeti (podrobně viz obecná farmakologie a vývoj léků). Ve výuce na veterinárních a lékařských fakultách lze použít videoprogramy a fantomy, nicméně videoprogram nenahradí praktickou zkušenost a sebedokonalejší model se zdaleka nepřibližuje skutečnosti.

Refinement

Je-li použití zvířete v experimentu nezbytností, je uplatňována zásada Refinement – zjemnění. Jedná se o opatření, která vedou k co největší „pohodě“ (animal welfare) a co největší redukci stresu a utrpení zvířete. Je potřeba zohlednit potřeby zvířete (charakter ustájení, rozměr klece, počet jedinců, světelný režim, dietu, teplotu v místnosti atd.) a řídit se zásadami handlingu. V případě operací je nutné minimalizovat invazivnost a bolestivost zákroku a poskytnout adekvátní pooperační péči.

Někdy se ještě neformálně ke třem R řadí čtvrté R, Responsibility – zodpovědnost.

Během výuky praktických cvičení z patologické fyziologie na LF UK v Plzni studenti provádějí po předchozí dokonalé teoretické přípravě, shlédnutí video ukázek a nácviku operačních technik na fantomech operace na laboratorním potkanovi a králíkově. Cílem těchto operací je umožnit posluchačům kontakt se živým organismem a nácvik základních chirurgických technik. Domníváme se, že tato zkušenost je zcela nepostradatelná pro provádění invazivních zákroků na lidech, ke kterým se studenti dostanou od čtvrtého ročníku. Všechny operace probíhají pod dohledem vysokoškolského pracovníka vlastního oprávnění dle §17 Zákona na ochranu zvířat proti týrání a podle schváleného projektu pokusu (viz výše – legislativa). Student má právo odmítnout účastnit se operací bez rizika jakéhokoliv postihu.