

Laboratorio

Metodologie

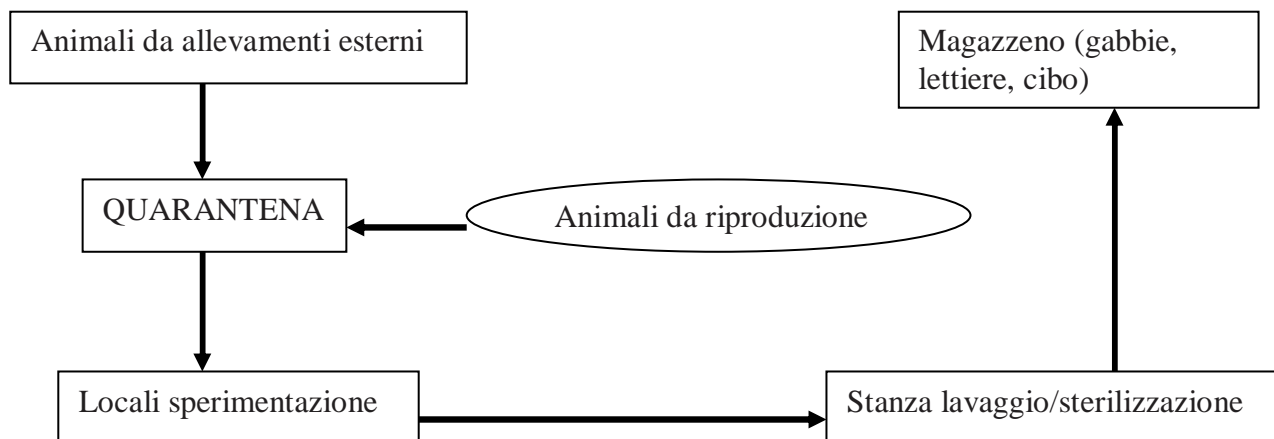
Farmacologiche

ANIMALI DA LABORATORIO → vivono nello stabulario che deve avere condizioni standard **STABULARIO e ORGANIZZAZIONE**:

GLP → (Good Laboratory Practice): leggi codificate a livello europeo per la validità degli esperimenti e comprende la professionalità degli operatori; istruzione; formazione; direzione; documentazione prove; protocolli accurate; condizioni ambientali; caratteristiche chimiche-fisiche-nutrizionali; controllo veterinario.

Stabulario:

- locale rettangolare dove a fianco ci sono altri locali
- senza finestre con 12 ore di luce artificiale (12 ore di buio) per non confondere i risultati degli esperimenti con ormoni
- materiale lavabile (es. piastrelle)
- piani bassi (comodo per approvvigionamento cibo; carico/scarico; svantaggio per rumori)
- piani alti (non c'è rumore traffico però stress da sibilo vento; approvvig. + faticoso)



Se ci sono CANI, vicino al MAGAZZENO c'è il locale cottura cibo.

GABBIE:

- 1) – scatola con apertura superiore
 - fondo di segatura
 - makrolon → resina resistente a calore e detergenti
 - coperchio filo d'acciaio con 2 incavi per cibo e acqua
- 2) – apertura frontale
 - sportello con scatoletta per cibo e acqua
 - taglia più grossa (conigli)

- tutta d'acciaio
 - fondo aperto in filo d'acciaio in modo che le deiezioni cadono sotto e vengono ripulite
- 3) – gabbia metabolica
- studi di metabolismo (consumo acqua e cibo)
 - circolare
 - pavimento aperto con filo metallico, urine e feci cadono giù
 - sul fondo si ha raccolta separata urine e feci

ABBEVERAGGIO: automatico, entra un tubicino in ogni gabbia con una valvola; dispensatori H₂O
Tutte queste gabbie → SCAFFALATURA

Se il numero di animali è alto si ha competizione per cui non + di 10 ratti/gabbia

Se l'animale è da solo può essere aggressivo.

PULITURA scaffalatura:

- se gabbia è a fondo chiuso la segatura è rimossa 1 volta al gg
- se gabbia è a fondo aperto → cassetto
- se gabbia è a fondo aperto → rotolo di carta che corre e viene cambiato

ANIMALI

NO: uccelli (voliera)

NO: pesci (acquari)

NO: rane (grandi vasche)

SI: MAMMIFERI di piccola taglia

Specie → popolazione in grado di riprodursi

Ceppo → suddivisione di specie con caratteristiche particolari

- INBRED: stesso patrimonio genetico; per ISOLARE caratteristiche genetiche particolari
SHR (Spontaneous Hypertension Rattus) si sono isolati individui a pressione alta e li si sono incrociati per 20 generazioni.
- P/NP (Prefering; Not Prefering) a seconda della preferenza all'alcool

→ OUTBRED: incroci non parentali → specie robusta

Animali TRANSGENICI:

Come alterare il genoma?

- inserire geni (transgeni)
- eliminare geni (Knock Out)
- alterare geni esistenti (Knock In)

In tal modo è possibile studiare varie malattie come: arteriosclerosi; diabete mellito; cancro al colon; sclerosi multipla; artrite; Alzheimer.

Quando ordino dei topi devo fare attenzione all'etichetta sulla scatola:

C57BL GB-Nimr 2 S

C57BL → sigla animali

GB → paese

Nimr → allevatore

2 → indice da 1 a 3 che indica DISPONIBILITA' (1 = vende solo a priorità; 2 = vende animali se a disposizione; 3 = solo in accordo)

S → indice STATO di SALUTE: G = gnotobiotici o sterili; S = Specific Pathogen Free; M = minimal disease; C = tutti gli altri.

TOPO:

- peso 20-30 g
- gestazione 19gg

- figli 1-12
- vita 2 anni
- ceppi Swiss (albin)

RATTO:

- peso 50-80 g
- gestazione 21gg
- figli 4-20
- vita 3 anni
- ceppi Wiscor (vivace); Fisher; Spargie-Daulery

CAVIA:

- gestazione 68gg
- figli 1-5
- vita 4 anni
- uso per farmaci antistaminici

GERBILLO:

- gestazione 24gg
- figli 4
- vita 6 anni
- manca il circolo di Willis (collega le carotidi con arterie cerebrali)
- uso per farmaci antischemici

CRICETO:

- gestazione 16gg
- figli 1-12
- vita 2 anni
- uso per farmaci per encefalite (inoculo prioni)

CONIGLIO:

- peso 3 Kg
- gestazione 1 mese
- figli 8
- vita 3 anni
- ceppi New Zeland; Fulvo di Borgogna; Le prato
- Il TALIDOMIDE non aveva dato effetti teratogeni ma non era stato provato sul New Zeland

MAIALE NANO (Mini Pig):

- gestazione 114gg
- figli 6-15
- vita 18-27 anni
- uso per trapianti o nuove tecniche chirurgia

SCIMMIE:

- vari ceppi
- uso per sostanze abuso e memoria

CANI:

- Bearle
- Studi su farmacocinetica

CONDIZIONI STANDARD→

- Temperatura di 22°C
- Umidità 40-60%
- Illuminazione 12 ore→350-400 LUX misurate a 1 metro dal pavimento
- Alimentazione pellet, avena, frumento, colla di pesce, argilla, glucosio, sali
- Le specie animali non dovrebbero essere insieme.

NORME GENERALI PER MANEGGIAMENTO ANIMALI→

- corretta manipolazione→buona riuscita esperimento
- evitare paura
- buono stato salute animale
- avvicinare mano sperimentatore con molta calma
- evitare rumori improvvisi
- per motivi di sicurezza guanti

Come prendere TOPO: lo prendo per la coda e lo appoggio sulla griglia, gli soffio sulla testa per tenerlo immobile e lo afferro dalla collottola verso il basso e cerco di prendere un buon pezzo di pelle della schiena per poi alzarlo in verticale tenendolo con la mano sinistra per la coda e la mano destra sul resto del corpo. In tal modo si lascia libero l'addome per le iniezioni.

Come prendere RATTO: mi faccio riconoscere facendogli annusare la mano e lo accarezzo 2/3 volte poi lo prendo per la coda e lo appoggio sulla griglia; con la mano destra invece lo prendo in tal modo: dito indice e medio ai due lati della testa, anulare, mignolo e pollice avvolgono il corpo; poi lo alzo in verticale come il topo facendo attenzione a lasciare lo spazio libero nell'addome per l'iniezione. Se il ratto si agita stringo leggermente di + le dita della testa.

Come prendere la CAVIA: la cavia non ha la coda ma è molto sensibile; occorre prenderla nella gabbia stringendola un po' e poi avvicinarsela a se, coccolarla per calmarla.

Come prendere il CONIGLIO: con la mano sinistra afferro la base delle orecchie e con la destra devo prendere più pelle della zona lombare possibile. Quando lo rimetto in gabbia metto prima le zampe anteriore e poi le posteriori. **ATTENZIONE ALLE ZAMPE POSTERIORI, SONO MOLTO FRAGILI.**

VIE DI SOMMINISTRAZIONE FARMACI:

- intramuscolare (muscolo coscia e ago entra in parallelo al muscolo)
- sottocutanea (alzo pelle e metto ago nel derma)
- endovenosa (per il ratto nella coda)
- intraperitoneale (l'ago entra perpendicolare all'addome)
- orale (tubicino con sonda nell'esofago, non bisogna spingere)
- intracerebroventricolare

Alla fine della ricerca gli animali da laboratorio vengono eliminati: **MODELLI di EUTANASIA**→

- metodi fisici: colpo secco alle vertebre; immersione azoto liquido (solo per piccola taglia)
- metodi chimici: inalazione di etere, CO, CO₂ 60%, alitano; iniezione barbiturici

IGIENE:

- animali selvatici, scarafaggi, mufte non devono entrare in contatto
- attenzione a visitatori occasionali
- accurata pulizia; disinfestare; sterilizzare
- cambio lettiera e camici

PREPARAZIONE SOLUZIONE FISIOLOGICA: NaCl 9‰ = 9g/1000ml = 9g/1litro
PER INIEZIONI:

TOPO→0.1 ml ogni 10 gr (IP e IM)

RATTO→ 0.5 ml ogni 100 gr (IP, OS, IM); 0.1/100gr

CAVIA→0.2 ml ogni 100 gr (SC)

TEST COMPORIMENTALE IRWIN:

- valutare efficacia di un F
- visualizzare altri effetti e effetti tox
- Irwin ne fu l'autore (1960)
- Si basa sulle modificazioni del comportamento animale sotto effetto di un F
- Caratterizzò una 50in di comportamenti che l'animale assume sotto determinati F
- Noi ci basiamo su ~ 20 effetti, comportamenti
- Test economico perché necessita dell'occhio dello sperimentatore
- Eseguito su topi e ratti
- Molti risultati in poco tempo

Occorrono:

- animali
- gabbietta media
- spazio + grande per mettere animali in campo aperto
- pinzetta (coda), crine (cornea), grata (forza aggruppamento), piano inclinato e panchetta (catatonìa), pila (miosi, midriasi)

Come si esegue:

- inizio con 6 animali testati per la 1° volta al mattino, altri 6 a metà giornata e altri 6 verso sera in quanto il F può interferire col ritmo circadiano.
- Se i risultati sono simili allora sarà lo sperimentatore che deciderà quando fare gli esperimenti
- Sostanza "x" ma non so la dose: se uso un intervallo ampio di dosi→informazioni: non attive, attive, tossiche.
- Come spaziare le dosi: 10mg/kg, 30, 100, 300, 1000mg/kg (1g/kg)→5 dosi per 5 animali e il 6° è per il controllo
- **Controllo**: riceve il veicolo con cui è sciolto il F (di solito è soluzione fisiologica) per vedere se il veicolo può essere tox; deve avere lo stesso vaneggiamento dei trattati
- Vie di somministrazione: orale e I.P.
- Tempi per osservare il comportamento: 5-15-30-60' per la via IP; per via EV al max 20-30'; per OS dopo 1-2 ore

Sintomi comportamentali→dipendono dal SNC e dalle aree motorie

Sintomi neurologici→depressivo-eccitatorio e dipendono dall'integrità del SNC

Sintomi neurovegetativi→dipende dal SNA controllato dal simpatico e parasimpatico

Riflessi→dipendono dal SNC

All'interno di ogni colonna della tabella si osservano sintomi fisiologici (normalmente presenti) e patologici (normalmente non presenti) e per cui si danno dei punteggi ad esempio se è normale il punteggio è 4 e se sale va a 8 o se scende va a 0 ma ci sono anche punteggi intermedi in base al carattere osservato che vanno da 8-6-4-2-0.

Un animale che non presenta sintomo patologico ha punteggio per quel sintomo pari a 0.

Si osserva prima l'animale INDISTURBATO e poi DISTURBATO.

Animale indisturbato:

- gabbia senza segatura
- posizione del corpo→seduto normalmente ma con eccitante sta in verticale
- attività locomotoria
- esoftalmo→agisce sul SN simpatico e riguarda l'occhio infuori
- respirazione→~120 resp/min a seconda dei movimenti del diaframma

- tremori
- convulsioni
- grooming→ fisiologico (lecca le zampe e se le passa sul muso)
- stereotipia→ sintomo ripetuto→ patologico (0 è normale)
- piloerezione→ pelo retto

Animale disturbato:

- nella gabbia aperta
- risposta al tocco→ eccitato o depresso
- passività→ patologico; prendo per la collottola e lo giro a pancia in alto e se sta fermo per 10 sec gli do 2 pti poi lo prendo per la zampa anteriore e se sta fermo per 10 sec altri 2 pti poi per la zampa posteriore e se sta fermo per 10 sec altri 2 pti.
- Catatonìa→ appoggio sul piano normale e se sta fermo per 10 sec gli do 1 punto; piano inclinato e se sta immobile per 10 sec gli do 1 punto; panchetta alta 8 cm dal pavimento e se sta per 10 sec gli do 1 punto; posizione a buddha (seduto sulla parete della gabbia)
- Forza di aggruppamento→ appoggio l'animale sopra la grata e normalmente do punti 4 ma se ha preso benzodiazepine che sono miorilascianti, non si aggrappa.
- Tono del corpo→ flaccido/contratto: affondo pollice e indice sotto la pancia e do punti a seconda che le dita affondano o trovano resistenza
- Riflesso corneale→ stimolo la cornea ed ottengo un riflesso di ammiccamento
- Riflesso pineale→ nel padiglione auricolare (sempre col crine come sopra) e scuote testa
- Riflesso pinzettamento coda→ dolorifico, l'animale squittisce
- Riflesso di raddrizzamento→ prendo l'animale per la coda e lo lancio a 20 cm e vedo come ricade (normalmente on le 4 zampe dritte)

Profilo neurovegetativo:

- colore cute→ normalmente è rosa ma con vasocostrizione è bianca e con vasodilatazione è rossa
- diarrea→ conta delle feci
- diuresi→ guardo la gabbietta se è bagnata per questo motivo non si mette la segatura
- lacrimazione, salivazione, rinorrea→ occhi bagnati, bocca bagnata e scolo nasale (patologia)
- temperatura→ caldo o freddo, mento a confronto il trattato col controllo

Tipi di F da iniettare:

- barbiturici come *pentobarbital*→ depressivo del SNC
- morfina→ depressivo, analgesico
- metamfetamina→ eccitante
- fisostigmina→ inibitore colinesterasi (la colina aumenta e stimola il parasimpatico)

TEST STATISTICO:

- test di MANN-WHITNEY
- dati non parametrici
- 2 confronti: trattato e controllo→ altrimenti: test di KRUSKALL-WALLIS
- come si procede:

<u>trattati</u>	<u>controllo</u>
0→1→2	4→5→7
2→4→4	4→6→7
0→2→2	4→7→7
0→3→2	4→8→7
	4→9→7
↓	↓
R1 (Rango 1)	R2 (Rango 2)

- numero i ranghi dal più piccolo al più grande → 9 punteggi
- se ho punteggi uguali → sommo i ranghi corrispondenti e divido per gli "0" che ho ottenuto; ad esempio: nell'R1 ho 3 zeri allora sommo i punteggi che gli avevo dato (1+2+3=6 e divido per il numero di ranghi uguale quindi divido il 6 per 3 = 2) così anche per il R2 (5+6+7+8+9=35/5=7).
- Sommo i ranghi: R1 = 2+4+2+2 = 10 e R2 = 7+7+7+7+7 = 35
- **n1** = n° trattati = 4
- **n2** = n° controlli = 5
- applico le 2 formule:

$U1 = \frac{n1 * n2 + \frac{n1(n1+1)}{2} - R1}{2}$
$U2 = \frac{n1 * n2 + \frac{n2(n2+1)}{2} - R2}{2}$

- come risultati ottengo: U1 = 20 e U2 = 0
- prendo solo U più piccolo trovato (0) e lo confronto con la tabella di Mann-Whitney
- U atteso = 0.008 = 0.8% → probabilità dello 0.8% che ciò sia dovuto al caso e il 99.2 % che sia dovuto al F e che le 2 popolazioni sono diverse.
- Questo test ci dice che per esempio il F è un depressivo ma non sapremo mai di che tipo
- Il LIMITE è il 5% per cui la differenza è significativa e la accetto.