

CZY POWTARZALNOŚĆ BADAŃ Z WYKORZYSTANIEM ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH JEST W OGÓLE MOŻLIWA?

Is replication of animal trials attainable?

Marta Dziedzicka-Wasylewska (Kraków)

Streszczenie

Ostatnio zwraca się uwagę na problem stosunkowo niskiej powtarzalności wyników badań naukowych. Dzieje się tak we wszystkich dyscyplinach naukowych, chociaż badania z zakresu nauk biologicznych są często podawane jako koronny przykład w dyskusjach zagadnień związanych z replikowalnością badań. Jest naturalnie wiele przyczyn takiego stanu rzeczy, jak np. nieprzestrzeganie standardów tzw. „dobrej praktyki laboratoryjnej”. Jednak w badaniach z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych źródłem niepowtarzalności wyników może być zmienność biologiczna, właściwa nie tylko tzw. szczepom niekrewniaczym (ang. *outbred strains*), ale też szczepom pozyskanym w wyniku chowu wsobnego (ang. *inbred strains*). W rozwoju osobniczym zwierzęta podlegają działaniu różnych czynników już w czasie życia płodowego (m.in. wpływ płci płodów sąsiadujących w macicy), a także w okresie postnatalnym (m.in. dostęp do pokarmu i opieki matczynej). Czynniki te powodują, że mimo genomu identycznego w ponad 99%, osobniki krzyżowane krewniaczo przejawiają różnice fenotypowe, które w dalszym życiu mogą ulegać nasileniu.

Abstract

Recently, attention has been paid to the problem of relatively low reproducibility of research results. This is true in all scientific disciplines, although life sciences research is often cited as the prime example in discussions of research replication issues. There are many reasons for this, such as failure to comply with the standards of the so-called Good Laboratory Practice. However, in studies using experimental animals, the source of poor replicability of the results may be biological variability, specific not only for outbred strains, but also for inbred strains. In individual development, animals are subject to the influence of various factors during prenatal life (including the influence of the sex of the adjacent fetuses in the uterus) and in post-natal period (including access to food and maternal care). Due to these factors, despite the genome identical in over 99%, individuals of inbred origin exhibit phenotypic differences that may intensify in later life.

Problemy z powtarzalnością wyników w badaniach naukowych

Najważniejszą cechą badań naukowych jest ich rzetelność, a więc i możliwość uzyskania podobnych wyników w powtórnych badaniach. Okazuje się jednak, że nie jest z tym najlepiej; istnieją szacunki, że nawet 85% wyników nie da się powtórzyć

[9; 10]. Dzieje się tak we wszystkich dyscyplinach naukowych, chociaż badania z zakresu biomedycyny są często podawane jako koronny przykład w dyskusjach zagadnień związanych z replikowalnością badań. Czasem drobne różnice w szczegółach wykonania eksperymentu mogą przyczyniać się do braku spójności wyników. Na przykład w badaniach z obszaru nowotworzenia dwa poważne laboratoria przez

rok poszukiwały różnic w wykonaniu eksperymentu, nie mogąc uzyskać tych samych wyników. Dopiero wspólna praca badaczy z tych dwóch laboratoriów, „ramię w ramię”, pozwoliła pokazać, że przyczyna różnic tkwi w drobnym detalu przy izolacji komórek z guza – jedno laboratorium stosowało dynamiczne mieszanie komórek a drugie – delikatne ich kołtysanie... [11; 8] Biorąc pod uwagę badania oparte na modelach zwierzęcych, m.in. stosowane w badaniach przedklinicznych, oszacowano, że co najmniej 50% wyników jest „niepowtarzalna” – co oczywiście przekłada się na ogromne straty finansowe. Na takich wynikach bowiem niejednokrotnie opierają się dalsze prace, kontynuujące pierwotną myśl autorów zamiast koncentrowania się na bardziej obiecujących koncepcjach [16]. Ponadto takie „niepowtarzalne” wyniki hamują potencjalny postęp w naukach biomedycznych, no i przyczyniają się do niepotrzebnego wykorzystania zwierząt doświadczalnych.

Jest naturalnie wiele przyczyn takiego stanu rzeczy, jak np. nieprzestrzeganie standardów tzw. „dobrej praktyki laboratoryjnej”, w tym m.in. brak dyscypliny naukowej, niska moc statystyczna, dowolność interpretacyjna czy szeroko pojęte uprzedzenia. Ale należy też przyznać, że szczególnie w badaniach z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych źródłem „niepowtarzalności” wyników mogą być m.in.: zróżnicowany wiek zwierząt, ich rozmaite doświadczenie reprodukcyjne, zmiany związane z porą roku, w której prowadzono eksperymenty, odmienny reżim oświetlenia w pomieszczeniach, różnice w porze przeprowadzania eksperymentów w ciągu doby itp. Chociaż należy też podkreślić, że na ogół zespoły naukowe starają się ujednolicić przynajmniej niektóre z tych parametrów – zwykle jednak pula zwierząt przeznaczonych do danego eksperymentu jest mniej więcej w tym samym wieku, doświadczenia wykonuje się o stałej porze dnia, oświetlenie jest zwykle wystandardyzowane – i parametry te są zwykle podawane w publikacji.

Zmienność biologiczna

Ważnym czynnikiem, który należy brać pod uwagę przy analizowaniu przyczyn „niepowtarzalności” wyników badań z użyciem zwierząt doświadczalnych jest tzw. zmienność biologiczna, właściwa nie tylko tzw. szczepom niekrewniaczym (*outbred strains*), ale też szczepom pozyskanym w wyniku chowu wsobnego (*inbred strains*).

Do badań laboratoryjnych pozyskuje się zwierzęta od certyfikowanych hodowców o międzynarodowej renomie i międzynarodowym zasięgu, takich jak

Charles River albo Jackson Laboratory. Najczęściej w badaniach laboratoryjnych używa się szczurów lub myszy, a te ostatnie – z uwagi na bardzo rozwinięte modyfikacje genetyczne wprowadzane przez badaczy – stały się najbardziej popularne (tzw. myszy transgeniczne). Charles River ma w swojej ofercie takie szczepy wsobne jak m.in. B6 Albino, BALB/c, C57BL/6, C3H, DBA/2, 129-Elite, A/JCr, SJL-Elite.

Szczepy krewniacze (*inbred*) definiuje się jako kolonie pozyskane po min. 20 pokoleniach krzyżowania brat-siostra i uważa się, że w ten sposób mamy do czynienia z osobnikami identycznymi pod względem genetycznym. W tym kontekście bardzo interesujące są wyniki badań przedstawione już w 1999 r. w pracy autorstwa Crabbe, Wahlsten i Dudek, opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Science* [3]. W badaniach tych podzielono grupy zwierząt (6 szczepów identycznych pod względem genetycznym, samce i samice) pomiędzy 3 różne laboratoria (w Albany w stanie Nowy York, Edmonton w Kanadzie i Portland w stanie Oregon) i wykonano w tych laboratoriach analogiczne doświadczenia behawioralne, stosując takie same aparaty pomiarowe. W oryginalnym eksperymencie wykonano następujące testy:

- aktywność lokomotoryczna w teście wolnego pola;
- eksploracja w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego (mierzy reakcje lękowe);
- test pręta obrotowego (test mierzy zdolność utrzymania się zwierzęcia na walcu obracającym się z ustaloną prędkością);
- test Morrisa (polega na poszukiwaniu platformy w basenie wypełnionym wodą, test stosowany w badaniach uczenia się i pamięci);
- aktywacja lokomotoryczna wywołana podaniem kokainy;
- preferencja pobierania alkoholu w stosunku do wody

Okazało się, że wśród tych testów były takie, które dawały mniej więcej podobne rezultaty (np. we wszystkich laboratoriach dało się potwierdzić znane fakty, tj. większą preferencję w kierunku alkoholu u myszy szczepy C57BL/6J niż myszy DBA/2J, czy też to, że samice piją więcej niż samce), ale testy, które mierzyły reakcje lękowe czy też aktywność eksploracyjną dawały odmienne wyniki. Autorzy tego eksperymentu – oraz następnego, rozszerzonego [17] – interpretowali zaobserwowane różnice w wynikach, zależne od miejsca wykonania testu, jako wynikające z naturalnej odmienności czy to personelu opiekującego się zwierzętami, czy to ogólnego otoczenia laboratoryjnego, wody czy oświetlenia.

Eksperymenty te były ważne zwłaszcza w kontekście nadchodzącej wtedy lawinowo nowej ery badań z zastosowaniem zwierząt transgenicznych. Takie badania wymagają bowiem behawioralnej weryfikacji znaczenia poszczególnych genów, których wyciszenia bądź nadekspresji można było dokonywać w organizmie zwierzęcym [17]. W późniejszych publikacjach Crabbe, Wahlsten i współpracownicy podsumowali swoje obserwacje, wskazując kryteria pozwalające na zbudowanie stabilnych warunków testowania, które pozwolą generować wiarygodne wyniki, powtarzalne w różnych laboratoriach. Dyskusja tego typu była niezbędna i pozwoliła na uświadomienie dużego zróżnicowania sposobów przeprowadzania testów behawioralnych, kiedy nawet drobne szczegóły mogą mieć znaczenie dla wyniku końcowego. Uświadomiono sobie także, że różne szczepy myszy najczęściej używane w laboratoriach mogą zachowywać się odmiennie w różnych testach, takich jak preferencja alkoholu, test wymuszonego pływania, aktywność eksploracyjna, poszukiwanie platformy w basenie wypełnionym wodą, test pręta obrotowego [4; 12]. Generalna konkluzja tych rozważań jest taka, że przy testowaniu różnych zwierząt transgenicznych w celu identyfikacji roli określonego zmutowanego genu należy brać pod uwagę behawioralną charakterystykę tła genetycznego, na jakim opracowano model transgeniczny.

Przyczyny zmienności biologicznej – okres prenatalny

Jednakże do powstania zróżnicowanych wyników w testach behawioralnych (ale i biochemicznych czy molekularnych) może się także przyczyniać zindywidualizowanie osobnicze, o którym często zapominamy – co jest uzasadnione tym, że stosując szczepy krzyżowane krewniaczo, wsobne, mamy prawo sądzić, że tych różnic osobniczych nie będzie... A mimo, że stado krewniacze jest „identyczne pod względem genetycznym”, to regułą w badaniach laboratoryjnych są zróżnicowane odpowiedzi zwierząt w danej grupie doświadczalnej. Sytuacja jest podobna do tej, jaką spotyka się u bliźniąt jednojajowych (monozygotycznych), kiedy mimo tożsamości, identyczności genomu napotyka się zauważalne różnice w wyglądzie czy zachowaniu takich osób. Różnice te są na ogół przypisywane złożonym zależnościom środowiskowym, w tym współzawodnictwie między osobnikami czy zróżnicowanej opiece rodzicielskiej, co z kolei jest często pomijane w przypadku – na ogół liczego – rodzeństwa mysiego. Należy tu wspomnieć ciekawe opracowanie z roku 1966 pt. „Mysie

społeczeństwo” autorstwa Petera Crowcrofta [5], która to praca – opisująca co prawda osobniki pochodzenia naturalnego, a nie szczepy laboratoryjne – znakomicie pokazuje zróżnicowaną „osobowość” zwierząt. U myszy można bowiem wyróżnić temperament, czyli – antropomorfizując – osobowość. Doświadczeni behawiorysty niejednokrotnie napotykały zróżnicowane zachowania w grupie osobników identycznych pod względem genetycznym – np. w teście podniesionego labiryntu krzyżowego zawsze można spotkać osobnika, który spędzi cały czas eksperymentu w centrum labiryntu i nie wejdzie do żadnego ramienia.

Próby wyjaśnienia podobnych zachowań w szczepach krzyżowanych krewniaczo, a więc jednorodnych pod względem genetycznym, napotykały na trudności. Ciekawym przyczynkiem jest zwrócenie uwagi na ułożenie płodów w macicy. Macica myszy ma budowę dwurożną a mioty, zazwyczaj liczne mioty ułożone są liniowo w każdym z tych rogów. Pomiędzy płodami następuje wymiana hormonalna i wykazano, że płód płci męskiej ułożony w macicy pomiędzy dwoma samicami będzie nieco inny niż płód płci męskiej, któremu zdarzyło się dojrzewać pomiędzy dwoma samcami [14] i ta pozycja ma przełożenie na zachowania w późniejszym życiu postnatalnym – ekspozycja na androgeny ma bowiem wpływ na rozwój mózgu, w tym ośrodków odpowiedzialnych za zachowania agresywne, dlatego osobniki ułożone pomiędzy samcami będą bardziej agresywne niż te ułożone pomiędzy samicami. Z kolei samice ułożone pomiędzy samcami mogą wykazywać cechy bardziej „samcze” (maskulinizacja). Wykazano także, że bliskość płodów płci żeńskiej wpływa na rozwój gruczołu krokowego samców. Ciekawe jest to, że u szczurów większy efekt ma ogólna proporcja samic i samców w miocie niż konkretne wzajemne ułożenie płodów w macicy.

Wpływ hormonów na wczesne stadia rozwoju osobniczego realizuje się poprzez złożone szlaki biochemiczne, których immanentną cechą jest możliwość stochastycznego błędu. Podobnie taka możliwość może wystąpić na etapie regulacji ekspresji genów – poprzez takie procesy jak metylacja DNA czy kondensacja chromatyny (są to zmiany w strukturze materiału genetycznego, DNA) – dlatego u poszczególnych osobników może dochodzić do niewielkich różnic fenotypowych mimo identycznego genotypu. Zmiany te mogą być następnie wzmacniane podczas rozwoju osobniczego. Oczywiście należy także pamiętać o możliwości powstania drobnych zmian w samym genomie. Punktowe mutacje genetyczne są raczej rzadkie, ale genom ssaków zawiera rozliczne

tw. powtórzone sekwencje minisatelitarne (VNTR, *variable numbers of tandem repeats*) i transpozony, które także mogą dokładać swój udział do zróżnicowania osobniczego. Obliczono, że u gryzoni częstość spontanicznych wariacji może wynosić ok. 10 na genom na pokolenie [1] i te sekwencje minisatelitarne wykazują dużą podatność na taką zmienność. Nie do końca wiadomo, jaki wpływ mają te sekwencje na fenotyp, szczególnie u myszy, ale na ich znaczenie mogą wskazywać przykłady badań na materiale ludzkim. Wskazuje się m.in. na korelacje określonych sekwencji VNTR występujących w pobliżu genu kodującego insulinę z częstością występowania cukrzycy typu I i z otyłością dziecięcą.

W rozwoju osobniczym może dochodzić do współzawodnictwa o substancje odżywcze. W badaniach wpływu suplementacji diety matki nienasyconymi kwasami tłuszczowymi na zachowania potomstwa wykazano silną korelację z zachowaniami dominującymi. Z drugiej strony potomstwo niedożywionych matek wykazywało więcej zachowań submisyjnych (podporządkowanie). W ogóle „losy” matki odgrywają ogromną rolę w późniejszym życiu potomstwa. Między innymi rozmaite sytuacje stresowe – zagęszczenie, przegrzanie, unieruchomienie czy też infekcja – wywołują zmiany w zdolnościach eksploracyjnych, zachowaniach agresywnych czy dominacji. Jakkolwiek intuicyjnie można by się tego spodziewać i są to ważne obserwacje, to jednak należy podkreślić, że zwierzęta hodowane z przeznaczeniem do badań naukowych nie będą poddawane tego typu stresom.

Przyczyny zmienności biologicznej – okres postnatalny

Ciekawe natomiast jest spojrzenie na wczesny okres postnatalny, czyli zaraz po urodzeniu: jak opisano wyżej, dany miot, nawet identyczny pod względem genetycznym (ale już zróżnicowany ze względu na drobne zmiany w sekwencjach minisatelitarnych czy stan chromatyny), jest zróżnicowany poprzez swoją pozycję w macicy, czyli ekspozycję na hormony płciowe. A więc oseski rodzą się już niejednakowe, mimo tego samego genomu. Zróżnicowaniu ulega też możliwość zdobycia pokarmu po urodzeniu – asertywne samce będą szybciej przybierać na wadze, bo efektywniej i szybciej znajdą drogę do matczynej sutka; z kolei te mniej asertywne osobniki będą przeżywać „stres społeczny” i będą słabiej odżywione. To wszystko będzie miało fundamentalny wpływ na „status społeczny” w stadzie i ogólnie na mieralne w testach parametry zachowania. Podobnie ważna jest ogólna opieka matczyna – nie wszystkie oseski

są tak samo traktowane przez matkę – wykazano, że matczyna opiekuńczość przyczynia się do wzrostu zachowań agresywnych, ale też do osiągnięcia wyższego statusu w hierarchii stada przez samce [2; 13].

Wydawać by się mogło, że mając te wszystkie informacje – m.in. pozycja płodu w macicy, poziom hormonów płciowych, poziom odżywienia, stopień zaangażowania matki w opiekę – można wytypować behawioralne predyspozycje danego osobnika. Hilakivi-Clark i Lister [7] zadali to pytanie w eksperymencie, w którym pogrupowano osobniki za względu m.in. na ich zachowania lękowe, poziom zachowań agresywnych czy zdolności eksploracyjne i umieszczono je w klatkach po 4–5 osobników. W każdej z klatek wytworzyła się dość szybko hierarchia i nie zaobserwowano żadnej korelacji pomiędzy tymi „przedwstępnymi predyspozycjami” a pozycją myszy w hierarchii. Wniosek z tych badań wyciągnięto taki, że nie można wykluczyć istnienia tych „przedwstępnych predyspozycji”, ale mogą one nie być najważniejsze albo też zastosowane w tej „preselekcji” testy były nieadekwatne do określenia tego „końcowego” fenotypu. Tu można się pokusić o dygresję dotyczącą statusu społecznego w gatunku *Homo sapiens* – często rola społeczna, jaką pełni (lub jaką los nas obdarzył), zależy od tego, w jakim towarzystwie się znajdziemy...

Naturalnie jest wiele badań charakteryzujących zwierzęta laboratoryjne w zależności od ich statusu w hierarchii stada – wydaje się na przykład, że dominujące samce mają wyższą ogólną aktywność i, chociaż są bardziej agresywne, to jednak wykazują silniejsze zachowania lękowe w teście podniesionego labiryntu krzyżowego niż osobniki podporządkowane. Są też badania dotyczące zróżnicowanej odpowiedzi na związki farmakologiczne (m.in. leki psychotropowe, leki uzależniające, alkohol) w zależności od statusu osobnika w hierarchii – ale to już inna opowieść. W tym artykule staramy się odpowiedzieć na pytanie, skąd w ogóle bierze się zróżnicowanie w stadzie krzyżowanym krewniaczo (czyli o identycznym genomie).

Czy neurogeneza w dorosłym mózgu ma znaczenie dla statusu społecznego w stadzie?

Większa ogólna aktywność skorelowana ze statusem w stadzie może przyczyniać się do wzrostu neurogenezy w hipokampie, co z kolei poprawia pamięć i zdolności uczenia się. Można założyć, że wytwarza się w ten sposób pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego, która wzmacnia dominujący status osobnika. Z takim założeniem wykonano ciekawy eksperyment,

którego wyniki opublikowano w *Science* [6]. Badania wykonano na myszach szczepu C57BL/6N (samice, $n = 40$); utrzymywano je w wyjątkowo wzbogaconym środowisku (cały układ nazwano instalacją) przez 3 miesiące, a dzięki identyfikatorom radiowym, w które wyposażono zwierzęta oraz antenom zlokalizowanym w różnych miejscach instalacji, w której się znajdowały, mierzono parametry eksploracyjne. Po zakończeniu eksperymentu behawioralnego zmierzono poziom neurogenezy w hipokampie, jako markera rozwoju mózgu, poprzez pomiar dzielących się neuronów – czyli określano liczbę tych, w których można było zidentyfikować inkorporację bromo-deoxy-urydyny do DNA. Zwierzęta pozostające przez 3 miesiące w tym wzbogaconym środowisku rzeczywiście wykazywały silniejszą neurogenezę niż zwierzęta kontrolne (dla ścisłości – był to mniejszy spadek liczby nowych neuronów związany z wiekiem); ponadto zauważono wzrost liczby innych ważnych komórek mózgu, tj. astrocytów. Naturalnie zauważono też w tym eksperymencie indywidualne różnice wśród osobników w ich aktywności eksploracyjnej. Nie udało się jednak uzyskać znamiennej statystycznej korelacji tego parametru ze stopniem neurogenezy. Było to rozczarowujące i przeczyło wstępnej hipotezie zakładającej, że indywidualne różnice w zachowaniu poszczególnych osobników miałyby wynikać z różnicy w procesach zawiadujących neurogenezą. Hipoteza taka była uzasadniona, gdyż uważa się, że hipokampalna neurogeneza jest procesem odpowiedzialnym za plastyczne adaptacje, szczególnie w obliczu nowych doświadczeń i wyzwań nakładanych przez złożoność środowiskową. Ponieważ indywidualne różnice w zachowaniu zwierząt eksperymentalnych były jasno widoczne, dlatego autorzy badań postanowili spojrzeć na wyniki poprzez oszacowanie prawdopodobieństwa, że dana mysz znajdzie się w danym miejscu w określonym czasie, co pozwoliło oszacować zakres terytorium eksplorowany przez zwierzę. Nazwano ten parametr „nieuporządkowaniem wędrówek” (*roaming entropy*, RE). Jest to parametr zmieniający się w sposób ciągły. Niskie RE wykazują myszy eksplorujące mały zakres terytorium albo nawet, gdy eksplorują większy zakres, to skupiają zainteresowanie na zaledwie kilku punktach oddalonych od siebie. RE jest wysokie, gdy mysz eksploruje równomiernie cały dostępny im obszar. Dalej pomiary RE podzielono na 4 interwały czasowe po 24 dni każdy i wyniki poddawano różnym analizom, wyznaczając m.in. kumulatywną entropię wędrówek. Dopiero takie zaawansowane podejście do problemu pozwoliło wykazać, że u myszy, które szeroko eksplorowały otoczenie, można było

faktycznie zaobserwować więcej nowych neuronów w hipokampie.

Szczepy krewniacze (*inbred*) vs niekrewniacze (*outbred*)

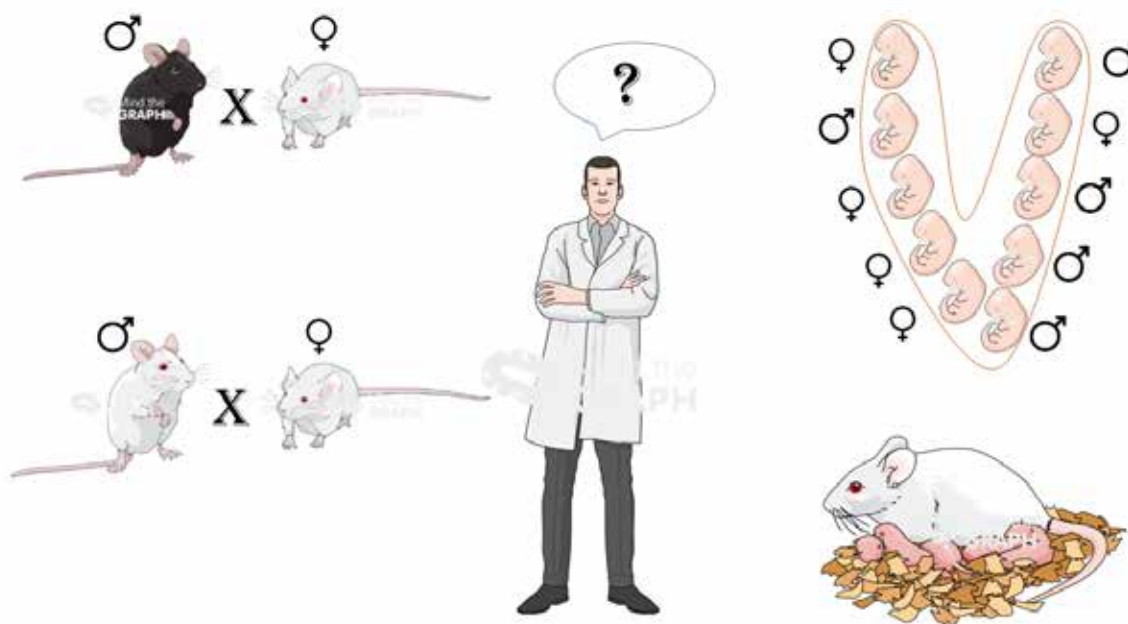
Badania tego typu pokazują, że wcale nie jesteśmy blisko odpowiedzi na pytanie, dlaczego osobniki ze szczepów krzyżowanych krewniaczo są jednak zmienne – mimo, że stosując takie szczepy chcemy mieć pewność, że zmniejszamy w ten sposób rozrzut wyników doświadczalnych. Na dodatek należy wspomnieć o ostatnio opublikowanej w *Nature Methods* meta-analizie, w której autorzy porównali wyniki różnych badań z zakresu biomedycyny wykonanych z zastosowaniem szczepów krzyżowanych krewniaczo i niekrewniaczo [15]. Porównano 107 opublikowanych artykułów naukowych, w których można było dokonać oszacowania wyników dotyczących 741 parametrów, pogrupowanych w następujące kategorie: zmienność anatomiczna, zachowania zasocjowane z funkcjonowaniem układu nerwowego, inne zachowania, funkcje układu immunologicznego, parametry biochemiczne, funkcjonowanie organów. Niespodziewane wnioski z tych analiz prowadzą do konkluzji, że szczepy krzyżowane krewniaczo wcale nie są bardziej stabilne niż szczepy niekrewniacze – w oryginale brzmi to tak: „...in most instances the *inbred* population is not less noisy than *outbreds*”. Co więcej, autorzy konkludują, że szczepy niekrewniacze są nawet lepiej przystosowane do badań naukowych, gdyż pozwalają na uzyskanie wyników bardziej odzwierciedlających sytuację naturalną. Zmienność fenotypowa, jaką widzimy w populacji krzyżowanej krewniaczo, odzwierciedla nienaturalny stan alleli i ich wariantów. W odpowiedzi na perturbacje środowiskowe osobnik ma ograniczone możliwości reagowania, podczas gdy stado niekrewniacze ma wiele wariantów allelicznych, które mogą sprzyjać precyzyjnej odpowiedzi na wyzwania. Zmienność i różnorodność tła genetycznego może mieć właśnie efekt buforujący i stabilizujący końcowy fenotyp. Autorzy mocno opowiadają się za stosowaniem w badaniach laboratoryjnych szczepów krzyżowanych niekrewniaczo, poza oczywiście sytuacjami, kiedy dokładna charakterystyka genotypowa jest przedmiotem badań, jak często się zdarza m.in. w badaniach immunologicznych.

Podsumowanie

W niedawnym poważnym i obszernym opracowaniu analizującym problem niskiej powtarzalności

wyników badań z zakresu biomedycyny wykonywanych z użyciem zwierząt laboratoryjnych autoryzują zróżnicowanie grup badanych zwierząt poprzez mieszanie nie tylko szczepów laboratoryjnych i płci, ale też wprowadzenie do badań zwierząt hodowanych w warunkach naturalnych [16]. Trudno powiedzieć, czy to się w ogóle da wprowadzić do praktyki. Należy bowiem podkreślić, że na problem niskiej powtarzalności wyników badań zwracano uwagę od co najmniej 20 lat i niewiele się w tej sprawie zmienia. Niemniej jednak wydaje się,

że zmienność biologiczna zwierząt laboratoryjnych jest istotnym czynnikiem, który z jednej strony niejednokrotnie „zaburza” idealny układ doświadczalny, ale z drugiej – jest arcyciekawym zjawiskiem. Należy jednak podkreślić, że ogromna większość spośród dostępnych leków została dopuszczona do stosowania w klinice właśnie dzięki szerokim badaniom na zwierzętach. Podobnie jak wiele substancji mających potencjał terapeutyczny zostało wykluczonych z klinicznych zastosowań dzięki tym badaniom.



Ryc. 1. Nerozwieszony problem – jak stworzyć najlepszy układ doświadczalny z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych? Opracowanie autorów z wykorzystaniem zasobów mindthegraph.com

Bibliografia:

1. Bois, P., Stead, J.D., Bakshi, S., Williamson, J., Neumann, R., Moghadaszadeh, B., Jeffreys, A.J. (1998). Isolation and characterization of mouse minisatellites. *Genomics*. 50, 317-330.
2. Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*. 79, 359-371.
3. Crabbe, J.C., Wahlsten, D., Dudek, B.C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*. 284, 1670-1672.
4. Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 132, 107-124.
5. Crowcroft P., (1966). *Mice all over*. G. T. Foulis & Co., London

6. Freund, J., Brandmaier, A.M., Lewejohann, L., Kirste, I., Kritzler, M., Krüger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., Kempermann, G. (2013). Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science*. 340, 756-759.
7. Hilakivi-Clarke, L.A., Lister, R.G. (1992). Are there preexisting behavioral characteristics that predict the dominant status of male NIH Swiss mice (*Mus musculus*)? *J Comp Psychol*. 106, 184-189.
8. Hines, W.C., Su, Y., Kuhn, I., Polyak, K., Bissell, M.J. (2014). Sorting out the FACS: a devil in the details. *Cell Rep*. 6, 779-781.
9. Ioannidis, J.P. (2005). Why most published research findings are false. *PLoS Med*. 2, e124.
10. Ioannidis, J.P. (2016). Why Most Clinical Research Is Not Useful. *PLoS Med*. 13(6), e1002049.
11. Klionsky, D.J. (2016). Developing a set of guidelines for your research field: a practical approach. *Mol Biol Cell*. 27, 733-738.
12. Loos, M., Koopmans, B., Aarts, E., Maroteaux, G., van der Sluis, S., Neuro-BSIK Mouse Phenomics Consortium, Verhage, M., Smit, A.B. (2015). Within-strain variation in behavior differs consistently between common inbred strains of mice. *Mamm Genome*. 26, 348-354.
13. Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*. 24, 1161-1192.
14. Ryan, B.C., Vandenbergh, J.G. (2002). Intrauterine position effects. *Neurosci Biobehav Rev*. 26, 665-678.
15. Tuttle, A.H., Philip, V.M., Chesler, E.J., Mogil, J.S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat Methods*. 15, 994-996.
16. Voelkl, B., Altman, N.S., Forsman, A., Forstmeier, W., Gurevitch, J., Jaric, I., Karp, N.A., Kas, M.J., Schielzeth, H., Van de Castele, T., Würbel, H. (2020) Reproducibility of animal research in light of biological variation. *Nat Rev Neurosci*. 21, 384-393.
17. Wahlsten, D., Metten, P., Phillips, T.J., Boehm, S.L. 2nd, Burkhart-Kasch, S., Dorow, J., Doerkson, S., Downing, C., Fogarty, J., Rodd-Henricks, K., Hen, R., McKinnon, C.S., Merrill, C.M., Nolte, C., Schalomon, M., Schlumbohm, J.P., Sibert, J.R., Wenger, C.D., Dudek, B.C., Crabbe, J.C. (2003) Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol*. 54, 283-311.