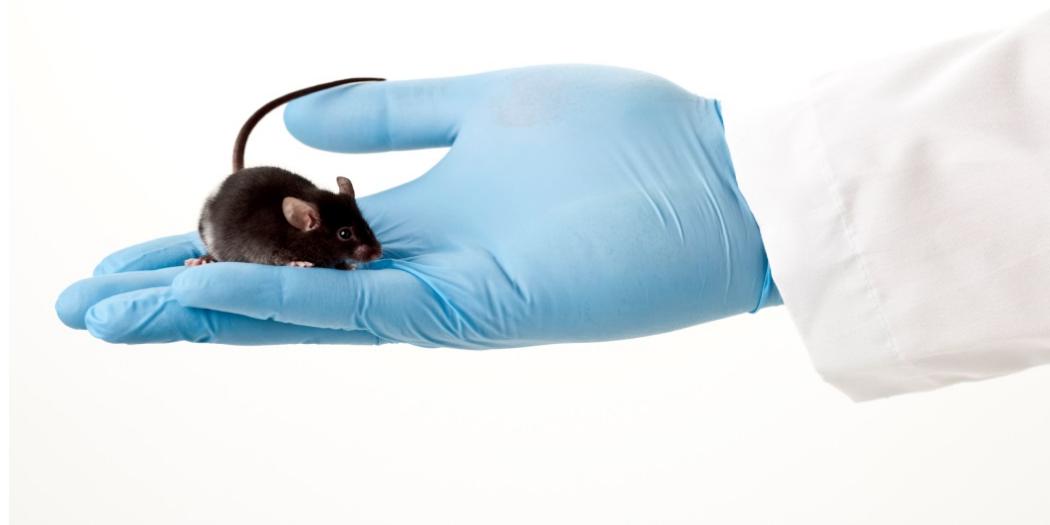


BILTEN

Službeno glasilo

2015

Hrvatsko
društvo za
znanost o
laboratorijskim
životinjama



BILTEN

SADRŽAJ

Službeno glasilo Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA)

Članovi uredništva:

Sofia Ana Blažević
Julija Erhardt
Maja Lang Balija
Blanka Smolić
Dubravka Švob Štrac

Radionica CROLASA „Primjena 3r
pristupa u radu s laboratorijskim
životinjama“ 2

Sastanak upravnog odbora FELASA 5

Zebrice - alternativni model u
toksikološkim istraživanjima 9

Drosophila melanogaster: mali organizam
u bihevioralnoj genetici kompleksnih
ponašanja 14

Kratka povijest upotrebe miševa kao
laboratorijskih životinja 23

U ovom broju priloge pripremili:

Rozi Andretić Waldowski
Sanja Babić
Sofia Ana Blažević
Nataša Jovanov Milošević
Maja Lang Balija

Bilten izlazi jednom godišnje.

Zagreb, 2015. godina.

Aktivnosti Društva

RADIONICA CROLASA „PRIMJENA 3R PRISTUPA U RADU S LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA“

Maja Lang Balija

Nataša Jovanov Milošević

Naše Društvo (Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama - CroLASA) u suradnji s Medicinskim fakultetom u Zagrebu, organiziralo je dvodnevnu edukativnu radionicu na temu „Primjena 3R pristupa u radu s laboratorijskim životinjama“. Radionica je održana 22. i 23. listopada ove godine na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga.



Ideja za organiziranjem ovakve radionice potekla je iz promišljanja o nužnosti sve većeg usmjeravanja znanstvenih istraživanja u pronašačenju suvremenijih metoda koje bi racionalizirale upotrebu pokusnih životinja u testiranju ili barem smanjila broj korištenih životinja.

I naš Zakon o zaštiti životinja (NN 135/06, 37/13, 125/13) usklađen je sa suvremenim spoznajama i preporukama koje se odnose na rad sa pokusnim životnjama.

Sve se više pažnje posvećuje etičkim postupcima u skladu s tzv. 3R načelom, te je njihovo provođenje i pridržavanje propisano različitim međunarodnim deklaracijama (EU Direktiva 2010/63 EU).

Sama radionica bila je zamišljena kao edukacijska nadogradnja zakonom propisanog tečaja za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama. Cilj ove radionice bio je educirati znanstvenike iz područja teorijske i praktične primjene 3R načela u planiranju i provođenju pokusa na laboratorijskim životnjama.

Kao što je poznato, 3R načelo podrazumijeva smanjivanje broja životinja u *in vivo* pokusima, poboljšanje provođenja pokusa na životinjama i zamjenu korištenja životinja sa alternativnim metodama, u onoj mjeri kada takvi postupci ne ugrožavaju kvalitetu znanstvenog istraživanja ili edukacije.

Prema tom načelu baziran je i koncept radionica koji se sastojao od uvoda i 3 sekcije: zamjena (eng. *replacement*), poboljšanje (eng. *refinement*) i smanjene (eng. *reduction*).

U uvodnom dijelu radionice se govorilo o neophodnosti *in vivo* pokusa na životinjama u biomedicinskim istraživanjima, u određenoj mjeri i pod primjerenim uvjetima (Maja Lang Balija, CIPZB).

Također u uvodu je bilo riječi i o zahtjevima zakonodavstva vezano za primjenu alternativnih metoda u pokusima (Branka Buković Šošić, Ured za dobrobit životinja, Ministarstva poljoprivrede) i općenito o etičkim pitanjima koja se otvaraju pri istraživanjima koja se provode na živim životinjama (Sofia Ana Blažević, PMF).

Polaznici su također mogli dobiti uvid u kojoj mjeri i na koji način su implementirana 3R načela u zemljama EU (Darko Modun, MF Split), te kako se primjenjuje 3R načelo na primjeru istraživačkog projekta akademske zajednice (Srećko Gajović, MF Zagreb), a kako u okviru dobre laboratorijske prakse u istraživačkim laboratorijima (Doroteja Kirhmajer, samostalni savjetnik za uvođenje GLP).

Sekcija *Zamjena* u teorijskom djelu radionice ponudila je polaznicima pregled alternativnih eksperimentalnih modela. Predstavljeni su *in vitro* pokusi kao alternativni modeli (Dubravka Švob Štrac, IRB).

Također bilo je riječi o vinskoj mušici u bihevioralnoj genetici kompleksnih ponašanja (Rozi Andretić Waldowski, MF Rijeka) i zebrici kao alternativnom modelu u toksikološkim testiranjima (Sanja Babić, IRB).

U praktičnom dijelu polaznici su mogli isprobati, virtualne pokuse iz farmakologije (Darko Modun), zamjenske modele, fantome malih glodavaca za edukaciju (Anica Horvat Knežević, PMF), te vođeno pretraživati mrežne stranice za alternativne metode (Julija Erhardt, PMF).



U sekciji *Poboljšanje* govorilo se o boli, prepoznavanju i procjeni njenog intenziteta u eksperimentalnih glodavaca (Damir Sapunar, MF Split).

Teme su bile i poboljšanje, promjene u rutinskom rukovanju miševima u modelima kroničnih bolesti i na primjeru mišjeg modela reumatoidnog artritisa (Nataša Kovačić, MF Zagreb).

Polaznici su nadalje mogli čuti o čimbenicima i postupcima pri gospodarenju životinjama koji utječu na rezultata dobivenih u *in vivo* pokusima i time na kvalitetu istraživanja, o važnosti njihovog prepoznavanja, i poboljšanjima eksperimentalnog dizajna da bi se uklonili potencijalni negativni učinci (Nataša Jovanov Milošević, MF, Zagreb).

U trećoj sekciji *Smanjenje* prikazan je primjer, tzv. „DoE pristup“ u planiranju *in vivo* pokusa cilju simultanog ispitivanja više parametara u jedinstvenom pokusu inače redovno korištena metoda u optimizaciji tehnoloških postupaka (Beata Hallasy, CIPZB).

Prikazani su regulatorni zahtjevi i načini primjene 3R principa prilikom provjera kakvoće lijeka (Danijela Mikulčić, HALMED).

U praktičnom dijelu ove sekcije polaznici su mogli vidjeti primjere i načine kako se može statistički odrediti i optimizirati broja životinja u pokusu u cilju osiguravanja vjerodostojnosti rezultata i kvalitete istraživanja (Mladen Petrovečki, KBC Dubrava).

Ukratko, radionica je svojim programom ponudila teme iz hrvatskog i europskog zakonodavstva i primjene 3R načela u zemljama članicama EU, etike u biomedicinskim istraživanjima, zamjena pokusnih životinja *in vitro* metodama (kulture stanica i tkiva) ili filogenetski nižim vrstama (upotreba vinske mušice i

zebrica u istraživanjima), zamjenske metode u nastavi (virtualni pokusi iz farmakologije, upotreba lutke štakora za praktično vježbanje medicinskih zahvata u nastavne svrhe), te kako rutinskim rukovanjem i gospodarenjem u nastambi za pokusne životinje smanjiti stres životinjama, te kako prepoznati a potom i izbjegći bol i patnju životinja.

Svojim temama radionica je obuhvatila sva tri preporučena načela kako kroz teorijsku podlogu, ali i kroz praktične vježbe.

Organizacijski odbor radionice činili su Sofia Ana Blažević, Nataša Jovanov Milošević, Julija Erhardt, Maja Lang Balija, Blanka Smolić i Dubravka Švob Štrac. Službeni jezik bio je hrvatski jezik.

Radionici je pristupilo 56 polaznika. Bilo je polaznika s gotovo svih sveučilišta u Hrvatskoj, zatim brojnih istraživačkih institucija, ali i iz privrede.

Hrvatska veterinarska komora doktorima veterinarske medicine sudionicima navedenog stručnog skupa, vrednovala je stručno usavršavanje sa 4 boda.

Povjerenstvo za medicinsku izobrazbu liječnika Hrvatske Liječničke komore kategoriziralo je i vrednovalo stručni skup sa 9 bodova za aktivno sudjelovanje i 7 bodova za pasivno sudjelovanje.

Posebno moramo biti zadovoljni jer je radionica imala i preporuku Ureda za dobrobit životinja, Ministarstva Poljoprivrede kao dio kontinuiranog usavršavanja u korištenju životinja u znanstvene i edukacijske svrhe, čime se pokazala i kvaliteta i značaj same radionice.

Organizatori se zahvaljuju svim predavačima i polaznicima radionice na aktivnoj suradnji tijekom radionice.

Radionica u svom ugodnom okruženju donijela je razmjenu mišljenja i iskustava znanstvenika i stručnjaka u području rada s laboratorijskim životnjama o interpretaciji, osvremenjivanju i proširenju primjene modela 3R u skladu s aktualnim etičkim problemima u istraživanjima na životnjama.

Još jedan pokazatelj kvalitete radionice bile su i ocjene i pohvale koje su polaznici uputili preko anonimne *online* ankete po završetku radionice kao i mnogobrojni upiti, kada i s kojom temom se planira sljedeća radionica.



Aktivnosti Društva

SASTANAK UPRAVNOG ODBORA FELASA

Sofia Ana Blažević

Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životnjama sudjeluje s pravom glasa u Upravnom odboru (*Board of Management, BoM*) FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*) od 2007. godine.

Bianualni sastanci upravnog odbora održavaju se u različitim gradovima država članica FELASA. U FELASA-i trenutno djeluje više od 20 društava koja okupljaju znanstvenike i tehničare iz barem 25 zemalja: Austrija, Belgija, Hrvatska, Češka, Danska, Estonija, Finska, Francuska, Njemačka, Grčka, Island, Irska, Italija, Latvija, Litva, Nizozemska, Norveška, Poljska, Portugal, Rumunjska, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska i Velika Britanija.

Jesenski sastanak 2015. godine održao se u Napulju, 24. listopada, u sklopu simpozija talijanskog društva AISAL *Innovation in laboratory animals science. The future is now.* U nastavku možete pročitati zaključke donesene na sastanku Upravnog odbora.

UNUTARNJI POSLOVI FELASA

Glasovalo se o pristupanju Slovenskog društva – *Society for Laboratory Animals of Slovenia* – SLAS, Upravnom odboru FELASA, koje je jednoglasno prihvaćeno. Drugo društvo koje čeka pristupanje je Irsko društvo - *Irish Laboratory Animal Science Association*. Na prijašnjem sastanku Upravnog odbora FELASA održanog u travnju 2015. godine, izglasano je punopravno članstvo Poljskog društva.

Druga važna odluka donesena na sastanku je mjesto održavanja kongresa FELASA 2019. godine. U drugom krugu glasovanja izglasano je da će se kongres održati u Pragu, Češka.

ODBOR ZA AKREDITACIJU

Važna točka na sastanku bila je rad Odbora za akreditaciju obrazovanja i obuke (*Accreditation Board of Education and Training*). Želja odbora je da se akreditira više tečajeva koja održavaju postojeću visoku kvalitetu, te da se prošire radne mogućnosti odbora, među koje spada i potreba zapošljavanja osobe koja bi to vodila. Naime, svi članovi FELASA rade *pro bono*. Naznačili su da ima sve više *online* tečajeva koji se upotpunjaju s praćenim odnosno mentoriranim radom.

Iako se na tome puno radi, odbor još nije odlučio kako će ocijeniti, te akreditirati kontinuirano obrazovanje (CPD - *Continuing professional development*).

U lipnju ove godine FELASA je izdala nove preporuke vezane za obrazovanje u skladu s novom direktivom 2010/63/EU, prema kojima se više ne akreditiraju kategorije nego kompetencije. Revizija akreditiranih tečaja obavljati će se svake 2 godine. Nedavno je akreditiran prvi tečaj za ovlaštenog veterinara, te 2 tečaja u Indiji, što ukazuje na međunarodnu prepoznatljivost FELASA, i koliko je takvo certificiranje cijenjeno. Najavljen je povećanje godišnje cijene akreditacije na 440€ te 7€ po izdanom certifikatu.



RADNE SKUPINE

FELASA igra važnu ulogu u pripremi smjernica za rad u različitim znanstvenim područjima rada sa životinjama, te u nadzoru i preporukama koje daje političkim tijelima na različitim razinama.

Na sastanku Upravnog odbora FELASA prezentirani su završni radovi triju radnih skupina: 1. AALAS-FELASA *Working Group on Health Monitoring of Rodents for Animal Transfer* iz kojeg je proizašao zajednički rad „A Harmonized Health Reporting Format for International Transfer of Rodents“, 2. AALAS-FELASA *Working Group on Harm-Benefit Analysis of Animal Studies* čiji rad još nije publiciran jer se razmatra način kako ga publicirati zbog opsežnosti, te 3. *Guidelines for the care*

and welfare of cephalopods used in research, čiji rad je publiciran kao suplement u časopisu *Laboratory Animals*.

Trenutačno djeluje 6 radnih skupina koje obrađuju sljedeće teme: *Recommendations for health monitoring of NHP; Severity* na kojem sudjeluju članovi društava FELASA, ESLAV, ECLAM; FELASA-COST radne skupine o *Zebrafish care and use; Genetic Quality Assurance and Genetic Monitoring of Laboratory Murines;* FELASA-AALAS radne skupine o transportu laboratorijskih životinja, te radne skupine o prehrani laboratorijskih glodavaca.

Sugerirane su i radne skupine za sljedeće teme: *Animals in and from the wild* (radna skupina bi bila sastavljena od članova FELASA i ICLAS ili ESLAV), radna skupina za životinje na farmama, FELASA-AALAS zajednička radna skupina za *Health Monitoring for fish in Research*, te zajednička radna skupina SGV-FELASA o *Occupational Health and Safety* koja će između ostalog raspravljati o potrebi uključivanja znanosti o laboratorijskim životnjama u tečajeve biološke sigurnosti (eng. *biosafety*). Nadalje, FELASA i *European biosafety association* bi se međusobno uključivale u rad i edukaciju.

CroLASA će svojim članovima proslijediti tekstove radnih skupina kako bi mogli komentirati i dati sugestije, kako na početku rada radnih skupina (dajući mogućnosti predlaganja teme za radnu skupinu) tako i na kraju rada kao mogućnost

komentiranja radnih verzija smjernica koje proizlaze iz svake radne skupine.

MEĐUNARODNA SURADNJA

Međunarodna prisutnost FELASA je također važna. Članovi FELASA sudjeluju kao dio uprave, u statusu promatrača, u evaluacijama pojedinih slučajeva, u zajedničkim radnim skupinama, te kao promatrači u sastancima upravnih odbora različitih međunarodnih društava. FELASA ima međunarodnu suradnju s AALAS i ICLAS, sudjeluje u odboru povjerenika (*Board of trustees*) AAALAC, te u predsjedništvu ETPLAS. U upravnom odboru FELASA, ESLAV i ISTT imaju status promatrača. ICLAS je njavio svoje sudjelovanje na kongresu FELASA 2016. godine u Briselu.

EUROPSKI POSLOVI

Unutar Europskih poslova predsjednik FELASA, Heinz Brandstetter, je obavijestio o sastanku EARA (*European Animal Research Association*) gdje FELASA ima statut promatrača. Zaključci glavne skupine EARA bili su da treba u državama članicama EU promovirati bolju komunikaciju između laboratorijskih institucija i političara i javnosti općenito, te su ukazali na dobru praksu posjeta ministara različitim znanstvenim institucijama i dobar odjek u medijima. U tom kontekstu naglašena je važnost javnog objavlјivanja statistike o radu sa životnjama.

David Smith objasnio je da Europskoj komisiji sada stižu mnoge primjedbe na

Direktivu 201/63/EU, te da se pokušavaju riješiti sive zone koje se nalaze u direktivi, te da je dobro da se i dalje šalju takvi upiti regionalnom odnosno europskom nadležnom tijelu. Ovo se odnosi također na probleme nastale u obrazovanju koji još nisu predviđeni u direktivi, kao na primjer na one nastale nakon što se poхађa tečaj u jednoj od država članica ali koji i dalje u nekim zemljama EU nije priznat te ga je potrebno ponavljati zbog lokalnih pravila.

Također kao predsjednik ETPLAS-a, David Smith je objasnio da je ETPLAS platforma koja ima isključivo ulogu umrežavanja osoba koje se bave obrazovanjem, te nije akreditacijsko tijelo nego samo izvor za razmjenu dobre prakse. Poticali su sve članove da odgovore na anketu EFPIA, ELSA (*European Live Science Alliance*) koja želi biti znanstveni odgovor pokretu *STOP VIVISECTION*.

Beatriz Pintado obavijestila je upravni odbor o *EuroMouse Academia* koja je u nastanku i traži podršku FELASA. Srž konzorcija *EuroMouse Academia* će biti *Infrafrontier*, sastavljen od sveučilišta, znanstvenih institucija i industrije. Želja konzorcija je pružiti homogeni okvir znanja te stvoriti „europsku“ perspektivu u polju obrazovanja u mišoj genomici i biomedicini. Krajnji cilj je razvitak zajedničkog europskog magistarskog studija mišje biomedicine (*joint European Master Degree in mouse biomedicine*). FELASA će u tome sudjelovati kao savjetodavno tijelo.

ORGANIZACIJA LABORATORY ANIMALS LIMITED (LAL)

Časopis *Laboratory Animals* je službeni časopis dobrotvorne organizacije *Laboratory Animals Limited (LAL)* čiji cilj je promovirati obrazovanje u znanosti o laboratorijskim životinjama. Časopis je ujedno i službeni časopis FELASA. Na sastanku upravnog odbora prezentiran je napredak u načinu publiciranja te su najavljene promjene povodom 50. godišnjice časopisa u 2016. godini: povećanje izdanja od 4 na 6 puta godišnje (prvi broj u veljači 2016.), prijevodi sažetaka u svakom broju na tri jezika (francuski, njemački, španjolski), novi odjeljak u svakom broju za vijesti, najave i izvješća pretplaćenih udruga.

Svi prisutni podsjećeni su da LAL dijeli razne stipendije, npr. *translating grants* koje omogućuju da istraživač putuje u drugi laboratoriji na trening te da tako stekne iskustvo koje će poslije dijeliti sa svojim kolegama u matičnoj ustanovi/državi, stipendije za sudjelovanje na kongresima, i slično.

KONGRES FELASA 2016. GODINE

Počele su prijave za kongres FELASA koji će se održati u lipnju 2016. godine u Briselu. Rana registracija je do 31.3.'16., a članovi FELASA/CroLASA imaju nižu kotizaciju. Potičemo sve članove koji su u mogućnosti da sudjeluju u kongresu.

FELASA će dodijeliti nekoliko stipendija mladim istraživačima. Organizatori skupa su otvoreni za teme

sekcija vezane za 6 glavnih pravaca kongresa koje se mogu naći na njihovoj web stranici, a prijedlozi se također mogu poslati na e-mail adresu: scientific@felasa2016.eu. Na kongresu će biti dodijeljen FELASA Award, nagrada za cjeloživotno djelo iz znanosti o laboratorijskim životinjama. Ukoliko smatrate da jedan Vaš kolega ili kolegica zасlužuje takvo priznanje, prijave su otvorene do 31. siječnja 2016.



BUDUĆI SASTANCI UPRAVNOG ODBORA FELASA

Najavljeni su i sljedeći sastanci upravnog odbora FELASA: u lipnju 2016. godine u Briselu u sklopu kongresa FELASA, u jesen 2016. godine u Bukureštu, te u proljeće 2017. godine u Ljubljani.

ZAKLJUČNO

FELASA kao federacija okuplja sve europske udruge za znanost o laboratorijskim životinjama, čime dobiva sve veću važnost u obrazovanju i savjetovanju u ovom području kako na nacionalnim tako i na međunarodnim razinama. CroLASA kao član ima pravo predlagati teme za rad FELASA, te su sve Vaše ideje dobrodošle.

Predstavljamo

ZEBRICE - ALTERNATIVNI MODEL U TOKSIKOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

Sanja Babić

Zebrica vrste *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) je slatkovodna, bentopelagička riba iz porodice Cyprinidae (šarani). Riječ je o tropskoj ribi koju se vrlo često može vidjeti uz rubove rižinih polja Indije, po čemu je dobila i ime ("dhani" - "od rižinih polja").

Zebrica je vrlo brza i živahna riba, prepoznatljiva po ~5 cm dugom, svijetlo sivom tijelu sa 4 horizontalne tamnije pruge koje se protežu od škržnih poklopaca do repa. Tijekom odraslog perioda, ženke se razlikuju od mužjaka po krupnjem trbuhi.

Prosječni životni vijek zebrice iznosi 5 god. Zebrica nije zahtjevna po pitanju hrane i uzgoja, lako i relativno jeftino se održava, ima brzu izmjenu generacija te daje veliki broj potomaka (1 par zebrica po mrijestu daje ~100-200 embrija), čiji se embrionalni razvoj odvija brzo i *ex utero* (Lawrence, 2007). U Europu je prvi puta unijeta 1905. god., te je ubrzo postala jednom od najpopularnijih akvarijskih riba.



Prikaz ženke (iznad) i mužjaka (ispod) zebrice vrste *D. rerio*

Kao veliki zaljubljenik u akvaristiku i znanost, George Streisinger odlučio je spojiti te dvije krajnosti te tada vrlo popularnu akvarijsku ribu - zebricu, 1981. god. upotrijebiti kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima unutar laboratorija Sveučilišta u Oregonu. S obzirom na veliki entuzijazam te dostignuća u području utjecaja genetskih mutacija na razvoj živčanog sustava zebrice, mnogi ga nazivaju "ocem istraživačkog rada na zebricama" (Li i sur. 2013).

Potencijal zebrica uvidjeli su znanstvenici diljem svijeta, čime je zebrica zaokupila pažnju većine znanstvenih institucija. Brojna istraživanja koja su uslijedila rezultirala su stvaranjem baze podataka detaljno opisanih razvojnih stadija (Kimmel i sur. 1995) i sekvenciranjem genoma koje je završilo 2010. god. na Sangerovom Institutu (2014. god. nadopunjena verzija).

Tada je utvrđeno kako zebrice i ljudi dijele 70% zajedničkog genoma, od čega je čak 84% gena uključenih u genetske bolesti čovjeka prisutno i u zebricama (Howe i sur. 2013).

To saznanje postalo je temeljem mnogih biomedicinskih istraživanja, kao i brojnih eksponencijalno rastućih znanstvenih publikacija.

Osim genetske podudarnosti, utvrđena je velika fiziološka sličnost između zebrike i čovjeka, zbog čega je rezultate dobivene u istraživanju sa zebricama moguće ekstrapolirati na sisavce i ljude.

Iz tog razloga, zebrica je postala standardnim modelnim organizmom u brojnim istraživanjima, a ponajviše u proučavanju kardiovaskularnih, hematopoetskih i neuroloških poremećaja, bolesti bubrega, skeleta, nastanku karcinoma te poremećaja u ponašanju.

Također, s obzirom na izuzetnu sposobnost regeneracije tkiva (srca, bubrega, mozga, ledne moždine, itd.) zebrica je postala modelom koji daje nadu za izlječenjem pacijenata koji su pretrpili srčani ili moždani udar, akutne povrede vitalnih organa, itd.

Do danas su razvijeni brojni mutantni sojevi zebrica sa već predodređenim poremećajima, a sve sa ciljem izlječenja tih bolesti kod ljudi (Kari i sur., 2007; Lieschke i Currie, 2007; Meeker i Trede, 2008; MacRae i Peterson, 2015).

Zebrica je pronašla svoju primjenu i u (eko)toksikološkim istraživanjima.

Dobro razvijeni organi već u embrionalnom stadiju, omogućili su zebrići da postane izvrsnim modelom za određivanje toksičnosti

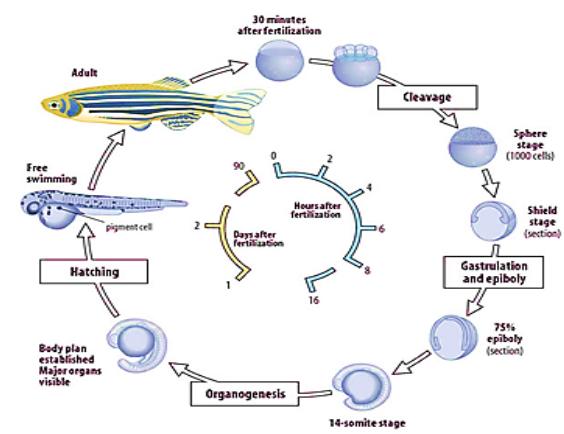
novosintetiziranih spojeva/okolišnih uzoraka na vitalnim organima (kardiotoksičnost, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, itd) (Howe i sur., 2013).

Izuzetna osjetljivost zebrice na široki spektar toksikanata čini ju idealnim organizmom za biomonitoring zagađenosti okoliša.

Dosadašnja istraživanja na zebričama obuhvaćaju testiranja cijelog raspona različitih spojeva (farmaceutika, endokrinih disruptora, teških metala, industrijskih spojeva, itd) (Haendel i sur., 2004; Akande i sur., 2010; Kovrižnych i sur., 2013; Fleming i Alderton, 2013; Santos i sur., 2014; Pamanji i sur., 2015).

S obzirom na izvrsnu korelaciju rezultata dobivenih kroničnim izlaganjem odraslih zebriča sa akutnim izlaganjem embrija, u istraživanjima se intenzivno daje prednost najranijem razvojnog stadiju. Prvenstveno, embrij je najosjetljiviji period u razvoju svakog organizma, što ga istovremeno čini najrelevantnijim stadijem pogodnim za znanstvena istraživanja i procjenu utjecaja na okoliš, okolišne organizme, a u konačnici i čovjeka.

Embrionalni razvoj zebričice traje svega 72 h, što znanstvenicima omogućava da u kratkom vremenu dobiju odgovore o potencijalnoj toksičnosti testiranog spoja.



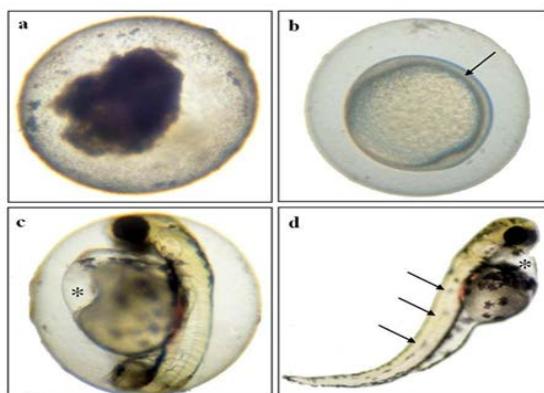
Shematski prikaz brzog razvoja zebričice *D. rerio* od embrionalnog do odraslog stadija

Embrij zebričice, omogućava provođenje brojnih međunarodno priznatih i standardiziranih protokola. Jedan od najčešće korištenih testova u toksikološkim istraživanjima je svakako test toksičnosti na embrijima zebričica (engl. *zebrafish embryotoxicity test*; ZET; OECD 236:2013) u kojem se u prvih par dana razvoja embrija prati letalni učinak testiranog spoja poput koagulacije embrija, neformiranja somita, neodvajanja repa od žumanjčane vreće, prestanak rada srca.

Istovremeno se prate i sub-letalni učinci poput formiranja edema, skolioze kralježnice, razvojnih retardacija, itd. ZET se uspješno provodi za procjenu toksičnosti okolišnih uzoraka, ali i pojedinačnih spojeva.

Dodatna prednost ovog testa je u tome što zebričice, prema Direktivi o zaštiti životinja koje se koriste u laboratorijske svrhe (2010/63/EU) podilaze pod okvire zakonske regulative tek kada su sposobne na samostalno plivanje i

hranjenje. Kod zebrike to počinje 120 sati nakon oplodnje.



Prikaz odabralih letalnih i sub-letalnih učinaka testiranog spoja: a) koagulacija embrija b) nedostatak somita (strelica) c) edem u području žumanjčane vreće d) skolioza kralježnice i nedostatak somita (strelica), edem u području perikarda (zvjezdica)

Upotreba životinjskih modela u suvremenoj humanoj medicini i toksikologiji je nužna, no pritom se sve veći naglasak stavlja na etičke principe upotrebe životinja u testiranjima, koji nalažu odgovarajuću zamjenu modelnog organizma, racionalizaciju i smanjenje broja životinja korištenih u pokusu, te poboljšanje dosadašnjih korištenih metoda.

S obzirom na sličnost genoma i fizioloških karakteristika s ljudima, te na sve veću dostupnosti brojnih mutantnih i transgeničnih linija, zebrica je postala sve popularnijim zamjenskim modelom viših kralježnjaka.

Dostupnost velikog broja potomaka koji do 120. h nakon oplodnje ne podilaze pod okvire zakonske regulative, omogućava nam redukciju velikog broja odraslih životinja (ponajviše glodavaca) koji se koriste u znanstvenim istraživanjima. Istovremeno, transparentnost embrija tijekom cijelog embrionalnog razvoja omogućuje nam primjenu sličnih procedura kao na sisavcima, na gotovo ne-invazivan način. Time je uvelike smanjena patnja velikog broja sisavaca, a samim time znanstvenicima je omogućeno puno preciznije i jednostavnije reproduciranje dobivenih rezultata.

Unatoč nebrojenim prednostima, zebrica nije idealni organizam u svakom tipu istraživanja. To se ponajviše odnosi na istraživanja majčinskog ponašanja, proučavanje *in utero* embrionalnog razvoja. Osim toga, treba imati na umu da se embrij zebrike u prvih 72 h razvoja nalazi unutar opne koja predstavlja svojevrsnu barijeru ulasku toksikanata.

Također, u pojedinim tipovima istraživanja (poput apsorpcije, izlučivanja, i sl.) nije moguće precizno ekstrapolirati dobivene rezultate na sisavce. Unatoč tome, zebrica je trenutno jedan od najvažnijih i vodećih istraživačkih modela u biomedicinskim i toksikološkim istraživanjima diljem svijeta, što svakako potvrđuje eksponencijalan broj znanstvenih publikacija.

LITERATURA

1. Lawrence C (2007): The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269(1-4), 1-20.
2. MacRae CA, Peterson RT (2015): Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 721-731.
3. Lieschke GJ, Currie PD (2007): Animal models of human disease; zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353-367.
4. Kari G, Rodeck U, Dicker AP (2007): Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 82(1), 70-80.
5. Meeker ND, Trede NS (2008): Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology* 32(7), 745-757.
6. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(3), 253-310.
7. Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D (2013) A brief histology of zebrafish research - toward biomedicine. *Yi Chuan* 35(4), 410-420.
8. Howe K, Clark MD, Torrojy CF, ..., Gu Yong (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.
9. Pamanji R, Methu MS, Yashwanth B, Leelavathi S, Vankateswara RJ (2015): Developmental toxic effects of monocrotohos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research* 22(10), 7744-7753.
10. Haendel MA, Tilton F, Bailey GS, Tanguay RL (2004) Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicological Sciences* 81(2), 390-400.
11. Fleming A, Alderton WK (2013): Zebrafish in pharmaceutical industry research: finding the best fit. *Drug Discovery Today: Disease Models* 10(1), e40-e50.
12. Kovrižných JA, Sotníková R, Zeljenková D, Rollerová E, Szabová E, Wimmerová S (2013): Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) teste din adulthood and in early life stages - comparative study. *Interdisciplinary Toxicology* 6(2), 67-73.
13. Santos D, Matos M, Coimbra AM (2014): Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicology and Teratology* 46, 18-25.
14. Akande MG, Norrgren L, Stefan O (2010): Effects of sewage effluents on some reproductive parameters in adult zebra fish (*Danio rerio*). *Biology and Medicine* 2(4), 12-16.
15. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Union*, L 276/33
16. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish embryo acute toxicity (FET) test. Adopted 26 July 2013.

Predstavljamo

DROSOPHILA MELANOGASTER: MALI ORGANIZAM U BIHEVIORALNOJ GENETICI KOMPLEKSNIH PONAŠANJA

Rozi Andretić Waldowski

UVOD

Jedna od velikih znanstvenih misterija je kako živčani sustav generira ponašanje. Čak i naizgled jednostavna ponašanja imaju vrlo složenu regulaciju koja odražava interakciju između okolišnih i genetskih faktora. Ako se ispituje isključivo genetski doprinos regulaciji ponašanja, onda put od gena do ponašanja ima nekoliko nivoa koje je potrebno istražiti ne bi li se razumio genetski doprinos. Ponašanja imaju složenu genetsku regulaciju gdje mnoštvo gena u interakciji utječe na provedbu ponašanja.

Prvi korak u razumijevanju ponašanja je identifikacija gena, a na laboratorijskom modelnom organizmu, *Drosophila melanogaster*, najefikasniji način je genetski probir. Nakon što je gen identificiran potrebno je razumjeti njegovu funkciju i regulaciju.

Sljedeći nivo istraživanja su stanična biologija proteina za kojeg gen kodira, njegova regulacija i istraživanje signalnih puteva u kojima sudjeluje. Potom slijede elektrofiziološka istraživanja neurona u kojima je gen eksprimiran te utvrđivanje promjena u funkcioniranju neurona koje razne varijante (alele ili mutacije) gena mogu izazvati. Slijedi istraživanje neuronskih mreža, komunikacija i povezanost s ostalim dijelovima mozga te se ispituju kako procesuiranje informacija dovodi do plastičnih promjena.

Potpuno razumijevanje ponašanja neće biti moguće prije nego li se istraže svi nivoi na koje pojedini gen utječe, pri čemu treba uzeti u obzir da su ponašanja pod utjecajem više od jednog gena, te da je genska ekspresija pod utjecajem okolišnih utjecaja. Primjer složenosti regulacije ponašanja je modelni organizam *C. elegans*, gdje unatoč tome što je mapiran konektom svih 302 neurona koje *C. elegans* posjeduje, još uvijek nije točno poznato kako se pojedino ponašanje generira.

Radi niza karakteristika *Drosophila* predstavlja izvanredan modelni organizam u kojem je moguće istraživati složena ponašanja generirana s relativno malim brojem neurona (između 100 i 200 tisuća) pri čemu se mogu istraživati svi prethodni navedeni nivoi regulacije ponašanja.

Radi kratkog generacijskog vremena, malog broja kromosoma i genoma, te velikih salivarnih žljezda *Drosophila* je bila identificirana kao dobar modelni organizam još na početku 20. stoljeća.

Zahvaljujući tim karakteristikama istraživanja na *Drosophili* značajno su doprinijela razumijevanju osnovnih genetskih principa, te nasljeđivanja. Tako je za otkriće uloge kromosoma u nasljeđivanju T. H. Morgan dobio Nobelovu nagradu 1933. godine, a 1946. godine H. J. Muller za istraživanje utjecaja mutacija izazvanih X zračenjem.

Od druge polovice 20.stoljeća radi napretka genetskih tehnika rada s *Drosophilom* postignut je naročiti napredak u području razvojne genetike i genetike ponašanja, te su dodijeljene Nobelove nagrade za istraživanja genetske kontrole ranog embrionalnog razvoja 1995.godine, a 2011.godine za istraživanja aktivacije uređenog imuniteta.

POVIJEST

Prednosti *Drosophila* kao modelnog organizma prvi je uočio T. H. Morgan koji je u svom laboratoriju na Cornell University od 1904.-1927.godine koristio *Drosophilu* ne bi li utvrdio na koji način su u embriju pohranjene informacije potrebne za razvoj odrasle jedinke.

Smatrao je da se put do odgovora nalazi u istraživanju nasljeđivanja. Na njegov rad na kromosomskoj teoriji nasljeđivanja značajno je utjecao trenutak kada je među populacijom *wild type* (wt) mušica s crvenim očima prvi put uočena spontana mutacija koja je rezultirala mužjakom s bijelim očima. Naknadni rad na praćenju tog fenotipa tijekom križanja, te naknadna

identifikacija novih mutanata dovela je do formuliranja osnovnih principa nasljeđivanja.

Osim znanstvenih zasluga Morganu se pripisuje i ostavština demokratskog upravljanja laboratorijem, koji je i danas u velikoj mjeri prisutan u istraživačkim laboratorijima u SAD-u koji rade na *Drosophili*.



Thomas Hunt Morgan

Morganovi najpoznatiji suradnici iz ranog perioda bili su Calvin Bridges i Alfred Sturtevant. Bridges je skicirao i numerirao prstenove na politenim kromosomima, a njihova numeracija koristi se i danas. Politeni kromosomi se nalaze u žlijezdama slinovnicama u stadiju ličinke, te radi toga što se DNA replikacija odvija bez stanične diobe, kromosomi su veliki i zadebljani, te su vidljivi pod svjetlosnim mikroskopom.

Alfred Sturtevant je u Morganovom laboratoriju još kao dodiplomac napravio prvu kromosomsку mapu, nakon što je uvidio da se učestalost

rekombinacije može koristiti da bi se poredali geni uzduž kromosoma, obzirom da rekombinacija vidljiva u nasljeđivanju fenotipa korelira s promjenama slijeda prstenova na politenom kromosomu.

OSNOVNE KARAKTERISTIKE *DROSOPHILE*

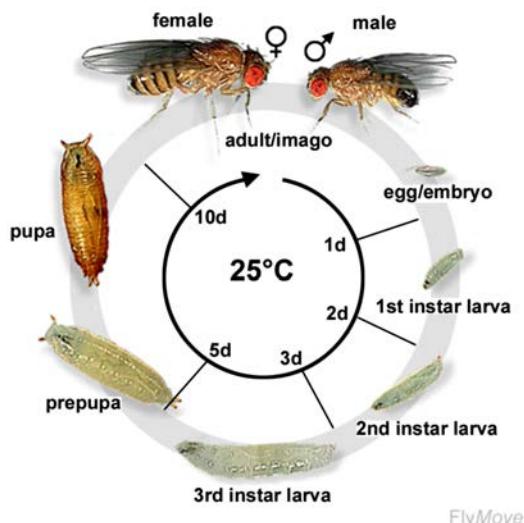
Drosophila, iako naizgled vrlo različita od ljudi, posjeduje značajne sličnosti. *Drosophile* su diploidne i imaju spolno dimorfne gamete. Bazični principi funkciranja neurona također su vrlo slični s onima kod sisavaca. Živčani sustav *Drosophile* ima oko 200, 000 neurona od kojih je većina smještena u glavi (centralni mozak, očne polutke i subezofagalni ganglion), te torakalni ganglion koji se nalazi u torakalnom dijelu (*Drosophila* se sastoji od 3 segmenta: glava, torakalni i abdominalni segment). Centralni mozak sastoji se od površinskog neuropila (aksoni, dendriti i glia) organiziranog u funkcionalna područja, koja sudjeluju u regulaciji ponašanja kao i analogne strukture kod sisavaca.

Od kraja 20. st. *Drosophila* se sve više koristi kao modelni organizam za izučavanje ljudskih poremećaja, jer je translacija rezultata s *Drosophile* na sisavce moguća radi značajne genske homologije, te činjenice da *Drosophila* posjeduje oko 75% gena koji su povezani s razvojem bolesti kod ljudi. No još je Morgan koristio *Drosophilu* zato što je laka za održavanje i baratanje.

Drosophila melanogaster na latinskom znači tamnog trbuha koja voli vlagu (sklona je isušivanju pa je stoga najviše aktivna u doba dana s povećanom vlagom u zraku: zora i sumrak). Uzgoj se vrši na hrani koja je lako priprema od: šećera, kvasca, brašna i agara. Mušice se čuvaju u bočicama u koje može stati nekoliko desetina do stotina jedinki, koje se svakog tjedna moraju prebaciti na svježu hranu.

Razvrstavanje *Drosophile* vrši se pod mikroskopom na poroznoj podlozi koja ispušta nisku količinu ugljičnog dioksida čime su mušice anestezirane. Oporavak nakon takvog postupka je u roku od nekoliko minuta. Generacijsko vrijeme od jaja koje ženka izliježe do odrasle jedinke ovisi o temperaturi, te na 25°C iznosi 10 dana. Tijekom života ženka izliježe oko 500 jaja, a razvoj do odrasle mušice karakteriziraju 3 glavna razvojna stadija: jaja, ličinka koja se začahuje, iz koje nakon metamorfoze izlazi odrasla jedinka.

Genetika *Drosophile* ima nekoliko osobitosti koje su zasluzne što je odličan modelni organizam. To su politeni kromosomi koji su već vrlo rano omogućili praćenje rekombinacije i kreiranje fizikalne i genetske mape kromosoma, balancer kromosomi koji su omogućili čuvanje letalnih mutacija u populaciji, te činjenice da kod mužjaka nema rekombinacije što olakšava praćenje mutacija tijekom križanja.



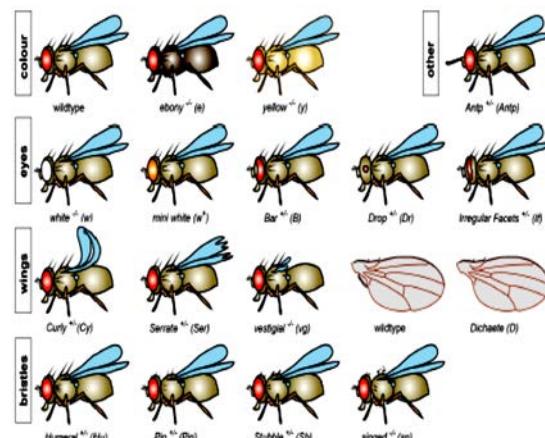
Razvojni stadiji *Drosophile*

Osim toga *Drosophila* ima mnoštvo marker mutacija; lako uočljivih morfoloških mutacija u boji očiju, obliku krila ili boji ekzoskeleta. U kombinaciji s balancer kromosomom one znatno olakšavaju praćenje mutacija tijekom križanja. Balancer kromosomi sprječavaju rekombinaciju jer posjeduju mnoštvo velikih kromosomskih promjena (inverzija, translokacija) tako da za vrijeme mejoze kada se homologni kromosomi poravnaju, *crossing-over* nije moguć radi različite genetske sekvene.

Bez balanca, u populaciji mušica koja nosi letalnu mutaciju kao heterozigot, mutacija bi se vremenom izgubila, jer bi homozigoti uginuli, a preživjela bi mješavina heterozigota i wt mušica. U kombinaciji s balancerom sve mušice u populaciji su istog genotipa; heterozigoti s jednim balancerom i drugim kromosomom s letalnom mutacijom.

U drugoj polovici 20.st. velika ekspanzija u biološkim istraživanjima na *Drosophili* uslijedila je radi daljnog napretka u genetici. Nakon sekvenciranja genoma uočeno je da je genom *Drosophile* visoko homologan s onim kod sisavaca, ali posjeduje nisku redundanciju (uglavnom jednu kopiju pojedinog gena, za razliku od sisavaca koji imaju po nekoliko kopija). Unaprijedene su tehnike *Forward genetics* pristupa, kao što je genetski probir za nepristrano identificiranje novih gena koji sudjeluju u određenom procesu, kao i metode *Reverse genetics*, koje omogućuju gensku manipulaciju.

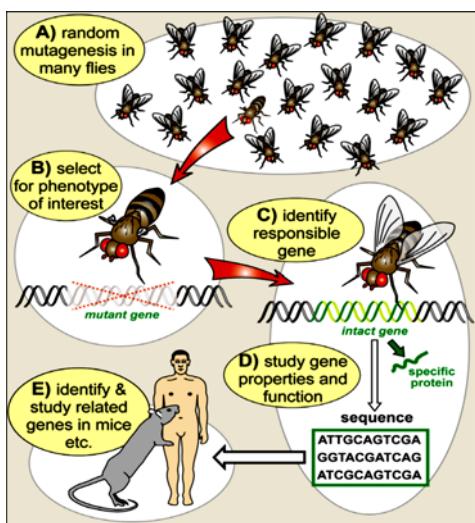
Osim toga, tkiva *Drosophile* su relativno jednostavna, laka za vizualiziranje i nema etičkih ograničenja u radu. Jedno od Morganovih nasljeđa koje je prisutno i danas je da je društvo ljudi koje radi na *Drosophili* otvoreno, slobodno razmjenjuje materijale i informacije, a stoljeće rada rezultiralo je sofisticiranim genetskim tehnikama koje su prisutne u svakodnevnoj praksi.



Marker mutacije

GENETSKE METODE RADA NA DROSOPHILI

Spoznaje o genetskoj podlozi raznih procesa i patoloških stanja su u velikoj mjeri proizašle radi korištenje *Forward genetics* pristupa, koji je na *Drosophili* relativno lako primjenjiv. *Forward genetics* omogućava identifikaciju gena koji regulira određeni proces na način da se iz populacije mušica koje nose nasumične mutacije po cijelom genomu identificiraju jedinke s promijenjenim fenotipom. Pretpostavka je da je promjena fenotipa nastala radi mutirane kopije gena koji taj proces regulira, nakon čega slijedi istraživanje mehanizama djelovanja gena.



Forward genetics pristup

Jedan oblik *Forward genetics* pristupa je Modifier screen koji se koristi da bi se identificirali novi geni koji sudjeluju u određenom signalnom putu. U tom slučaju mutageneza se provodi na genetskoj podlozi poznate mutacije s ciljem identifikacije jedinki kod kojih će fenotip biti znatno bolji ili gori od

polazišne mutacije (promjena fenotipa može se desiti jedino ako nova mutacija sudjeluje u istom signalnom putu).

Jedan od vrlo bitnih preduvjeta za provođenje genetskog probira u području behavioralne genetike je dobro definirani fenotip. Npr. ako želimo identificirati novi gen koji regulira učenje i pamćenje mora se dizajnirati test koji će mjeriti specifičan oblik učenja, kao što je olfaktorno učenje uvjetovanjem putem nagrade.

Geni identificirali ovim testom neće neminovno biti identični onima koji su identificirani testom koji mjeri vizualno operantno učenje, jer su to različiti oblici učenja koji su slični samo u nekim komponentama.

Idealni test za provedbu genetskog probira mora biti: objektivan kako ne bi bio pod biasom eksperimentatora, mora reproducibilno mjeriti fenotip koji je definiran, treba biti kvantitativan tako da se odstupanja uslijed mutacije mogu statistički jednostavno identificirati, te treba biti primjenjiv na velikom broju jedinki u relativno kratkom vremenu jer je to preduvjet za provedbu genetskog probira.

Jedna od velikih prednosti *Drosophile* u biološkim istraživanjima je da napredak tehnika koje se koriste za provedbu *Forward* i *Reverse Genetic* pristupa omogućuju da se posljedica mutacije proučava na nekoliko nivoa od genetskog, staničnog, sistemskog do ponašanja.

Također je moguće proučavanje uzročno-posljedičnih veza, npr. u *Rescue* eksperimentima gdje se ubacivanjem normalne kopije gena u mušicu koja nosi mutiranu verziju istog gena, pokazuje da li je gen dovoljan ili neophodan za određeni proces.

Transgenetske metode omogućavaju izučavanje genetskih interakcija kao u slučaju kada jedna mušica nosi dva genetska konstrukta. Većina *Forward* i *Reverse* tehnika bazirana je na upotrebi P-elemenata. Interesantno je da su P-elementi u populaciju *Drosophila* u prirodi ušli nakon što su izolirani wt sojevi koji se danas koriste u laboratorijima (najpopularniji od kojih su *OregonR* i *CantonS*).

Radi toga križanje laboratorijskih mušica s onima iz prirode izaziva fenomen *Hybrid Dysgenesis* (stabilno integriran P-element se inducira na transpoziciju i tako izaziva mutacije) što rezultira sterilnim jedinkama ili smrću. P-elementi koji se danas koriste u *Drosophili* su modificirani transpozicijski elementi koji sadržavaju GenOfInteresa (GOI), te razne markere. P-element se može stabilno integrirati i koristiti u eksperimentima *Reverse genetics* pristupa kada se ispituje posljedica unosa normalne ili modificirane kopije gena na fenotip.

P-elemente moguće je mobilizirati za izazivanje novih nasumičnih mutacija koje nastaju kada se P-element integrira u novo mjesto u genomu i na taj način onemogući pravilnu gensku ekspresiju, te je to jedan od oblika mutogeneze u genetskom probiru koji olakšava

kloniranje gena. Transgenetske mušice s P-elementima generiraju se relativno jednostavno, no za to danas postoje specijalizirani servisi.

Postoji mnogo načina za kontroliranje anatomske i temporalne kontrole GOI kojeg P-element nosi. Jedan od najstarijih načina je da GOI bude pod kontrolom *Heat Shock* promotera, čime je omogućena temporalna kontrola, ali danas najčešće korištena metoda je UAS/GAL4 ekspresijski sistem. UAS/GAL4 je heterologni sistem koji koristi GAL4 transkripcijski faktor iz kvasca, koji u *Drosophili* nije prisutan i nema DNA sekvene za vezivanje.

Za postizanje precizne anatomske ekspresije gena potrebna su dva transgenetska soja mušica; prvi nosi P-element u kojem je GAL4 eksprimiran pod kontrolom promotora od interesa (npr. tirozin hidroksilaze (TH), enzima za sintezu dopamina). U takvoj mušici GAL4 je eksprimiran u TH-pozitivnim neuronima, ali nema funkciju, jer nema mesta za vezivanje.

Drugi soj transgenetskih mušica nosi konstrukt gdje je GOI eksprimiran pod kontrolom UAS promotora na kojeg se GAL4 vezuje. Kako u toj mušici nema GAL4, onda gen nije eksprimiran. Parenjem ta dva soja mušica generiraju se potomci kod kojih će GOI biti eksprimiran u TH neuronima.

GOI su vrlo raznoliki, no moguće ih je grupirati obzirom na funkciju. Jedna grupa GOI su geni koji moduliraju električnu podražljivost neurona čime je moguće generirati mušice koje imaju

povećanu ili smanjenu aktivnost određenih neurona, te se tako može odrediti njihova uloga u regulaciji ponašanja. Vrlo su popularne modifikacije UAS/GAL4 sistema koji omogućavaju uz anatomsку i temporalnu kontrolu ekspresije.

Na taj način mogu se izbjegći negativni razvojni utjecaji koje ekspresija GOI može imati ili se GOI može eksprimirati samo tijekom kratkom vremenskog perioda, npr. tijekom procesa učenja, ali ne tijekom konsolidacije ili testiranja.

Temporalna kontrola postiže se modifikacijom GAL4 vezivanja, pa tako postoji verzija u kojoj mušice nose dodatni temperaturno osjetljivi GAL80ts inhibitor GAL4 aktivnosti. To omogućava da pri sobnoj temperaturi GAL80 bude vezan na UAS promotor i time sprječi aktivaciju GOI, dok premeštanjem mušica na 30°C GAL80 se inaktivira i GAL4 može aktivirati GOI.

Drugi način temporalne kontrole je modifikacija GOI. Tako je neuronsku aktivnost moguće kontrolirati ekspresijom gena *Shibire^{ts}* koji pri povišenoj temperaturi inaktivira neuronsku aktivnost ili *TrpA1* kationskog kanala koji pri povišenoj temperaturi povećava neuronsku aktivnost.

Za vizualizaciju aktivnosti neurona i posljedice na fenotip koriste se razni optogenetski konstrukti gdje je aktivnost neurona modulirana izlaganjem mušica svjetlu određene valne dužine čime se postiže vrlo dobra

i brza temporalna rezolucija koja se učestalo kombinira s elekto-fiziološkim snimanjima aktivnosti neurona ili mjerjenjem promjena u ponašanju.

DROSOPHILA I BIHEVIORALNA GENETIKA

Znanstveno područje genetike ponašanja revolucionizirano je 1971. godine kada je po prvi put neupitno pokazano da ponašanje ima genetsku osnovu, što do tada mnogi znanstvenici nisu prihvaćali kao moguće.

Znanstvenici Seymour Benzer i Ronald Konopka izložili su mušice kemijskom mutagenu etilmetsulfonatu i testirali njihove potomke u testu koji je mjerio izlazak iz čahure nakon metamorfoze (eklozija). Vrhunac eklozije je u jutarnjim satima i ponavlja se ciklički svaki dan, te tako odražava jedan oblik cirkadijalne regulacije. Ritmična eklozija se nastavlja s periodom od približno 24 sata u uvjetima konstantnog mraka što pokazuje njenu endogenu regulaciju.

Benzer i Konopka bili su sretne ruke i identificirali 3 mutanta koji su pokazali: gubitak perioda, skraćeni i produženi period. Naknadno je pokazano da su izolirali 3 alela (nul mutaciju, hipomorfa i hipermorfa) istoga gena nazvanog period (geni *Drosophila* nazivaju se na osnovu fenotipa).

U narednim godinama je dizajniran test za praćenje cirkadijalne lokomotorne aktivnosti mušica, koji u mnogočemu epitomizira idealni test za mjerjenje ponašanja i provedbu genetskog

probira u kojem su per mutanti pokazali analognu promjenu cirkadijalnog perioda.

Aktivnost se mjeri u *Drosophila Activity Monitoring Sistem-u* (DAMS). Zasniva se na mjerenu učestalosti prelaska sredine staklene tubice u 30 minutnim epizodama tijekom 24 sata u situacijama 12 sati svjetla: 12 sati mraka, ili u konstantnom mraku ili svjetlu. Tubica sadrži 1 mušicu i hranu, a jedan monitor sadrži 32 tubice. Podaci se pohranjuju na računalo i naknadnim statističkim analizama dobiju se razni indikatori aktivnosti.

Taj test uspješno je korišten u velikom broju genetskih probira i identifikaciji gena koji reguliraju molekularni sat transkripcije i translacije odgovoran za cirkadijalnu varijaciju niza fizioloških indikatora i ponašanja.

Radi genske homologije utvrđeno je da molekularni cirkadijalni sat kod sisavaca funkcioniра na sličan način kao i kod *Drosophile*, te da se sastoji od homolognih gena. Najnovije studije funkcije cirkadijalnih gena usmjerenе su na ispitivanje bolesti koje su povezane s poremećajima ciklijalne ritmičnosti, odnosno promjenama u sekvenci cirkadijalnih gena.

Modifikacija DAMS testa koristi se za ispitivanja spavanja, ali se podaci o aktivnost pohranjuju u petminutnim epizodama, gdje se odsustvo aktivnosti smatra spavanjem. Iz drugih istraživanja se zna da je inaktivnost od 5 min. povezana s povećanim pragom podražljivosti, što je jedan od

bihevioralnih kriterija za spavanje kod sisavaca. Provedbom genetskih probira za fenotip spavanja potvrđena je važnost niza gena koji su prethodno bili povezani s regulacijom spavanja kod sisavaca i otkriveni su novi homologni geni koji reguliraju spavanje.

Jedno od ponašanja koje se na *Drosophili* ispituje već dugi niz godina je udvaranje i kopulacija. Iako to ponašanje nije direktno relevantno za ljudsko ponašanje spoznaje koje se dobiju vrlo su bitne za definiranje mehanizama plastičnosti živčanog sustava i za definiranje bazičnih principa kodiranja ponašanja u neuronskim mrežama.

Prvi testovi za ispitivanje učenja i pamćenja su stari skoro pola stoljeća, a najčešće se koriste testovi olfaktornog uvjetovanja kaznom ili nagradom. Sastoje se od treninga kada se uvjetuje neutralni miris sa kaznom (obično električni šok), a drugi neutralni miris bez kazne.

Nakon treninga mušicama se daje izbor oba mirisa i izračuna postotak mušica koje preferiraju miris koji nije bio uvjetovan kaznom. Korištenjem raznih testova učenja i pamćenja otkriveni su geni i definirani signalni putovi i područja mozga važni u procesu konsolidacije pamćenja.

Posljednjih 15-tak godina dizajnirani su testovi koji mjere ponašanja do tada nepovezana s *Drosophilom*, no pokazalo se da ih je kod *Drosophile* moguće izazvati i mjeriti, te provesti genetsku

analizu koja generira podatke relevantne za istraživanja u sisavaca.

To su: agresivno ponašanje, spavanje, ovisnost o alkoholu i psihostimulansima, te ispitivanja neurodegenerativnih bolesti. Neuro-degeneracija se inducira transgenetskim modifikacijama koje dovode do simptoma sličnih onima kod ljudi (poremećaji motoričkih sposobnosti ili učenja i pamćenja) i nisu povezani za jedan specifičan test.

Ovisnost je vrlo kompleksno ponašanje koje se sastoji od niza elemenata, a kod *Drosophila* se ispituju relativno jednostavne fiziološke promijene koje je u modelnim organizmima moguće objektivno mjeriti, a koje su povezane s razvojem ovisnosti.

Tako se nakon administracije kokaina može mjeriti osjetljivost, mjeranjem promjena u ponašanju, ili sensitizacija, mjeranjem povećanog bihevioralnog odgovora na istu dozu kokaina.

Nakon administracije alkoholnih para mjeri se: osjetljivost, tolerancija, sklonost konzumaciji i nagrađujući utjecaj.

Administracija kokaina se u početnim istraživanjima provodila izlaganjem kokainskom dimu, što je dovelo do otkrića nekoliko gena bitnih za razvoj bihevioralne sensitizacije, a čija je univerzalnost u regulaciji odgovora na razne vrste droga kasnije potvrđena u sisavaca.

Da bi se omogućila provedba genetskog probira za identifikaciju novih gena koji reguliraju odgovor na kokain, HRZZ financira istraživački projekt s ciljem dizajna novog visokoprotičnog testa za mjerjenje bihevioralne senzitizacije na psihostimulanse.

Drosophila melanogaster je modelni organizam bez premca, prvenstveno radi velikog izbora genetskih tehnika, no u posljednje vrijeme definiraju se nove metode (elektrofiziologija) koje su primjenjive na *Drosophili*, čime će biti moguće odgovoriti na pitanja koja se do nedavno bila povezana isključivo s ljudskim funkcioniranjem, kao što su istraživanja biološke osnovi svijesti.

LITERATURA

1. Roote j. and Prokop A., 2013., G3:GenesGenomesGenetics, 3(2): 353-358.
2. Cahir J. O., 2011, Curr Top Behav Neurosci.;7:37-60
3. Genetics, 4th ed., 2011., Hartwell, L.H. et al., *Drosophila melanogaster: genetic portrait of fruit fly*, URL:http://highered.mheducation.com/sites/007352526x/student_view0/genetic_portrait_chapters_a-e.html
4. Cold Spring Laboratory DNA Learning Center, What are model systems?, ID1433, URL: <https://www.dnalc.org/view/1433-What-are-Model-Systems-1-.html>
5. Jove Journal, URL: <https://www.jove.com/>, keywords: *Drosophila behavior*

Jeste li znali?

KRATKA POVIJEST UPOTREBE MIŠEVA KAO LABORATORIJSKIH ŽIVOTINJA

Maja Lang Balija

17. stoljeće

WILLIAM HARVY

Poznati engleski liječnik prvi je otkrio i opisao kako funkcionira krvožilni sustav u svojoj knjizi „Anatomska rasprava o pomicanju srca i krvi životinja“. U svojim embriološkim studijama iznosi tezu da sve životinje nastaju iz jajeta („omne vivum ex ovo“) koju elaborira u djelu „Rasprava o rađanju životinja“. U svojim eksperimentima koristio je životinje.

ROBERT HOOK

Ovaj britanski fizičar, matematičar i izumitelj otkrio je razliku između venske i arterijske krvi, a prvi je upotrijebio mikroskop i proučavao stanice pluta („cellule“). Za svoja istraživanja bioloških posljedica povećanja tlaka zraka koristi životinje (najčešće miševe).

18. stoljeće

JOSEPH PRIESTLY i ANTONIE LAVOISIER

Dvojca britanskih kemičara koji su proučavali plinove. Kisik kao plin otkrivaju pokusom držanja miševa ispod staklenog zvona.

19. stoljeće

GREGOR MENDEL

Prvi zapisi eksperimentiranja na miševima potekli su od najpoznatijeg austrijskog svećenika i znanstvenika koji je u svojim ranim istraživanjima proučavao mehanizam nasljeđivanja prema boji dlake. No međutim, njegovi nadređeni pobunili su se protiv uzgoja „tih smrdljivih bića koja se samo pare i rađaju“. Od tada Mendel prelazi na uzgoj graha i 35 godina nitko ne obraća pažnju na te njegove rane pokuse.

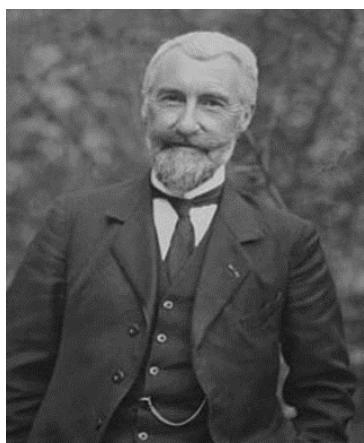


Gregor Mendel (1822-1884)

20. stoljeće

LUCIEN CUÉNOT

Francuski biolog koji 1902. godine potvrđuje Mendelovu teoriju nasljeđivanja boje krvna miševa koja je identična biljnoj teoriji nasljeđivanja. Od tada počinje razvoj genetike i genetskog istraživanja.



Lucien Claude Marie Julien Cuénot (1866–1951)

ABBIE LATHROP

Nosi nadimak „Mouse Woman of Granby“ jer je prva uspostavila uzgoj tzv. „fancy“ miševa i štakora za potrebe hobista koji drže glodavce i egzotične životinje kao kućne ljubimce. Godine 1918. otkrila je u svom uzgoju miševe koji su bolovali od raka. Za njih se zainteresirao laboratorij za istraživanje raka u St. Luisu, nakon čega je Abbie Lathrop razvila soj miševa koji se i danas koristi u te svrhe. Time je zapravo prva započela sa uzgojem srođenih (*inbred*) sojeva glodavaca. Osim uzgojem glodavaca bavila se i

uzgojem kunića i zamorčića za istraživačke svrhe.



Abbie E. C. Lathrop (1868 – 1918)

CLARENCE COOK LITTLE

Američki genetičar, istraživač raka (nastalih od duhanskih proizvoda) radeći na miševima potvrdio je Mendelovu teoriju nasljeđivanja i uspostavio temelje transplantacijske imunologije.

C.C. Little razvija i prvi soj miševa DBA na Harvardu. Osnivač je „Jackson Laboratory“ instituta za istraživanje raka koji je do 1950. godine već imao razvijenih 60 sojeva miševa.



Clarence Cook Little (1888–1971)

Druga polovica 20. stoljeća donijela je procvat uzgoja srođenih malih glodavaca, posebice miševa i štakora, kao i veliki porast broja korištenih životinja.

Smatra se da je u svijetu 1960. godine korišteno oko 30 milijuna kralježnjaka, dok je 1970. godine taj broj narastao između 100 i 200 milijuna. Broj korištenih životinja se kroz sedamdesete stabilizirao i u 80-tim je počeo opadati.

21. stoljeće

Danas se primjenjuje preko 7000 genetički definiranih srođenih sojeva miševa.

Razvoj molekularne biologije i molekularne genetike otvorio je vrata i genetskom inženjerstvu, u kojem se najčešće koriste miševi. Transgenične životinje s ciljanim, umjetno načinjenim modifikacijama određenih gena postale su jednim od glavnih modela u suvremenim biomedicinskim istraživanjima, čime se bitno promijenila slika o uporabi životinja u pokusima.

Prema procjeni britanskog udruženja za aboliciju vivisekcije (BUAV) i danas se godišnje obavlјaju pokusi na oko 100 milijuna kralježnjaka, od toga 10-11 milijuna u Europi. Od tog broja oko 90% otpada na laboratorijske štakore i miševe.

Najave i zanimljivosti

FELASA kongres: 13-16. 06. 2016,
Brisel, Belgija
<http://felasa2016.eu/>

EURL - ECVAM (highlights, events)
<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

FELASA novosti
<http://www.felasa.eu/>

Bioconferencelive
<http://www.bioconferencelive.com/>

tečajevi Fondazione Guido Bernardini
<http://www.fondazioneguidobernar dini.org/en/home.aspx>

tečajevi Universitiet Utrecht
http://www.uu.nl/faculty/veterinary_medicine/en/structure/Departments/dass/education/excurren/pdkart9en/Pages/default.aspx

tečajevi Charles River
<http://www.criver.com/customer-service/education-training/educations>

tečajevi - European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Italija
<http://www.embl.it/training/events/2015/LAS15-01/>