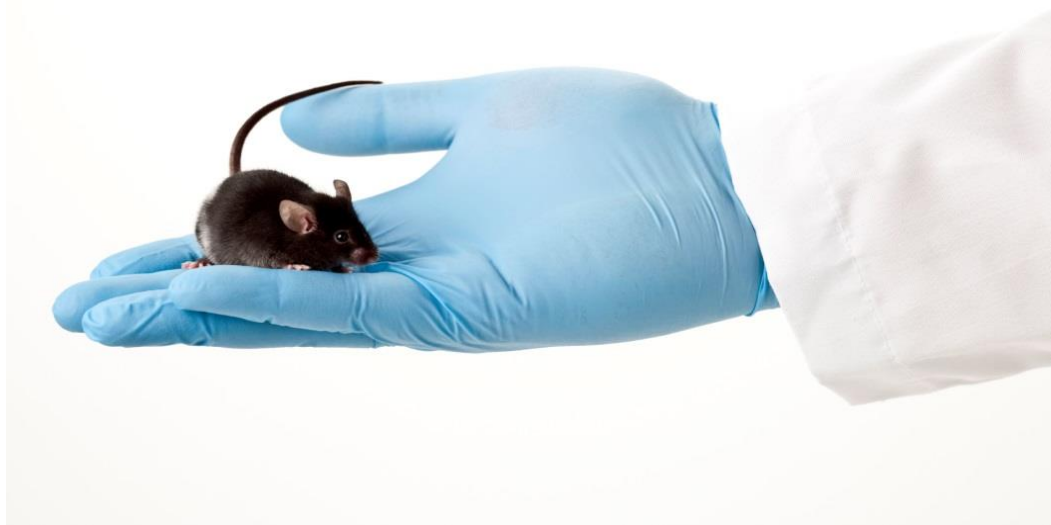


BILTEN

Službeno
glasilo

2016

Hrvatsko
društvo za
znanost o
laboratorijskim
životinjama



BILTEN

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

Članovi uredništva:

Sofia Ana Blažević
Julija Erhardt
Maja Lang Balija
Dubravka Švob Štrac

U ovom broju priloge pripremili:

Sofia Ana Blažević
Julija Erhardt
Igor Erjavec
Vladimir Farkaš
Maja Lang Balija
Dubravka Švob Štrac

Bilten izlazi jednom godišnje.

Zagreb, 2016. godina.

Tema broja

ALTERNATIVA RADU S POKUSNIM ŽIVOTINJAMA

Julija Erhardt

Alternativa radu sa pokusnim životinjama temelji se na principu 3R (engl. replace, reduce, refine) Russella i Burcha (1959) (1). „Replace“ princip u radu s pokusnim životinjama odnosi se na zamjenu korištenih životinja sa *in vitro* ili *in silico* modelom ili filogenetski nižom vrstom, a da se pri tom postigne isti znanstveni cilj. Iako bi idealna alternativna metoda popuno zamjenjivala («replace») pokusne životinje, metode koje mogu smanjiti broj korištenih životinja («reduce») i/ili smanjiti njihovu potencijalnu bol, patnju ili tjeskobu i poboljšati njihovu dobrobit («refine»), također se smatraju alternativnim metodama.

3R načelo je već desetljećima u temeljima rada s pokusnim životinjama i ugrađeno je kako u pravila i metodologiju rada sa životinjama, tako i u zakonodavstvo.

Hrvatski Zakon o zaštiti životinja nalaže da se pokusi na životinjama moraju obavljati u skladu sa 3R načelom, te nisu dopušteni ... „ako se u Europskoj uniji priznaje druga metoda ili pokusna strategija za postizanje željenog rezultata koja ne uključuje korištenje živih životinja“ (2).

Moralna i zakonska dužnost svakog istraživača je da ustanovi da li postoji metoda, ili možda više njih, koje bi mogle zamijeniti određeni *in vivo* eksperimentalni sustav. Razlozi za zamjenu životinja su brojni. Moralno je neprihvatljivo koristiti životinje, koje su sposobne osjećati bol, patnju i stres, ukoliko je to moguće izbjeći. Tu je i problem ekstrapolacije rezultata sa životinja na čovjeka, koji je u ne malom broju slučajeva rezultirao sa pogubnim posljedicama na zdravlje ljudi (3).

Osim navedenog, cijena održavanja životinjskih nastambi i eksperimentiranja na životinjama je vrlo visoka. Eksperimenti na životinjama najčešće traju dugo i teško se standardiziraju. Zamjenski modeli su najčešće puno jeftiniji, brži i pouzdaniji, jer se izbjegava varijabilnost koju živi organizam neizbježno nosi sa sobom. S druge strane alternativnim metodama često manjka kompleksnost intrinzična živom sustavu.

Područje razvoja novih metoda i modela koji će zamijeniti i smanjiti korištenje životinja je u zadnja 2 desetljeća doživjelo procvat. Razvoj zamjenskih metoda je propulzivno područje, te je veliki broj projekata, organizacija, web portala, časopisa koji se bave njihovim razvojem.

Unutar znanstvene zajednice jača svijest o važnosti izbjegavanja korištenja životinja kada to nije neophodno. EU je osnovala središnji ured za validaciju alternativnih metoda (ECVAM), a osnovani su i brojni centri za alternative i izvan Europske unije.

Svakim danom validiranih alternativnih metoda je sve više, a kompletna lista prihvaćenih alternativnih metoda i strategija testiranja može se naći na «AltTox» portalu (4).

Unatoč tome, znanstvenici i industrija često pribjegavaju uhodanim testovima na životinjama, koje su oduvijek koristili. Razlog je često inercija, dok u industriji zamjena ustaljenih metoda na životinjama novim alternativnim metodama zahtijeva dugotrajne i vrlo skupe postupke testiranja i validacije. Obzirom na zahtjeve zakonodavnih tijela stav institucija koje koriste životinje će se morati promijeniti.

Najčešće korištena alternativa *in vivo* eksperimentiranju na životinjama su *in vitro* tehnike rada na staničnim kulturama životinjskih i ljudskih stanica i/ili tkiva. Često je korištena u istraživanju, ispitivanju novih lijekova, supstanci i proizvoda, te u toksikološkim istraživanjima. Može nam pružiti odgovore na staničnom nivou, ali u većini slučajeva ne može, ili samo u ograničenoj mjeri može zamijeniti *in vivo* testiranja za utvrđivanje sigurnosti i djelotvornosti. Osim toga stanične kulture često zahtijevaju za uspješan rast proizvode dobivene od životinja, kao što su fetalni teleći serum.

Nadgradnja klasičnoj *in vitro* metodologiji su kompleksni *in vitro* sustavi poput mikrotekućinskih čipova koji sadrže uzorke tkiva iz različitih dijelova tijela povezanih mikrokanalima kroz koje teče zamjenska krv, te na taj način oponašaju puteve i

procesu u tijelu. Iako mogu pružiti daleko kompleksnije i potpunije informacije od tradicionalnih *in vitro* tehnika, tehnologija razvoja mikrotekućinskih čipova je ipak još u svojim začecima. Najsloženiji je «human-on-a-chip» projekt koji na čipu uključuje sve organe, te se najviše približava *in vivo* odgovoru kompleksnog sustava.

Zanimljiv pristup provjeri farmakokinetike supstanci u ljudskom tijelu je koncept «mikrodoziranja» (5). Volonterima se daju izuzetno male jednokratne doze lijeka/supstance, te se sofisticiranim tehnikama oslikavanja prati njihovo ponašanje u tijelu. Ova metoda može pružiti važne informacije o sigurnosti budućih lijekova i njihovoj farmakokinetici. Može zamijeniti određene testove na životinjama i pomaže izdvojiti spojeve koji neće biti prihvatljivi kao lijekovi na ljudima, te se time izbjegavaju opsežnije *in vivo* studije na životinjama.

Širok raspon tehnika biološkog oslikavanja koje se osim dijagnostike na ljudima koriste i u istraživanju na životinjama, uvelike smanjuju broj korištenih životinja, te spada u alternativni pristup eksperimentiranju.

Ista životinja može poslužiti kao svoja kontrola i biti praćena kroz cijelo vrijeme istraživanja, te se time osim bitnog smanjenja broja korištenih životinja, dobivaju puno vjerodostojniji rezultati od onih dobivenih tradicionalnim pristupom eksperimentiranju.

Još jedna od važnih alternativnih metoda su svakako i *in silico* računalne simulacije i modeli. Danas postoje sofisticirani računalni modeli koji simuliraju biologiju i napredovanje u razvoju bolesti (6). Modeli mogu predvidjeti načine na koji će novi lijek reagirati u ljudskom tijelu i djelomično zamijeniti korištenje životinja u istraživanjima i standardnim ispitivanjima supstanci. Sa rastućom kompjuterskom moći, repliciranje aspekata funkcije organa i organskih sustava biti će sve bolje.

Svejedno ne treba smetnuti s uma da modeli mogu biti samo toliko točni i pouzdani, koliko su i eksperimentalni podatci na osnovu kojih su napravljeni, te što je više pouzdanih eksperimentalnih podataka, to je i model bolji. Pa iako će velik broj eksperimenata na životinjama biti potreban da se kreira dobar model, jednom kada je to učinjeno, to u budućnosti može spasiti veliki broj životinja.

Korištenje filogenetski nižih životinjskih vrsta je često vrlo dobar alternativni pristup, te je npr. korištenje zebrice (*Danio rerio*) sve češće korišten jednostavan, jeftin i pouzdan model u mnogim, osobito toksikološkim studijama.

Alternative igraju veliku ulogu u edukaciji biomedicinskih i prirodoslovnih područja. Korištenje životinja često nije najbolje za savladavanje gradiva i postizanje željenih ciljeva i ishoda učenja. Tako se umjesto postupaka na životinjama

koriste modeli, kompjuterski programu, animacije, filmovi, itd.

Kako tehnologija vezana uz znanost napreduje, tako će i alternativne metode postajati sve vjerodostojnije i sve bolje će odražavati složene interakcije živih sustava. Međutim, malo je vjerojatno da bi mogle do te mjere simulirati složene živi sustavi cijelog organizma, da u potpunosti zamijene pokuse na životinjama. Studije na životinjama će i dalje biti potrebne, a aktivnim trudom cijele istraživačke zajednice te pripadajućih industrija bitno je broj korištenih životinja držati na apsolutno neophodnom minimumu.

LITERATURA:

1. W.M.S. Russell and R.L. Burch, The Principles of Humane Experimental Technique.
http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc. 10.12.2016.
2. Narodne novine: NN 37/13; Članak 24. (2)2
3. A. Akhtar, The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation. *Camb Q Healthc Ethics*. 2015 Oct; 24(4): 407-419.
4. AltTox, Non-animal methods for toxicity testing.
www.alttox.org. 10.12.2016.
5. T. Tewari and S. Mukherjee, Microdosing: Concept, application and relevance. *Perspect Clin Res* (2010) Apr-Jun; 1(12): 61-63.
6. B.D. Aguda, C.B. Marsh, M. Thacker and E.D. Crouser, An In Silico modeling approach to understand the dynamics of sarcoidosis. *Plos One*. 2011;6(5):e19544.

Aktivnosti Društva

RADIONICA CroLASA „PRETKLINIČKO BIOLOŠKO OSLIKAVANJE“ (BIOIMAGING)

Maja Lang Balija

I ove je godine Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA), u suradnji s Hrvatskim institutom za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Institutom Ruđer Bošković organiziralo dvodnevnu edukativnu radionicu pod naslovom „Pretkliničko biološko oslikavanje“. Radionica je održana 22. i 23. listopada 2016., a prvoga se dana održavala na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, a drugog dana na Institutu Ruđer Bošković.

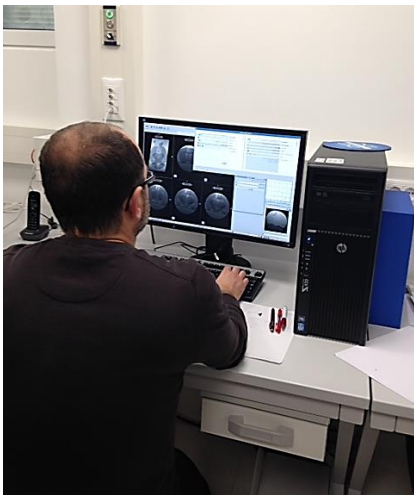
Ovogodišnja radionica o biološkom oslikavanju bila je nastavni slijed naše prethodne radionice „Primjena 3R pristupa u radu s laboratorijskim životinjama“ kojima se hrvatskim znanstvenicima žele približiti suvremene metode u biomedicinskim istraživanjima. Samo biološko oslikavanje po svojoj strukturi i metodologiji primjenjuje sva 3R načela u radu sa laboratorijskim životinjama – zamjenu, poboljšanje i smanjenje. Pretkliničko biološko oslikavanje ili *in vivo* pretklinička snimanja malih

životinja uključuju primjenu magnetske rezonancije (MRI, engl. magnetic resonance imaging), rendgenskih zraka (klasično rendgensko snimanje i micro CT, mikrokompjuterska tomografija), radioizotopa (PET, engl. positron emission tomography, i SPECT, engl. single-photon emission computed tomography), te optičkih snimanja, koja uključuju primjenu bioluminiscencije (BLI, engl. bioluminescence imaging), fluorescencije (FLI, engl. fluorescence imaging), te luminiscencije (CLI, engl. Cherenkov luminescence imaging).

S obzirom da trenutno u Hrvatskoj postoji pet uređaja za *in vivo* snimanja (tri su na Medicinskom fakultetu, Sveučilištu u Zagrebu - optičko, MRI i micro CT, jedan je na Institutu Ruđer Bošković - micro PET i jedan je na Sveučilištu u Rijeci Medicinskom fakultetu - optičko snimanje) takvu pristupačnost tehnici i znanju trebalo je iskoristiti kao edukacijsku nadogradnju svih onih koji u svom radu koriste životinja u znanstvene i edukacijske svrhe. Zbog toga je i sama radionica dobila preporuku Ministarstva Poljoprivrede (Ureda za dobrobit životinja), kao dio nadogradnje zakonom propisanog tečaja za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama. Radionica je obuhvatila teorijsku osnovu multimodalnog oslikavanja laboratorijskih životinja, nakon čega je polaznicima bila prikazana i praktična izvedba ovih metoda.

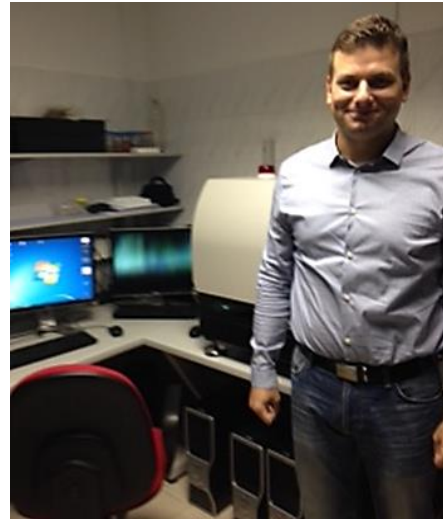
Prvoga dana radionice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga,

polaznici su se u nizu predavanja upoznali sa teorijskim osnovama, primjenom i mogućnostima snimanja s micro CT, MRI i bioluminiscencijom. Nakon toga, u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu polaznici su se mogli i praktično upoznati s načinom rada uređaja za snimanje laboratorijskih životinja magnetskom rezonancijom uređajem Bruker BioSpec 70/20 USR, te uređajem za pretkliničko optičko snimanje Perkin Elmer IVIS Spectrum. Optičkim snimanjem moguće je snimanje bioluminiscencije, fluorescencije i Čerenkove luminiscencije.



Slika 1. MRI i njegova primjena - dr.sc. Siniša Škokić

Plaznicima radionice također su bili pokazani način i mogućnosti primjene micro CT koji se primarno koristi za snimanje koštanog sustava životinja, ali se može i kombinirati i s drugim načinima snimanja pa čak i mekih tkiva. Teorijsku i praktičnu primjenu ovih uređaja prikazali su prof. dr. sc. Srećko Gajović, dr. sc. Igor Erjavec i dr. sc. Siniša Škokić.



Slika 2. SkyScan 1076 mikro CT - dr.sc. Igor Erjavec

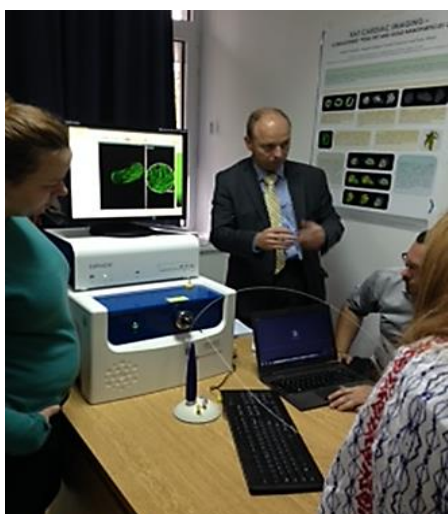
Drugog dana radionice na Institutu Ruđer Bošković održana su predavanja o terorijskoj osnovi i praktičnoj primjeni PET-a, o *in vivo* oslikavanju na staničnoj razini, te o fotoakustičnom i mikroultrazvučnom oslikavanju, a zatim su u Zavodu za eksperimentalnu fiziku Instituta Ruđer Bošković sudionici radionice upoznati s principima, primjenom i načinom rada na PET uređaju za male životinje (micro PET), Raytest ClearPET tj. u korištenju radioizotopa u *in vivo* oslikavanju. Teorijsku i praktičnu primjenu ovog uređaja prezentirali su Vladimir Farkaš, dr. vet. med., Robert Bagarić, dipl. ing. i prof. dr. sc. Alfred Švarc.

U praktičnom dijelu radionice sudionicima je prezentiran i program tvrtke Accela. Prikazan je rad konfokalnog endomikroskopa (CellVizio Dual Band), te njegove mogućnosti i praktična primjena. Teorijsku i praktičnu primjenu tog

uređaja prezentirali su gosp. Miroslav Vecheta, Igor Valerián i Milan Kopeček.



Slika 3. MicroPET – Vladimir Farkaš, dr.vet.med.



Slika 4. Konfokalni endomikroskop – gosp. Igor Valerián

Organizacijski odbor radionice činili su S.A. Blažević, J. Erhardt, I. Erjavec, V. Farkaš, S. Gajović, N. Jovanov Milošević, M. Lang Balija, B. Smolić, S. Škokić i D. Švob Štrac. Službeni jezici bili su hrvatski i engleski. Radionicu je uspješno završio 31 polaznik. Radionici

su prisustvovali i sudionici iz Slovenije i Srbije, tako da možemo reći da je imala i međunarodni karakter. Još jedan pokazatelj kvalitete radionice bile su i ocjene i pohvale polaznika u anonimnoj online anketi, kao i mnogobrojni vanjski upiti (Grčka, Njemačka) o mogućnosti ponavljanja ove radionice na engleskom jeziku. Hrvatska veterinarska komora doktorima veterinarske medicine vrednovala je stručno usavršavanje na ovoj radionici sa 4 boda. Povjerenstvo za medicinsku izobrazbu liječnika Hrvatske Liječničke komore kategoriziralo je i vrednovalo radionicu sa 18 bodova za aktivno sudjelovanje i 13 bodova za pasivno sudjelovanje. Organizatori se zahvaljuju svim predavačima i polaznicima radionice na aktivnoj suradnji tijekom radionice.

Umjesto zaključka citirati ćemo djelić predavanja prof. dr. sc. Srečka Gajovića: „U radu s pokusnim životinjama sve se više pažnje posvećuje etičkim postupcima u skladu s tzv. 3R načelom. Gotovo sva gore spomenuta načela objedinjuju metode biološkog oslikavanja laboratorijskih životinja ili tzv. bioimaging. Primjena ovih postupaka omogućuju da manji broj životinja sudjeluje u pokusu, snimanja se mogu napraviti u više vremenskih točaka, a analiza i interpretacija je lakša, jer iste životinje bivaju upotrijebljene tijekom cijelog pokusa. Rezultati testiranja su vjerodostojniji od rezultata u kojima isti parametar pratimo na više različitih grupa životinja koje moraju biti žrtvovane u različitim vremenima. Tako se neminovno pojavljuje uprosječeni rezultat grupe, a ne jedinstveni rezultat pojedine jedinke.“

Događanja

SIMPOZIJ „ISTRAŽIVANJA NA MODELIMA LABORATORIJSKIH ŽIVOTINJA - STANJE I PERSPEKTIVE U HRVATSKOJ I NA SVEUČILIŠTU U RIJECI“

Dubravka Švob Štrac

Simpozij „Istraživanja na modelima laboratorijskih životinja - stanje i perspektive u Hrvatskoj i na Sveučilištu u Rijeci“ u organizaciji Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, Sveučilišta u Rijeci, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Hrvatskog liječničkog zbora održan je 6. listopada 2016. godine na Sveučilišnim odjelima Sveučilišnog kampusa u Rijeci.

Nakon uvodnih riječi akademika Daniela Rukavine, voditelja Zavoda za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu i prof. dr. sc. Krešimira Pavelića sa Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, slijedio je niz zanimljivih predavanja, čiji pregled donosimo.

U sekciji „Znanstveni aspekti“ najprije je održano predavanje prof. dr. sc. Astrid Krmpotić sa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod nazivom „Istraživanja na životinjskim modelima još uvijek su bitna za većinu značajnih medicinskih otkrića: neki problemi i pogled u budućnost“. U predavanju su posebno istaknute glavne odrednice bitne za optimalan uzgoj laboratorijskih miševa, kao jedan od najčešćih modela istraživanja, uključujući tehnološke uvjete, vođenje uzgoja i održavanje životinja u pokusu, nadzor njihovog zdravstvenog stanja kao i najčešći problemi s kojima se pritom susreće.

U predavanju akademika Slobodana Vukičevića s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod nazivom „Predklinički modeli u razvoju novih lijekova za regeneraciju kosti“ raspravljalo se o životinjskim modelima, postupcima, metodama i tehnologijama koje se koriste u istraživanjima koštane regeneracije s ciljem da se pomogne istraživačima u planiranju i provođenju znanstvenih pokusa temeljenih na dobrobiti životinja. Akademik Vukičević dao je kratki pregled najvažnijih istraživanja u okviru projekta OSTEOGROW.

Nakon toga slijedilo je predavanje dr. sc. Darka Markovića iz Fidelta Pharmaceutical Company, Zagreb pod nazivom „Laboratorijske životinje u farmaceutskoj industriji i biomedicinskim istraživanjima“. Dr. sc. Darko Marković je u svom istraživanju

istaknuo kako gotovo polovina laboratorijskih životinja korištenih u istraživačke svrhe otpada na farmaceutsku industriju. Ova istraživanja obuhvaćaju temeljna i primijenjena biomedicinska istraživanja u svrhu istraživanja i razvoja novih lijekova ili cjepiva, bolje dijagnostike te boljih metoda ispitivanja toksičnosti. Upravo stoga istraživanja u farmaceutskoj industriji trebaju biti u skladu s najvišim standardima osiguranja kvalitete, te humanog i etičnog korištenja životinja u biomedicinskom istraživanjima.

U svom predavanju pod nazivom „Transgencične životinje: modeli za fundamentalna i translacijska biomedicinska istraživanja“ prof. dr. sc. Bojan Polić sa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci izložio je pregled razvoja transgencičnih životinja, uvođenje tehnologije ciljanje mutacije gena na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, te istaknuo njezin značaj za razvoj fundamentalnih i translacijskih biomedicinskih istraživanja na Sveučilištu u Rijeci.

Slijedilo je predavanje dr. Vladimira Farkaša s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod nazivom „Suvremene metode oslikavanja laboratorijskih životinja“ u kojem je dan sažet pregled najčešće korištenih pojedinačnih metoda pretkliničkog oslikavanja laboratorijskih životinja, kao i multimodalnog oslikavanja, te njihovih mogućnosti, prednosti i nedostataka.

U svom izlaganju pod nazivom „Drosophila melanogaster: modelni

organizam za bazična i medicinska istraživanja“, doc. dr. sc. Rozi Andretić Waldowski dala je povijesni pregled istraživanja i otkrića na vinskoj mušici, koja se radi genske homologije sa sisavcima lako transliraju na ostale organizme te tako dovode do značajnih napredaka u razumijevanju bazičnih mehanizama funkcioniranja organizma i raznih patoloških stanja.

U sekciji „Filozofski i etički pogledi“ prvo predavanje održao je prof. dr. sc. Elvio Baccarini sa Filozofskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod nazivom „Imaju li životinje prava?“. U svom predavanju prof. Baccarini je izložio moguće smjernice rasprava o granicama legitimiteta korištenja životinja radi istraživanja.

U svom predavanju pod nazivom „Čovjek i životinja: optimiziranje odnosa u okviru bioetičkih standarda“ prof. dr. sc. Amir Mazur sa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, pokušao je polazeći od učenja raznih europskih protobioetičara, skicirati set standarda koji bi, pod pretpostavkom da je legitimiziran na razini lokalne samouprave i prihvaćen među stanovništvom, mogao rezultirati realističnom optimizacijom odnosa čovjeka prema životinjama, primjerenom našem dobu.

Slijedilo je predavanje dr. sc. Ranka Stojkovića s Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, pod naslovom „Suvremeni pogled na etičke principe u radu s laboratorijskim životinjama“. U svom predavanju dr. Stojković je naglasio da je, kako bi se osiguralo poštovanje

temeljnih etičkih načela i principa znanosti, hitno potrebno redefinirati i unaprijediti znanstvene pristupe pokusima na životinjama, a zbog daljnje zaštite dobrobiti pokusnih životinja neophodna je dodatna edukacija znanstvenika i nadležnih zakonodavnih tijela.

Nakon završenih predavanja moderator prof. dr. sc. Krešimir Pavelić i dr.sc. Lidija Šuman potakli su prisutni auditorij na vrlo zanimljivu i konstruktivnu opću raspravu.



Slika 1. Poziv na simpozij

Događanja

RADIONICA „DOBRA PRAKSA I ALTERNATIVA POKUSIMA NA ŽIVOTINJAMA U OBRAZOVANJU I OSPOSOBLJAVANJU“

Maja Lang Balija

Dana 24. listopada 2016. Udruga „Prijatelji životinja“ i Ministarstvo poljoprivrede (Odjel za dobrobit životinja) organizirali su jednodnevnu radionicu pod nazivom „Best practice and alternatives to animal experiments in education and training“, o zamjeni korištenja životinja u obrazovanju i osposobljavanju pomoću alternativnih metoda i tehnika.

Voditelj radionice bio je Nick Jukes diplomirani fizičar Sveučilišta u Leicesteru koji već preko 20 godina radi na poboljšanju obrazovanja i osposobljavanja u prirodnim znanostima. Autor je tridesetak znanstveno stručnih radova i kongresnih priopćenja, te koautor drugog izdanja vrlo značajne knjige „From Guinea Pig to Computer Mouse“ koja opisuje više od 500 proizvoda namijenjenih suvremenijoj naobrazbi i alternativnom pristupu obrazovanja iz područja znanosti o laboratorijskim životinjama.

Između ostalog Nick Jukes je i koordinator neprofitne organizacije InterNICHE koja se bavi promocijom etičkih metoda za naprednu i humanu edukaciju bez korištenja životinja u biološkim znanostima, te edukaciju u humanoj i veterinarskoj medicini. InterNICHE osnovan je 1988. kao EuroNICHE, ali je 2000. godine pretvoren u globalnu međunarodnu organizaciju.



Slika 1. Nick Jukes prikazuje neke od mogućnosti lutke psa

Oslanjajući se na financiranje putem donacija i grantova, ova organizacija svoje aktivnosti provodi putem konferencija, radionica, seminara i multimedijalnih izložbi diljem svijeta. Provodeći svoju aktivnost organizacija je dovela do širenja svijesti i rasprostranjenosti metoda za izravne zamjenu pokusa na živim životinjama alternativnim metodama učenja.

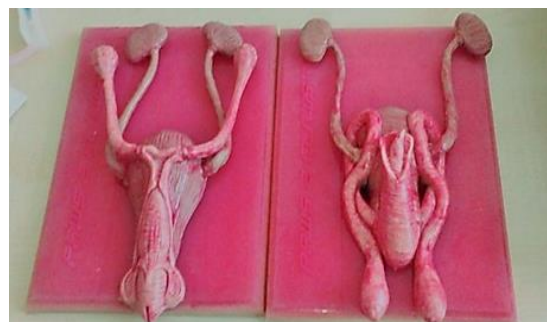
Dobri su primjeri Ukrajina i Rusija koje su zamijenile gotovo 50 000 životinja na godišnjoj razini, dok je Indija iz svog nacionalnog programa za edukaciju u prirodnim znanostima izbacila sekcije životinja u nastavne svrhe i time zamijenila gotovo 60 milijuna životinja.

InterNICHE je zbog toga više puta nagrađivan za humano obrazovanje i to od strane RSPCA, Lord Erskine Silver Award, The Lush Prize of Training te brojnih drugih.

Sudionici radionice bili su upoznati s mnoštvom programa, modela treninga, manekena i simulatori na kojima je demonstrirana primjena alternativnih metoda umjesto korištenja živih životinja u obrazovanju i osposobljavanju.



Slika 2. Modeli umjetne kože i organa za korištenje u kirurgiji



Slika 3. Modeli mokraćno - spolnog sustava za učenje anatomije, fiziologije i kirurgije

Prikazane su brojne videosnimke koje su dostupne na CD/DVD, računalne simulacije raznih laboratorijskih postupaka, multimedijjskih softvera i virtualne stvarnosti (VR) za prikaz i

učenje anatomije, fiziologije, toksikologije, ali i učenje kliničkih vještina, zahvata i operacije.



Slika 4. Konzervirani organi za pomoć u učenju anatomije

Više puta naglašena je i potreba davanja potpore obrazovnim i znanstvenim ustanovama da nadomjeste pokuse, te da se potiču profesori i studenti da odaberu koju metodu učenja žele i da zahtijevaju što naprednije i kvalitetnije obrazovanje.

Istaknute su i brojne pedagoške, etičke i ekonomske prednosti takvih metoda. Svi edukacijski materijali su prevedeni na preko 20-tak svjetskih jezika.



Slika 5. Brojne videosnimke i računalne simulacije dostupne na CD/DVD

Više puta je naglašeno da je dosadašnji uobičajeni pristup vježbanja studenata

korištenjem životinja moguće u potpunosti zamijeniti novim tehnološki naprednijim postupcima, te da sustav obrazovanja i napredak znanosti mora biti čvrsto utemeljen na etičnosti. Ovakav pristup dokazano jamči jednake, ako ne i bolje uspjehe studenata.

Kao zaključak ove radionice istaknuta je sve veća potreba za razvoj alternativnih tehnika koje isključuju upotrebu životinja pogotovo u obrazovne svrhe utoliko više što većina studenata u svom budućem radu neće koristi životinje.

Takav pristup obrazovanju ima pozitivan utjecaj na studente, profesore, ali i na društvo u cjelini, pa se takvi alati gotovo više ne smatraju „alternativom“ nego pravilom. Sama Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, ali i nacionalno zakonodavstvo potiče alternativne pristupe i širenje informacija o primjeni 3R načela (zamjena, smanjenje, poboljšanje). Stoga se danas diljem svijeta sve više implementiraju inovativne i humane alternative kako bi se poboljšalo stjecanje znanja i vještina.

VIŠE INFORMACIJA NA:

¹http://www.interniche.org/ru/system/files/public/Resources/Book/jukes_and_chiuiia_-_2003_-_from_guinea_pig_to_computer_mouse_interniche_2nd_ed_en.pdf

² <http://www.interniche.org/>

Jeste li znali?

MIKRO CT

Igor Erjavec

Kompjuterizirana tomografija (CT) je neinvazivna i nedestruktivna metoda oslikavanja pomoću x-zraka, gdje se individualne projekcije snimane iz više različitih kutova koriste za kompjutorsku rekonstrukciju unutarnje strukture snimanog objekta.

POVIJEST

Wilhelm Conrad Roentgen je 1895. godine otkrio do tada nepoznato elektromagnetsko zračenje te ga je nazvao x-zračenje za što je 1901. godine dobio i Nobelovu nagradu. Osim danas poznatih dobiti koje rendgensko zračenje ima u kliničkoj primjeni ovo otkriće je bilo vrlo bitno za kompjuteriziranu tomografiju jer se CT se može smatrati evolucijom rendgena. Razvoj i konstrukcija prvog komercijalnog CT skenera se pripisuje Sir Godfrey Hounsfieldu.

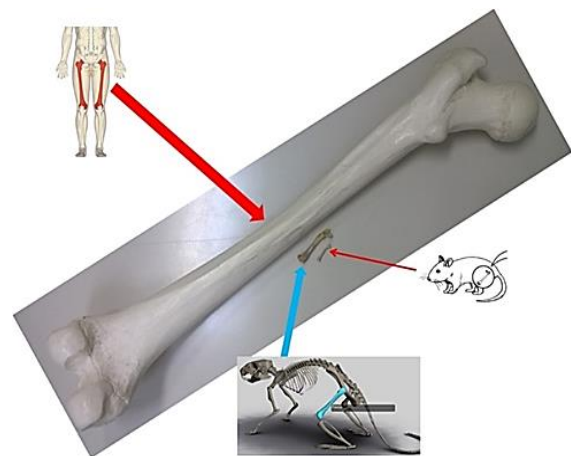
Kao i sa drugim modalitetima oslikavanja, nove primjene su zahtijevala razlučivost sve manjih struktura što dovodi do daljnjeg razvoja CT uređaja.

Sredinom 80-tih godina 20. stoljeća razlučivost CT uređaja se povisuje sa milimetarske (mm) razine na

mikrometarsku (μm) razinu što dovodi do konstrukcije izraza mikro CT. 1994. godine u prodaju je pušten prvi komercijalni mikro CT uređaj i od tada je upotreba mikro CT uređaja u pretkliničkim istraživanjima u stalnom porastu.

OSNOVNI PRINCIP RADA MIKRO CT UREĐAJA

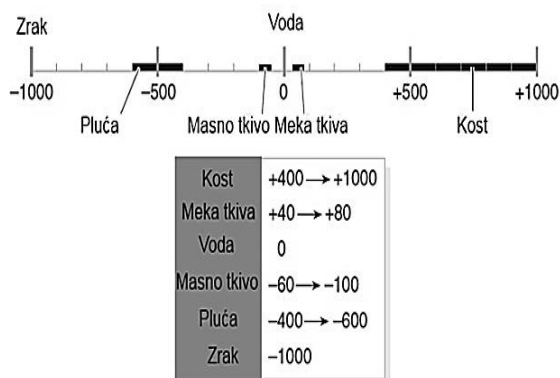
Zbog same veličine laboratorijskih životinjama te njihove fizionomije, uređaji namijenjeni ljudskoj upotrebi nisu primjereni za pretklinička istraživanja. Razlika u veličini zorno je dočarana prilikom usporedbe ljudske bedrene kosti sa bedrenom kosti dviju najčešćih vrsta korištenih u istraživačke svrhe, miša (*Mus musculus*) i štakora (*Rattus norvegicus*) (Slika 1).



Slika 1. Bedrene kosti čovjeka, štakora i miša

Kod CT uređaja se koristi svojstvo međudjelovanja x-zraka sa materijom kroz koju prolaze te se atenuacija ili utišavanje x-zraka se prikazuje u sivoj skali (eng. grayscale), a izražava CT

brojem u HU (Hounsfieldovim jedinicama). Skala vrijednosti CT brojeva je postavljena tako da zrak ima vrijednost -1000, voda ima vrijednost 0, a kost kao tkivo koje najviše apsorbira x-zrake ima do +1000 HU. Unutar tog raspona nalaze se vrijednosti za sva ostala tkiva i organe.



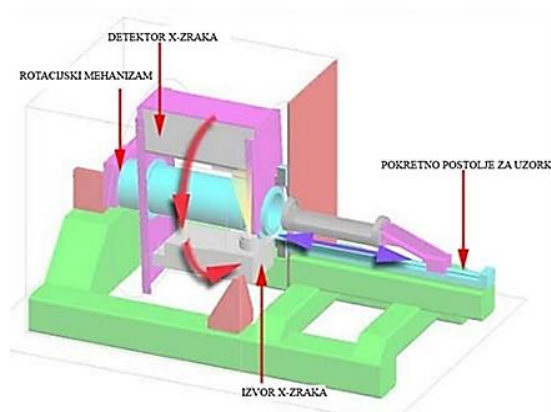
Slika 2. Skala Hounsfieldovih jedinica (HU) sa rasponom za pojedina tkiva

MIKRO CT UREĐAJ

Konstrukcija modernog mikro CT uređaja je prikazana na primjeru SkyScan/Bruker 1076 uređaja. Zbog ionizirajućeg zračenja koje proizvodi izvor, uređaj je konstruiran tako da ne postoji curenje x-zraka van uređaja te nema nikakve opasnosti za operatera.



Slika 3. SkyScan 1076 mikro CT uređaj

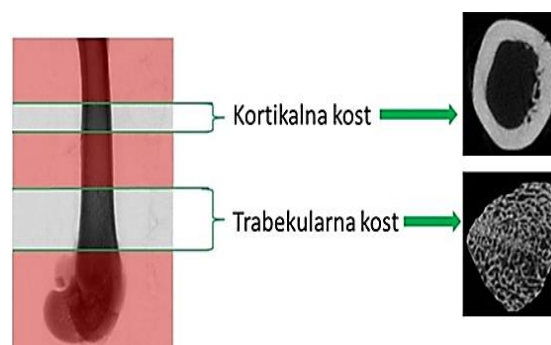


Slika 4. Shematski prikaz komponenti mikro CT uređaja (ustupljeno od strane Bruker/Skyscan)

Zbog konstrukcije uređaja moguće je snimati i in vivo životinje uz mogućnost uvođenja cijevi za plinsku anesteziju u sam uređaj. Veličina uzorka koja se može snimati je ograničena konstrukcijom komore za snimanje te iznosi 200 mm dužine i 68 mm širini i visine (200x68x68 mm).

KOŠTANO TKIVO

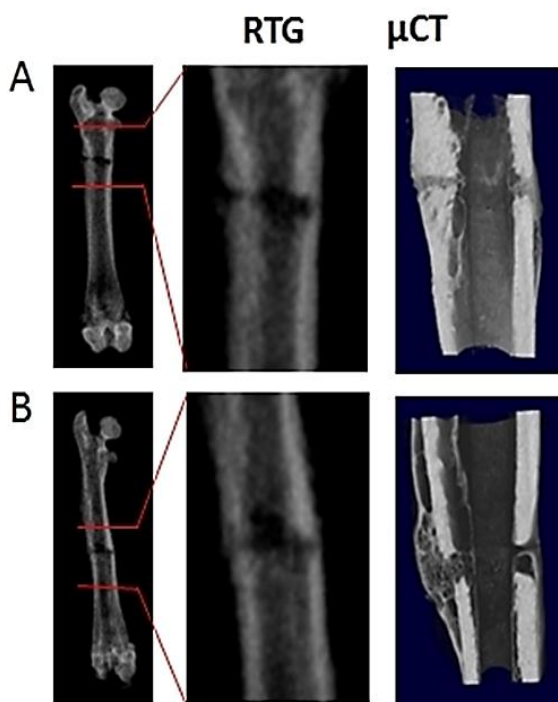
Kost kao najkontrastnije tkivo prilikom snimanja mikro CT uređajem ima široku primjenu analize i mogućnost vizualizacije struktura.



Slika 5. Područja od interesa (ROI) prilikom analize kortikalne i trabekularne kosti na uzorku bedrene kosti.

OSTEOPOROZA - Kao jedna od najčešćih bolesti modernog svijeta osteoporozna se istražuje intenzivno i u životinjskim modelima.

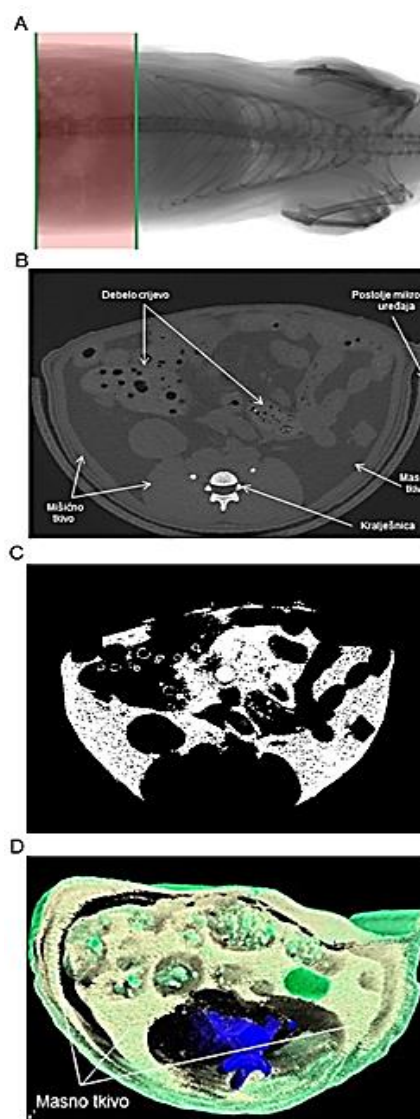
PRIJELOM KOSTI - Cijeljenje prijeloma uključuje nekoliko faza i sve se mogu dobro pratiti pomoću mikro CT-a. Prijelom bedrene kosti cijeli stvaranjem koštanog kalusa koji stabilizira prijelom te se njegovom pregradnjom stvara nova kost na mjestu loma (Slika 6A). Zbog određenih faktora, unutarnjih ili okolišnih, može doći do poremećaja u cijeljenju prijeloma (slika 6B).



Slika 6. Cijeljenje prijeloma praćeno rendgenom i mikro CT-om. Dobro cijeljenje (A) je karakterizirano potpunim premoštenjem prijeloma i minimalnim koštanim kalusom dok kod lošeg cijeljenja (B) poveći koštani kalus nadomješta strukturni integritet duge kosti.

MASNO TKIVO

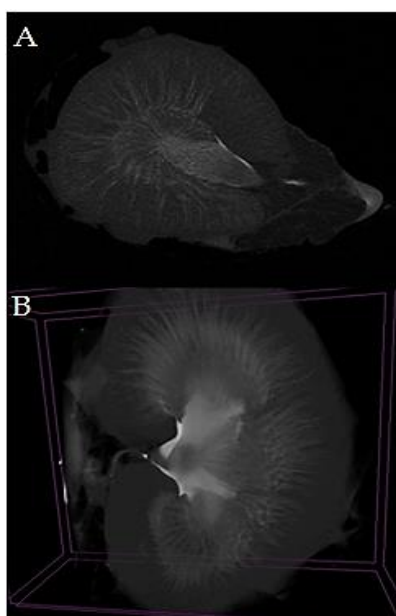
Velika razlika u odnosu ugljika i kisika između masnog i mišićnog tkiva je odgovorna za razliku u apsorpciji rendgenskih zraka manje energije (do 30keV) te mogućnost razlikovanja između tkiva nakon snimanja i rekonstrukcije na mikro CT uređaju.



Slika 7. Masno tkivo snimljeno u viceranoj regiji štakora (A). Rekonstruirani presjek (B), binarizirano masno tkivo (C) i 3D model masnog tkiva (D) štakora.

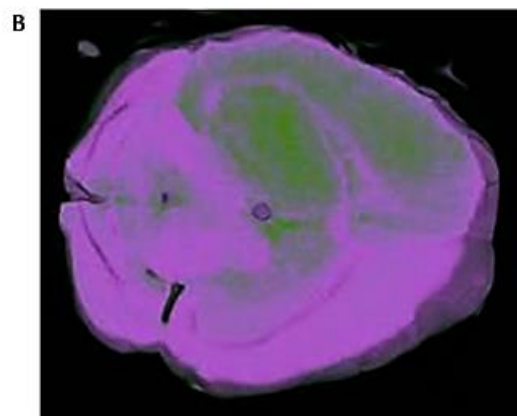
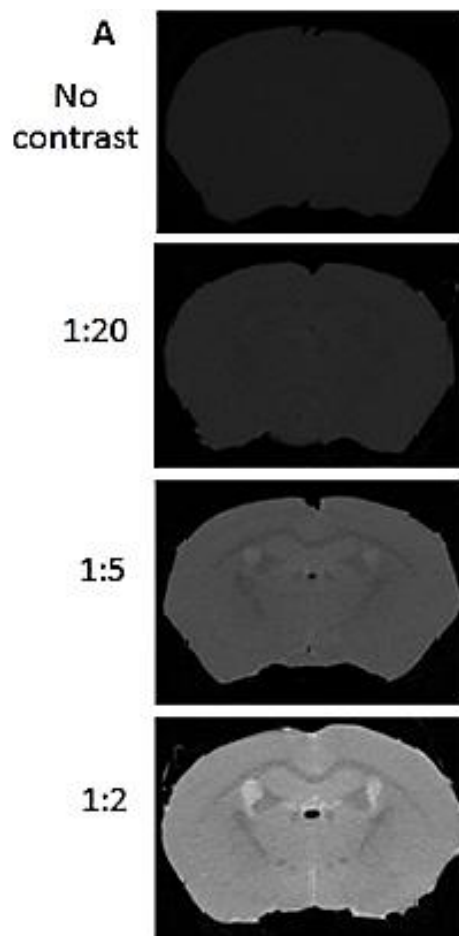
KONTRASTIRANJE

Zbog visoke razlučivosti mikro CT uređaji koriste x-zrake visoke energije („tvrde“ x-zrake) te snimanje mekih tkiva (mišići, parenhimatozni organi, mozak) predstavlja problem. Kontrastiranje pomoću težih elemenata (teški metali ili jod) omogućava bolje razlučivanje unutarnje strukture tih organa. U *in vivo* uvjetima moguće je napraviti angiokontrastiranje, odnosno iniciranje kontrastnog sredstva u krvožilni sustav životinje.



Slika 8. Bubrež štakora kontrastiran Omnipaque (GE Healthcare) otopinom na bazi joda. Poprečni presjek (A) i 3D model (B).

Osim injektabilnog kontrastiranja moguće je napraviti i imerzijsko kontrastiranje gdje se organi urone u otopinu kontrastnog sredstva. Ovisno o protokolu mogu se kontrastirati nekoliko dana, kako bi penetracija kontrastnog sredstva bila što bolja u unutrašnjost organa.



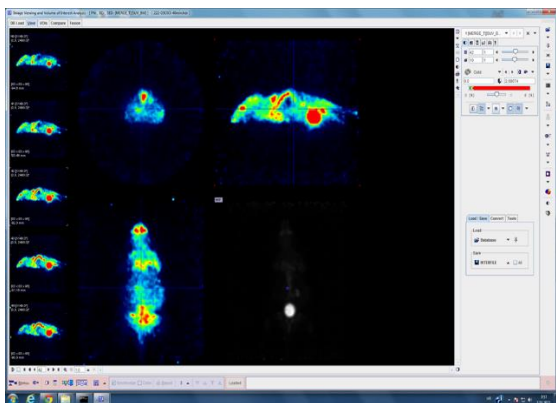
Slika 9. Prikaz struktura mozga u ovisnosti o razrjeđenju kontrastnog sredstva (A). Presjek kroz 3D model mozga nakon moždanog udara. Kontrastiranjem je vizualizirano područje zahvaćeno ishemijskim događajem (B).

Jeste li znali?

POZITRONSKA EMISIJSKA TOMOGRAFIJA (PET)

Vladimir Farkaš

Pozitronska emisijska tomografija (PET) je neinvazivna metoda nuklearnog molekularnog oslikavanja koja mjeri *in vivo* biodistribuciju apliciranog radiofarmaka [1] (slika 1.). Osnovni cilj metode je neinvazivno pratiti biološke procese u tkivima i organima [2].



Slika 1. Osnovni 2D prikaz PET snimke u tri presjeka. Spektar boja (od plave do crvene) označava intenzitet nakupljanja radiofarmaka u tkivima.

OSNOVNI PRINCIPI RADA

Za provedbu PET snimanja, kao metode nuklearne medicine, neophodna je aplikacija radiofarmaka.

Radiofarmak se sastoji od (a) molekule čija biodistribucija je od interesa istraživačima i od (b) radioizotopa čiji će raspad omogućiti određenoj metodi oslikavanja određivanje pozicije te molekule u organizmu [3].

Za potrebe PET oslikavanja, molekule u radiofarmacima se označavaju radioizotopima koji se raspadaju β^+ raspadom i pri tome emitiraju pozitron. Kako se pozitron kreće kroz tkivo (kod izotopa ^{18}F taj put iznosi prosječno 0.6 mm), gubi svoju kinetičku energiju te na kraju ulazi u reakciju s elektronom iz tkiva. Brzom anihilacijom, pozitron i elektron nestaju te nastaju dvije gama zrake (fotona) energije 511 keV koje se odašilju u suprotnim smjerovima, pod kutom od 180° [4]. Te dvije gama zrake koincidentalno registriraju kružno postavljeni detektori. Nakon toga, algoritmi matematičke tomografske rekonstrukcije slike pretvaraju te događaje u sliku [1]. Rezolucija modernih PET uređaja je oko 1 mm.

Daleko najčešće korišten radiofarmak u mikro-PET oslikavanju je 2-[^{18}F]Fluoro-2-deoksi-D-glukoza (18FDG). Nakon aplikacije (i/v ili i/p), 18FDG ulazi u stanice isto kao i glukoza. U stanici, enzim heksokinaza prevodi 18FDG u 18FDG-fosfat koji ne sudjeluje u daljnjem procesu glikolize kao glukoza, već u tom obliku ostaje u stanici, gdje se nakuplja ovisno o metaboličkoj aktivnosti i na taj način šalje signal iz stanica. Zahvaljujući tim svojstvima, 18FDG se naziva još i analogom glukoze čija biodistribucija u tkivima održava biodistribuciju glukoze u tkivima.

**PRIMJENA PET-A U
PRETKINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA**

Primjena PET-a u pretkliničkim istraživanjima je opisana u širokom spektru fizioloških i patoloških zbivanja [5] te ovisi o korištenom radiofarmaku.

Istraživanje tumora jedna je od glavnih primjena PET-a [6]. Od mnogih primjena u istraživanju tumora, upotreba 18FDG-a za praćenje metabolizma tumora predstavlja jednu od najbitnijih upotreba kliničkog i pretkliničkog PET-a. [7]. Osim toga, primjenom odgovarajućih radiofarmaka, PET se koristi i za istraživanje proliferacije tumorskih stanica [8], ekspresiju gena [9] te tumorsku angiogenezu [10], hipoksiju [11] i apoptozu [12].

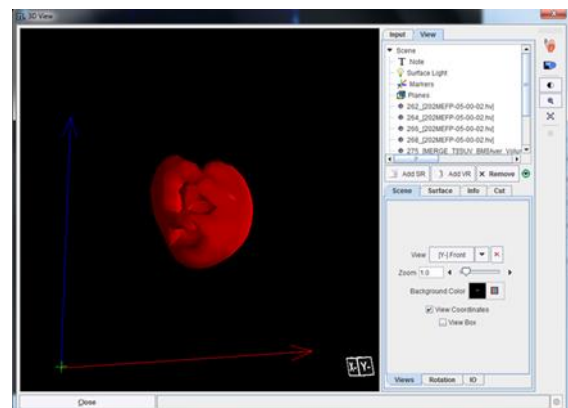
Postoji čitav niz PET radiofarmaka razvijenih za upotrebu u neurologiji, kao npr. H2150 za mjerenje cerebralnog protoka krvi, 18FDG za mjerenje metabolizma glukoze, 11C-raclopride za kvantifikaciju postsinaptičkih D2 receptora, 11C-Pittsburgh spoj B za prikaz naslaga β -amiloida i 11C-R(-)-RWAY za istraživanje 5-hidrotriptaminskog receptora 1A [13]. Upotrebom tih, ali i drugih radiofarmaka, PET je našao svoju primjenu u istraživanju patofiziologije, farmakologije i otkrivanju mehanizama djelovanja lijekova u mozgu [14].

U kardiologiji, PET se koristi za mjerenje metabolizma miokarda (18FDG) i prokrvljenosti miokarda

(13N[NH3]) u modelima akutnog infarkta miokarda [15].

**PET NA INSTITUTU RUĐER
BOŠKOVIĆ**

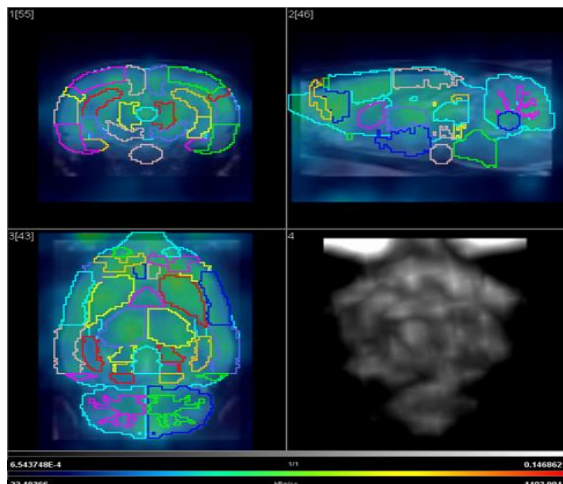
Na Institutu Ruđer Bošković (IRB), za provedbu PET snimanja, koristi se Raytest ClearPET preklinički skener namijenjen isključivo malim životinjama. ClearPET na IRB-u ima aksialno pregledno polje (FOI) od 110 mm. U našoj konfiguraciji prostorna razlučivost u središtu preglednog polja iznosi 1.15 mm³. Apsolutna osjetljivost definira se kao omjer detektiranih anihilacija i ukupnih anihilacija te iznosi 1.8%. Kao radiofarmak, koristi se analogan glukoze - 18FDG.



Slika 2. 3D PET snimka miokarda štakora nakon inducirano akutnog infarkta miokarda

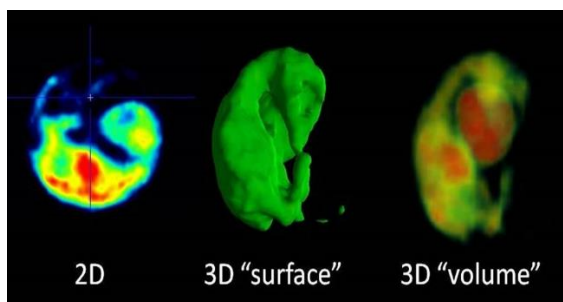
Prilikom manipulacije i snimanja, životinje su anestezirane izofluranom. Indukcija u anesteziju provodi se u indukcijskoj komori s 4% izofluranom u protoku čistog kisika. Održavanje anestezije prilikom aplikacije radiofarmaka i tijekom snimanja, odvija se pomoću nosne maske, putem koje se

doprema 2% izofluran u protoku čistog kisika od 0,6-0,7 l/min. Tijekom snimanja se kontrolira te grijaćom podlogom održava tjelesna temperatura životinje.



Slika 3. 2D PET snimka mozga štakora u tri presjeka (1-3) i zbirno (4) s prikazom podjele mozga po regijama (atlas mozga)

Od primjene na istraživanju animalnih modela, najopsežnija snimanja su provedena u svrhu istraživanja dijabetesa (tip I), akutnog infarkta miokarda (slika 2.), Alzheimerove bolesti (slika 3.), oksidacijskog stresa te metabolizma smeđeg masnog tkiva. Valja istaknuti i pionirska istraživanja na pilećim embrijima (slika 4.).



Slika 4. PET snimka pilećeg, 13 dana starog, embrija u tri različite vrste prikaza

LITERATURA

- [1] Hutchins GD, Miller MA, Soon VC, Receveur T. Small Animal PET Imaging. *ILAR Journal*. 2008; 49(1):54-65.
- [2] Phelps ME. Inaugural article: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97:9226-9233.
- [3] Wadsak W, Mitterhauser M, Rendl G, Schuetz M, Mien LK, Ettliger DE, Dudczak R, Kletter K, Karanikas G. [18F]FETO for adrenocortical PET imaging: a pilot study in healthy volunteers. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2006; 33(6):669-72.
- [4] Harpen MD. Positronium: Review of symmetry, conserved quantities and decay for the radiological physicist. *Medical Physics*. 2004; 31:57-61.
- [5] Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular imaging with PET. *Chemical Reviews*. 2008; 108:1501-1516.
- [6] Michalski M, Chen X. Molecular imaging in cancer treatment. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011; 38:358-377.45.
- [7] Gambhir SS, Czernin J, Schwimmer J, Silverman DHS, Coleman RE, Phelps ME. A tabulated summary of the FDG PET literature. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001; 42:1-93.
- [8] Bading JR, Shields AF. Imaging of cell proliferation: status and prospects.

Journal of Nuclear Medicine. 2008; 49:64-80.

[9] Blasberg R. PET imaging of gene expression. European Journal of Cancer. 2002; 38:2137-2146.

[10] Niu G, Chen X. PET imaging of angiogenesis. PET Clinics. 2009; 4:17-38.

[11] Dehdashti F, Holland JP, Lewis JS. Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu-ATSM. Quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging. 2009; 53:193-200.

[12] Murakami Y, Takamatsu H, Taki J. F-18-labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2004; 31:469-474.

[13] Yao R, Lecomte R, Crawford ES. Small-Animal PET: What Is It, and Why Do We Need It? Journal of nuclear medicine technology. 2012; 40(3):157-165

[14] Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. Trends in pharmacological sciences. 2010; 31:411-417.

[15] Morguet AJ, Chatziioannou AF, Cherry SR, Phelps ME, Schelbert HR. Evaluation of a newly developed small-animal PET scanner in experimental myocardial infarction. Journal of Nuclear Medicine. 1998; 39:9.

Najave i zanimljivosti

- **NAJAVA: Radionica u organizaciji SLAS i CroLASA: 25. siječnja 2017.** Ljubljana, Slovenija, „Mikrobiološka ispravnost hrane za laboratorijske glodavce“, Prijave do 15. 01. 2017.

- **NAJAVA: Radionica u organizaciji CroLASA o prijavi projekata etičkom povjerenstvu - veljača 2017.**

- **NAJAVA: Laboratory Animal Sciences 2017 - virtual event - online konferencija 8. i 9. 02. 2017.**

<http://www.labroots.com/virtual-event/laboratory-animal-sciences-2017>

- **EURL - ECVAM**

<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

- **FELASA**

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

- **tečajevi Fondazione Guido Bernardini**

<http://www.fondazioneguidobernardini.org/en/home.aspx>

- **tečajevi Universitet Utrecht**

<http://www.uu.nl/en/education/veterinary-education/study-programme/extra-curricular-education/course-on-laboratory-animal-science>

- **tečajevi Charles River**

<http://www.criver.com/customer-service/education-training/custom-training>

- **tečajevi European Molecular Biology Laboratory (EMBL)**

<https://www.embl.de/training/events/>