

BILTEN

Službeno

glasilo

2018

**Hrvatsko
društvo za
znanost o
laboratorijskim
životinjama**



BILTEN

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

Glavna urednica:

Dubravka Švob Štrac

Članovi uredništva:

Julija Erhardt
Maja Lang Balija

U ovom broju priloge pripremili:

Branka Buković Šošić
Julija Erhardt
Vladimir Farkaš
Maja Lang Balija
Miro Samsa
Dubravka Švob Štrac

Bilten izlazi jednom godišnje.

Zagreb, 2018. godina.

Dogadanja

40. GODINA FELASA-e

Julija Erhardt

Federacija europskih udruga za znanost o laboratorijskim životinje (FELASA, engl. Federation o European Laboratory Animal Association) osnovana je 1978. godine i do danas je postala priznata, kako na europskoj, tako i na međunarodnoj razini.

Sredinom sedamdesetih godina u Europi je ojačao trend razvijanja suradnje između različitih europskih laboratorijskih znanstvenih udruga, što je u području znanosti o laboratorijskim životinjama rezultiralo s prvim sastankom njemačko-austrijskog (GV-SOLAS), britanskog (LASA) i skandinavskog udruženja (Scand-LAS), koji su u to vrijeme prvi prepoznali potrebu za integracijom i koordiniranim i profesionalnim radom u području znanosti o laboratorijskim životinjama u Europi.

Sastanak na temu "Laboratorijski štakor i biološke varijacije" održan je u lipnju 1978. g. u Cambridgeu, UK. Predloženo je da se zajednički znanstveni sastanak organizira svake tri godine od strane jedne od asocijacija. Taj je prijedlog službeno potvrđen na sastanku u Utrechtu u kolovozu 1979. Udruženju su se uskoro pridružilo nizozemsko (NVP) i francusko udruženje (SFEA).

Tijekom godina FELASA je rasla i postala važan igrač u europskom prostoru kao i u svijetu. Danas FELASA-u čini 21 udruga iz 28 zemalja (Austrija, Belgija, Hrvatska, Češka, Danska, Estonija, Finska, Francuska, Njemačka, Grčka, Mađarska, Island, Izrael, Italija, Latvija, Litva, Nizozemska, Norveška, Poljska, Portugal, Rumunjska, Ruska Federacija, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, Turska i Velika Britanija) odnosno ukupno više od 4.000 stručnjaka i znanstvenika s područja rada s pokusnim životnjama. Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životnjama (CroLASA) postalo je punopravni član FELASA-e 2007. godine.

FELASA je krovna organizacija svih europskih nacionalnih udruga, koje mogu uključivati samo nacionalnu udrugu određene zemlje, a ne pojedinca. Članstvo u FELASA-i je stoga neizravno, preko nacionalne udruge, te je svaki član nacionalnog udruženja za znanost o laboratorijskim životnjama koje je pristupilo FELASA-i, ujedno i član FELASA-e.

Prvi simpozij FELASA održan je u Düsseldorfu u Njemačkoj 1981. g., u organizaciji GV-SOLAS-a. Na prvoj Generalnoj skupštini usvojen je statut FELASA-e. Iza ovog simpozija slijedili su ostali, organizirani svake treće godine. Naziv FELASA simpozij, kasnije je promijenjen u FELASA kongres. FELASA sve do danas svake treće godine organizira kongres na kojem sudjeluje oko 2.000 ljudi iz cijelog svijeta (veći dio Europe). Po potrebi

organizira i druge aktivnosti (akreditiranje tečajeva, radionice, itd.). Od 2007. g. FELASA dodjeljuje trogodišnju nagradu za izvorni znanstveni rad za bilo koji aspekt znanosti o laboratorijskim životinjama, koji bi mogao dovesti do poboljšanja u načinu na koji se životinje koriste u istraživanju, testiranju ili edukaciji.

U radu FELASA-e ključna je bila 1987. g., kada su na zajedničkom sastanku u Uppsalu, Švedska donesene smjernice rada, koje su ostale temelj rada društva sve do danas. Izneseni prijedlozi mogu se svrstati u nekoliko točaka:

1. Da bi se osiguralo dobro funkcioniranje i provedba novih aktivnosti, bilo je neophodno revidirati i modificirati početni FELASA Ustav. Predsjednik i tajnik udruženja koje je domaćin trogodišnje konferencije bili su automatski predsjednik i tajnik Federacije. To je dovodilo do situacije da su ovi predstavnici bili previše zauzeti dogovaranjem sljedećeg simpozija i nisu imali kapacitet za rješavanje drugih pitanja. Prema tome, novi Ustav je uključio nove organizacijske strukture. Federacija je dobila Upravni odbor u kojem je predstavljena svaka konstitutivna udruga. Odbor je sada svake godine birao tri predstavnika koji bi, zajedno s predsjednikom, bili izravno odgovorni za administrativni i organizacijski rad. Najočitija promjena trebala je biti da FELASA ima svoje službenike, koje je birao Upravni odbor među svojim članovima, s mandatom koji nisu bili vezani za održavanje simpozija.
2. Federacija je trebala uspostaviti grupu koja bi identificirala teme za daljnji rad.
3. Smatralo se da je bitno da FELASA osigura priznanje u Europi kroz Vijeće Europe i Europske unije, kao krovne institucije koja bi se trebala konzultirati o svim pitanjima koja se odnose na laboratorijsku znanost o životinjama te posljedično utvrditi snažne veze sa Strasbourgom i Bruxellesom.
4. Posebna zadaća od velike važnosti bila je izrada odgovarajućeg programa obrazovanja i osposobljavanja za sve uključene u područje rada s laboratorijskim životinjama. Ustanovljena je potreba stvaranja FELASA-ih radnih skupina za obrazovanje i programa obuke za različite kategorije korisnika životinja: skrbnici životinja, tehničari, znanstvenici koji koriste laboratorijske životinje i stručnjaci za znanost o laboratorijskim životinjama. Prvi korak trebao se odnositi na obrazovanje i osposobljavanje nadležnih ovlaštenih osoba, a osobito znanstvenika koji rade s laboratorijskim životinjama. Zajednički standard trebao je olakšati profesionalnu mobilnost znanstvenih radnika u Europi.
5. FELASA je također trebala osnovati radnu skupinu za zdravlje životinja kako bi poticala ujednačenost u procjeni životinja i doprinos standardizaciji i visokoj razini standarda u znanosti i dobrobiti životinja.

6. Jedan od zadataka je bio i uspostavljanje i održavanje veza s međunarodnim ili drugim tijelima koja se bave znanošću o laboratorijskim životinjama.

Sve odluke sa sastanka i revidirani statut su poslane pojedinačnim udruženjima na dogovor i ratifikacija, što je i učinjeno na Simpoziju u Francuskoj 1990. g. Osnovan je službeni Upravni odbor i Izvršni odbor. Sve se to smatralo temeljem za budući razvoj te je povećalo priznanje FELASA-e, a revidirana struktura značajno je pomogla Federaciji u njenom radu.

FELASA radi na širenju i napretku znanosti o laboratorijskim životinjama i odgovornom istraživačkom radu u kojem dobrobit životinja i principi 3R zauzimaju središnje i vodeće mjesto. Promiče i koordinira razvoj znanosti o laboratorijskim životinjama i dobre prakse u Europi putem nacionalnih udruga kroz sudjelovanje u brojnim aktivnostima u EU.

U ostvarivanju svog cilja postizanja priznanja na nivou Europe, prepoznate su razlike u strukturi i radnoj praksi između Vijeća Europe (CoE) u Strasbourg i Europske komisije (EC) u Bruxellesu. U studenom 1991. g., FELASA je dobila status promatrača za sektor laboratorijskih životinja. Prvi uspjeh bio je s Vijećem Europe, koje je pozdravilo FELASA-ine preporuke za obrazovanje i osposobljavanje svih ovlaštenih za uzgoj, održavanje i uporabu laboratorijskih životinja. CoE je usvojila preporuke FELASA-e kao službenu politiku Vijeća Europe i

formalno se zahvalila FELASI na njezinom radu. Tako su odluke i prijedlozi FELASA-e, više ili manje nepromijenjeni, usvojeni kao politika EU-a.

Osim kroz zakonodavna tijela (Vijeće EU, Komisija EU) i u području zakonodavstva, FELASA djeluje kroz umrežavanje s drugim nacionalnim i međunarodnim udruženjima (ICLAS, AALAC, AALAS) te pokreće stručne, znanstvene i građanske inicijative. FELASA također pruža osnovnu i kontinuiranu edukaciju. U tu svrhu (putem radnih skupina koje redovito uspostavlja) objavljuje smjernice, preporuke i izvješća o aktualnim izazovima u području rada s pokusnim životinjama (više na www.felasa.eu). Svako nacionalno udruženje može predložiti svog kandidata, stručnjaka iz svoje zemlje, u radne skupine FELASA-e, iz kojih se onda odabiru najbolji predloženi kandidati.

Kao organizacija, FELASA djeluje na demokratskoj osnovi. Smjernice i odluke o tekućim poslovima donose članovi Upravnog odbora (UO) na sastancima koji se održavaju dva puta godišnje, svaki put u drugoj državi članici. Svaka punopravna udruga ima 1-2 zastupnika u Upravnom odboru, koji predlaže Odboru stručnjaka aktualna pitanja iz područja rada s pokusnim životinjama i 1 glas u glasovanju i odlučivanju. Upravni odbor sastoji se od devetočlanog Izvršnog odbora (IO) koji se sastoji od izabranih predstavnika s mandatom od 2 godine (predsjednik, tajnik, blagajnik, potpredsjednik za radne skupine,

međunarodni odnosi, europski poslovi, tečajevi). IO je odgovoran za izvršenje odluka, pripremu radnih materijala i izvješća, kao i sve druge poslove za koje je dobilo ovlaštenje od Upravnog odbora.

Na FELASA-inim stranicama (www.felasa.eu), mogu se potražiti preporuke, smjernice, izvješća i dokumenti te se potražiti savjeti i mnoga druga pitanja vezana na rad s laboratorijskim životinjama. „Laboratory Animals“ (LA) je službeni časopis FELASA-e. Snaga publikacije FELASA dolazi iz širine kruga znanstvenika koje predstavlja pa kada se utvrdi određeni stav, smjernica ili preporuka nakon rasprave među svojim udrugama članicama, FELASA ih može promicati s autoritetom. FELASA je europsko tijelo najprikladnije za definiranje, osvrt i promicanje najboljih mogućih praksi u svim aspektima znanosti o laboratorijskim životinjama.

Literatura:

Prevedeno i prilagođeno:

Prins, Jan-Bas. THE HISTORY OF FELASA - 1978-2018.
<http://www.felasa.eu/about-us.21.02.2019>.



Aktivnosti Društva

PROMOCIJA KNJIGE UVOD U ZNANOST O LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA

DOC. DR. SC. LIDIJA
ŠUMAN

Maja Lang Balija

Promocija knjige „Uvod u znanost o laboratorijskim životinjama“ doc. dr. sc. Lidije Šuman, održana je 13. lipnja 2018. godine na Institutu Ruđer Bošković u organizaciji Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.



Knjigu je 2018. godine u tiskanom izdanju objavila autorica uz su-nakladništvo našeg Društva i finansijsku potporu Ministarstva znanosti i obrazovanja RH. Urednik ovog sveučilišnog udžbenika je prof. dr. sc. Boris Obsieger, a knjigu su

recenzirali prof. dr. sc. Filip Čulo s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prof. dr. sc. Bojan Polić s Medicinskog fakulteta u Rijeci.



Knjiga je podijeljena u 9 poglavlja. Poglavlja knjige su međusobno povezana, ali je knjiga strukturirana tako da se može čitati i uz preskakanje cjelina. Prvo poglavlje „Znanost o laboratorijskim životinjama“ daje osnovne definicije i kratku povijest razvoja znanosti o laboratorijskim životinjama. Slijedi poglavlje „Laboratorijske životinje“ u kojem je prikazana biologija najčešće korištenih životinja u znanstvenim istraživanjima (miš, štakor, zamorče i kunić).

Poglavlje „Održavanje laboratorijskih životinja“ detaljno opisuje načine rada postupanja u suvremenim animalnim jedinicama, potrebne uvjete prostora i opreme za suvremeni uzgoj laboratorijskih životinja te načine održavanja životinja, uz odgovarajući stalni zdravstveni nadzor.

U poglavljima „Osnovna genetika laboratorijskih životinja“, „Mutirane laboratorijske životinje“, „Serije genetički specijaliziranih sojeva“ i

„Transgenične laboratorijske životinje“ autorica posebnu pažnju posvećuje jasnom i detaljnem opisu osnovnih genetičkih pojmoveva te objašnjava osnove genetičkog nadzora uzgoja laboratorijskih životinja, objašnjava pojmove križanja i/ili dobivanja pojedinih sojeva genskom selekcijom, kako održavanjem poželjnih prirodnih mutacija ili manipulacijom gena u cilju dobivanja genetski modificiranih životinja.

Autorica posebno poglavje posvećuje etičkom pristupu u radu s laboratorijskim životnjama, te u poglavljju „Laboratorijske životinje u Hrvatskoj“ daje povijesni prikaz razvoja znanosti o laboratorijskim životnjama u našoj zemlji osvrćući se i na stanje vezano za europsku regulativu i hrvatsko zakonodavstvo. Knjizi su dodana i dva priloga: prikaz povijesnog razvoja Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životnjama, kao i Etički kodeks Hrvatskoga društva za znanost o laboratorijskim životnjama.

Vrijednost ove knjige za naše područje je i to što je originalno pisana na hrvatskom jeziku, čime su uvedeni i razjašnjeni brojni pojmovi za koje do sada nije bilo odgovarajuće terminologije, tako da knjiga na svom kraju ima i vrlo iscrpan i koristan pojmovnik. Literarni pregled upućuje čitatelja uglavnom na pregledne radove, ali i na one u kojima se mogu naći detaljniji podaci o postupku ili svojstvima pojedinih sojeva životinja.

Ova vrijedna knjiga je prije svega namijenjena studentima bioloških, biotehničkih i biomedicinskih studija te svim istraživačima koji u svom radu koriste laboratorijske životinje, kao i onima koji se bave njihovim uzgojem. Po opsegu i načinu izlaganja knjiga je primjerena za stjecanje osnovnih znanja iz područja znanosti o laboratorijskim životnjama, a s obzirom da je pisana na pristupačan način može biti zanimljiva i laicima.

Kako postoji trajna želja i nastojanje Društva da organiziranjem bibliotečno-informacijske službe prikupljanje podataka potrebnih za rad s laboratorijskim životnjama, ova knjiga predstavlja i prvi takav sveobuhvatan udžbenik s područja našeg djelovanja. Članovi Društva knjigu mogu naručiti putem naše e-mail adrese, te je kupiti po promotivnoj cijeni.

Životopis autorice:

Doc. dr. sc. Lidija Šuman diplomirala je biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je i magistrirala te doktorirala iz područja biomedicine. Veći dio radnog vijeka provela je u Institutu Ruđer Bošković kao voditeljica pogona za laboratorijske životinje.

Cijeli svoj radni vijek provela je u unapređivanju tema vezanih za znanost o laboratorijskim životnjama. Svoj veliki doprinos dala je kroz aktivnost unutar Hrvatskog društva fiziologa, uvidjevši potrebu osnivanja sekcija radi boljeg i jačeg povezivanja i razmjene iskustava znanstvenika i

stručnjaka koji u svom radu koriste laboratorijske životinje.

Godine 1981. izabrana je za voditelja sekcije za laboratorijske životinje. Sekcija je pod njenim vodstvom vrlo intenzivno radila: pomagalo se u podizanju uvjeta i standarda u držanju laboratorijskih životinja, a napravljen je prvi službeni popis uzgajališta laboratorijskih životinja u Hrvatskoj (objavljen u Period. biol. 1981.).

Sekcija 1990. godine prerasta u Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životnjama, na čijem čelu dr. Šuman ostaje 10 godina. U tom periodu Društvo donosi i prvi Etički kodeks o etičnom pristupu prema životnjama. Od 2009-2011. radi u Rijeci kao docent na MEF Ri i kao znanstveni savjetnik u Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

Predavala je Znanost o laboratorijskim životnjama na postdiplomskim studijima, Veterinarskog i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Sveučilištu u Rijeci. Godine 2011. odlazi u mirovinu. Objavila je 27 znanstvenih te 18 stručnih i drugih radova, njezin h-index iznosi 14 a ukupna citiranost njenih radova preko 650 puta.



Jeste li znali?

POSTUPCI DOBIVANJA TRANSGENIČNIH MIŠEVA

Miro Samsa

Uvod

Genetski modificirane miševe koristimo kao modele za izučavanje humanih fizioloških i patofizioloških procesa.

Iako znamo što je gen i što je genom te koja je njegova veličina, funkcija većine gena za sada je još uvijek nepoznata. Da bismo odredili koju ulogu ima neki naš gen od interesa, moramo mu onemogućiti ili pak pojačati njegov izražaj (ekspreziju).

Ako onemogućimo izražaj gena u genomu, dobiveni model miša nazivamo „knock-out“ i suprotno, ako pak želimo pojačati izražaj nekog gena, dobivamo transgeničnog miša („knock-in“). Transgenični miš je onaj koji u svom genomu ima dodatnu kopiju gena ili je u njegov genom uveden potpuno ektopičan gen (npr. GFP gen za fluorescenciju).

Zašto miš?

Miševe kao modele koristimo iz nekoliko razloga:

- miš je sisavac
- mišji genom je sekvencioniran

- veličina genoma miša približna je veličini humanog genoma (99% mišjih gena ima homolognog partnera u humanom genomu)
- fiziologija miša vrlo je slična humanoj
- linije su visoko srođene
- legla su brojna
- kratko generacijsko vrijeme
- relativno niski troškovi održavanja



Slika 1. Transgenični miš s uvedenim GFP genom dobivenim iz meduze za ekspreziju zelenog fluorescentnog proteina (eng. Green fluorescent protein, GFP)

Čemu služi transgenični miš?

Kao što je već navedeno, transgenične miševe koristimo za identifikaciju i proučavanje uloge pojedinih gena, za kontrolu genske eksprezije, proučavanje bolesti, te u proizvodnji i kontroli biofarmaceutika.

Transgenična tehnologija

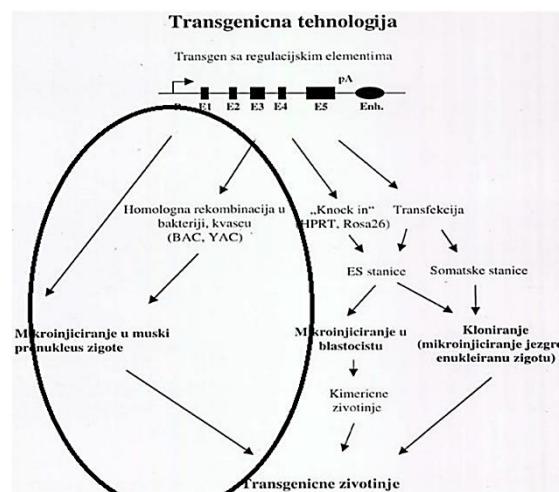
Jedan od postupaka dobivanja transgeničnih miševa je takozvani klasičan način u kojem moramo najprije formirati transgen. Transgen se stvara tako da izoliramo DNA željenog gena, dodamo regulatorne elemente koji osiguravaju ispravno procesuiranje RNA i ekspresiju u određenom tkivu ili organu. Ti regulatorni elementi su promotor, pojačivač, transkripcijski STOP i sekvenca.

Nakon što smo formirali željeni transgen, transgen se integrira u genom. To ubacivanje transgena u genom se može izvesti na nekoliko načina, kao što je izravna transfekcija, retroviralna transfekcija u embrionalne matične stanice (u dalnjem tekstu EMS), te njihovo injiciranje u blastociste, retroviralna infekcija u rane embrije, izravno mikroinjiciranje DNA u zigote, elektroporacija i elektrofuzija (slika 2.).

Sve navedene integracije transgena u genom nisu precizne i ovise o nizu faktora. Da bi to izbjegli, danas koristimo takozvane ciljane mutacije gena (eng. gene targeting). Ciljanu mutaciju gena postižemo homolognom rekombinacijom vektora u mišjim EMS.

Rezultati ciljane mutacije mogu biti:

- knock-out (ciljana delecija ili inaktivacija gena u genomu)
- knock-in - transgenični miš (ciljano ubacivanje nekog genskog elementa ili (trans) gena u točno određeni genski lokus



Slika 2. Shematski prikaz transgenične tehnologije

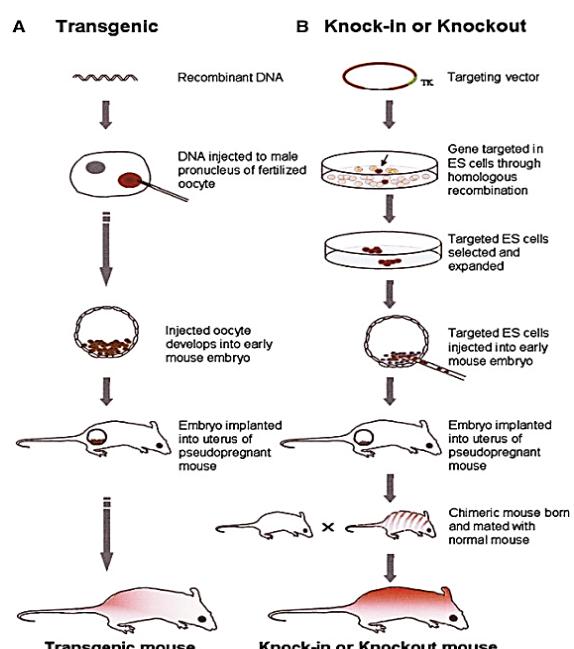
Usporedba metoda za proizvodnju transgeničnih miševa i metoda za ciljanu mutaciju (eng. gene targeting)

Proizvodnja transgeničnih miševa (slika 3.) izvodi se tako da se konstruira željeni konstrukt (gen s vektorom injiciramo u muški pronukleus zigote-C57Bl/6 crni ili 129 aguti) te se implementira u jajovod pseudogravidne ženke. Metoda za ciljanu mutaciju sastoji se od ugradnje DNA u EMS, odabira stanica koje eksprimiraju željeni gen, injiciranja transformiranih stanica u unutrašnjost blastociste te implementacije u maternicu pseudogravidne ženke.

Mikroinjiciranje homolognih rekombinanti EMS u blastocistu

Kao donore blastocista koristimo soj CB20, zbog veće produkcije blastocista. Također može se koristiti i soj CD1. Kao primaocne blastocista koristimo ženke F1 hibride (C57Bl/6 x Balb/C).

Uvjeti u vivariju moraju biti kontrolirani i mora postojati regulirani režim svijetlog i tamnog perioda (ženke u tom režimu ovuliraju svakih 4 do 5 dana). Ženke moraju biti starije od 6 tjedana (u slučajevima hormonski stimulirane superovulacije koriste se ženke starosti 3 do 5 tjedana). Također moraju biti osigurani dobri uvjeti uzgoja (mir, temperatura 22 - 26 °C, vlažnost 40 - 60 %, odgovarajuća jačina svjetla, odsutnost patogena, higijena...).



Slika 3. Shematski prikaz metoda stvaranja transgeničnih miševa

Davateljice blastocista stavljamo na parenje (CB20♀ x CB20♂), te iduće jutro kontroliramo prisutnost vaginalnog plaka. Ženke s evidentiranim prisustvom plaka odvajaju se u poseban kavez. Isti dan (prije perioda tame u vivariju) stavljamo na parenje ženke (F1) s vazektomiranim mužjacima (F1) koje će nam služiti kao primateljice (akceptorice) blastocista.

Iduće jutro kontroliramo prisustvo vaginalnog plaka. Pozitivne ženke odvajamo u poseban kavez. Nakon 3,5 dana od rasploda pozitivne donorice uzimamo za izolaciju blastocista.

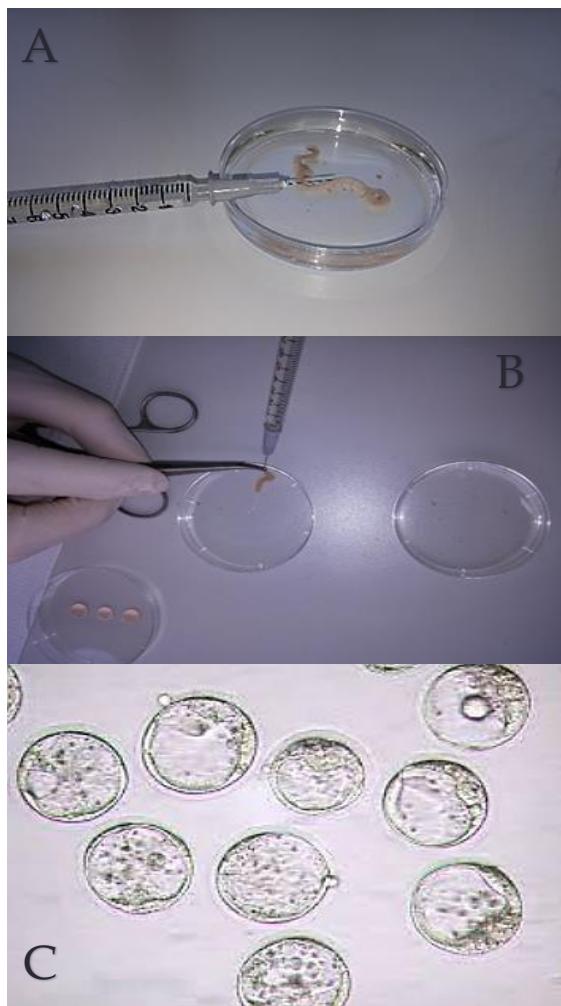


Slika 4. Crvenim krugom označen je pozitivni vaginalni plak donorice

Izolacija blastocista

Blastociste su razvojni oblik zametnih stanica miša te nastaju 3,5 dana nakon oplođenje u uterusu mišice. Postupak izolacije blastocista izvodi se tako da se pozitivne CB20 mišice eutanaziraju metodom cerebralne dislokacije. Mjesto reza na koži dezinficira se 75% etanolom, trbušna šupljina se otvori i maternica se izolira u cijelosti (oba roga maternice sa cerviksom).

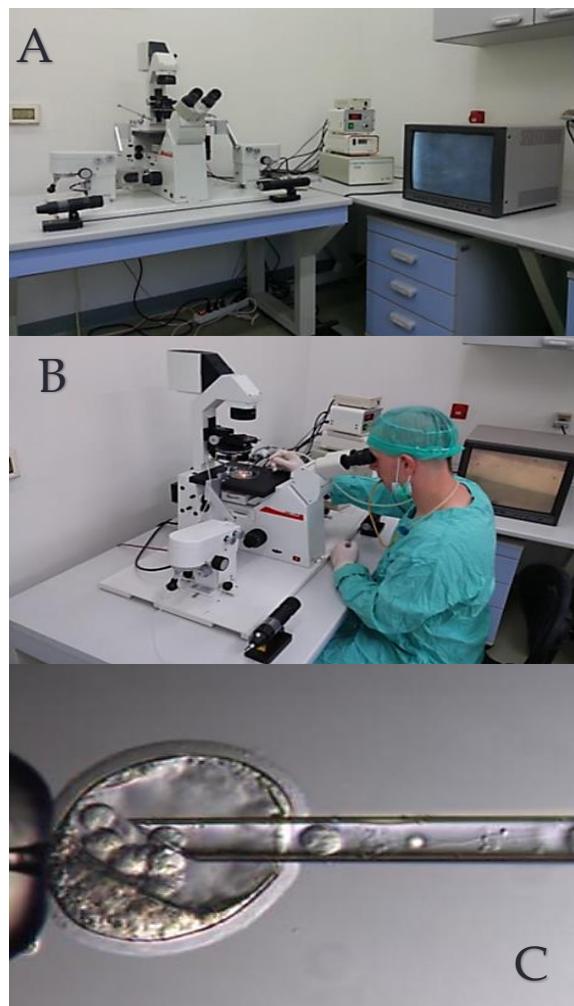
Izvađena maternica se dobro očisti od masnog tkiva, položi u Petrijevu zdjelicu te se oba roga isperu s 1 ml medija za blastociste. Blastociste lociramo pod lupom te ih pokupimo s pripremljenom pipetom pazeći da uzmemmo što manje medija (Slika 5).



Slika 5. Izolacija blastocista; A) izolacija maternice; B) ispiranje rogova maternice C) izolirane blastociste miša

Mikroinjiciranje

Nakon skupljanja blastociste u kapilaru, prebacujemo je u prethodno pripremljen „bunarić“ (1 ml M2 medija prekriven sa mineralnim uljem u poklopcu male Petrijeve zdjelice) (slika 6). Jako je bitno da su nam blastociste smještene na 1/3 površine medija kako bismo imali drugu trećinu za mikroinjiciranje i 1/3 za odlaganje injiciranih blastocista.



Slika 6. Mikroinjiciranje A) oprema za izvođenje mikro-manipulacije i invertni mikroskop; B) polaganje blastocista u bunarić; C) ubrizgavanje muških „crnih“ stanica sa transgenom u „zonu pelucidu“ blastociste.

Kad smo sve blastociste (CB20 bijele) injicirali stanicama u kojima se nalazi konstruirani konstrukt (C57 Bl/6 crne ili 129 aguti), pokupimo te blastociste u kapilaru te ih isperemo još jednom u M2 mediju kako bi ih isprali od ostataka mineralnog ulja. Sljedeći korak je transfer blastocista u maternicu pseudogravidne (F1) ženke.

Embriotransfer

Blastociste možemo injicirati u jedan rog (do 10 stanica) ili u oba roga (ukupno do 15 stanica) maternice pseudogravidne ženke. Ženka se uvede u opću anesteziju. Operativno mjesto koje se nalazi između rebrenog luka, kralježnice i kuka obrijemo i dezinficiramo etanolom (slika 7.). Napravimo mali otvor ispod kojeg se nalazi maternica, koji se proširi odvajanjem kože od potkožja oko mjesta zarezivanja da ne smeta kod manipulacije.



Slika 7. Priprema pseudogravidne ženke za inokulaciju blastocista

Važan pokazatelj uspješnosti pripremljenosti ženke za prihvatanje stanica je jajnik. Crvene točkice (petehijalno krvarenje kao posljedica ovulacije) označavaju nam broj ovulacija, jer ako ih ne uočimo transfer nećemo ni izvesti, jer uočavanje plaka je vrlo subjektivna metoda procjene pojedinca i u slučaju da je krivo procijenjen, ženka neće biti spremna za prihvatanje blastocista i cijela procedura neće biti uspješna. Zatim zarežemo i

potkožje te lagano izdvojimo maternicu od okolnog masnog tkiva.

Za masni jastučić koji se nalazi iznad jajnika uhvatimo kopčicu (eng. serrafin clip) i položimo preko mišice čime lagano fiksiramo rog maternice. Na vrhu roga napravimo iglom maleni otvor kroz koji uz pomoć aspiratora lagano ispušemo blastociste iz kapilare sa što manje medija. Potom organe vratimo u trbušnu šupljinu, a kožu zašijemo. Operiranu mišicu pažljivo polegnemo u kavez na grijaći jastuk da bi izbjegli pothlađivanje životinje do buđenja iz anestezije. Rezultat cijelog postupka očekujemo nakon 17 do 18 dana. Ako se cijeli postupak odradi uspješno, kao rezultat dobijemo kimerične (dvobojne) miševe (slika 8.).



Slika 8. Primjer kimeričnih miševa

Takve kimerične miševe parimo sa C57Bl/6 miševima te prijenos genetskog materijala kontroliramo PCR-om. Nakon testiranja potomstva na prisutnost željenog gena (50 % će imati mutirani alel, a obično se kod ciljane mutacije mutira samo jedan alel) križamo heterozigote kako bismo dobili homozigote (25 % homozigota, 50% heterozigota i 25% divlji tip.).

Jeste li znali?

KUNIĆ KAO ANIMALNI MODEL U ISTRAŽIVANJU POSTEROLATERALNE SPINALNE FUZIJE

Vladimir Farkaš

Uvod

Bol u slabinskom dijelu kralješnice je vrlo čest simptom, koji se javlja u svim zemljama svijeta, neovisno o razvijenosti i u ljudi svih dobnih kategorija (Hartvigsen i sur., 2018.). Ovaj mišićno-koštani problem ima izuzetno visoku prevalenciju i ponovljivost. Tako će 84% ljudi barem jednom u životu iskusiti bol u slabinskom dijelu kralješnice, dok će 55% ljudi iskusiti najmanje 10 epizoda pojave simptoma kroz životni vijek (Donelson i sur., 2012.).

Liječenje boli u slabinskom dijelu kralješnice se provodi konzervativnim i kirurškim metodama. Posljednjih desetljeća, raste broj kirurških zahvata kao terapije boli slabinskog dijela kralješnice, a operacijske tehnike postaju sve složenije (Deyo i sur., 2010.). Zbog napretka u kirurškoj tehnici, laminektomiju, ranije najčešće izvođenu tehniku, postupno zamjenjuje spinalna fuzija zbog manjeg rizika od nestabilnosti i deformacije kralješka nakon operacije (Bae i sur., 2013.).

Spinalna fuzija

Spinalna fuzija podrazumijeva spajanje dva susjedna kralješka u svrhu prevencije bolnosti kralješnice. Razne tehnike spinalne fuzije su najčešće izvođene operacije kralješnice, i samo u SAD-u, godišnje ih se napravi oko 450 000 (Resnick, 2007.). Od tehnika spinalne fuzije, posterolateralna spinalna fuzija (PLF) je najizvođenija.

Za dugoročnu uspješnost spinalne fuzije, neophodno je da se između segmenata kralješnice stvori čvrsto koštano premoštenje koje će osigurati trajnu imobilizaciju koja je ključna u sprječavanju pojave boli prilikom pokretanja (Young i sur., 2007.). Kako bi se potaklo stvaranje i postiglo što čvršće premoštenje, u spinalnim fuzijama koriste se materijali s osteogenetskim svojstvima (graf materijali). Upravo zbog izraženih osteogenetskih svojstava, uključujući osteokondukciju i osteoindukciju, autograft je najčešće korišteni materijal i predstavlja „zlatni standard“ među graft materijalima (Carlisle i Fishgrund, 2005.).

Upotreba autografa sa sobom nosi neka ograničenja i komplikacije (Tushar i sur., 2002.), a samo njegovo prikupljanje uzrokuje pojavu kronične boli u do 25% pacijenata (Summers i Eisenstein, 1989.). Razmatranje korištenja alografta kao zamjene za autograft nije preporučljivo jer je postotak uspješnosti fuzije značajno manji prilikom korištenja alografta (Jorgenson i sur., 1994.).

Unatoč svim naporima da se unaprijedi operacijska tehnika spinalne fuzije, postotak nesrastanja segmenata kralješnice je i dalje visok te, ovisno o studijama, prosječno iznosi oko 30% (Sandhu i Khan, 2002.; Valdes i sur., 2007.). Nadalje, uspjeh revizijskih operacija je vrlo nizak (Farrar i sur., 2001.). Navedene komplikacije, u kombinaciji sa visokom učestalosti nesrastanja, razlog su kontinuiranog napora istraživača da pokušaju naći alternative materijale kako bi unaprijedili postojeće metode. U tim nastojanjima, od iznimnog je značaja korištenje animalnih modela.

Model PLF u kunića

Animalni modeli se koriste kako bi dokazali koncept te provjerili izvedivost i učinkovitost pokusnih materijala i metoda (Sandhu i Khan, 2002.). Od početka 20-tog stoljeća, kada je pas korišten kao prvi animalni model spinalne fuzije (Albee, 1913.), mnoge druge vrste su korištene i mnogi animalni modeli su razvijeni za istraživanje spinalne fuzije.

Odabir animalnog modela često predstavlja kompromis. U tom kompromisu, s jedne strane su animalni modeli s boljom podudarnošću s ljudskom anatomijom, fiziologijom i biomehanikom, ali sa sobom nose druge poteškoće poput etičkih briga, visoke cijene itd. (npr. primati) dok su s druge strane modeli koji imaju druge prednosti, poput lage manifikacije i održavanja, niske cijene držanja, manjih etičkih briga itd. (npr. glodavci). Kunić kao pokusna životinja je zadovoljio

mnoge kriterije navedenog kompromisa i s vremenom je postao najvažniji animalni model korišten za istraživanja spinalne fuzije.

Trenutni PLF model kunića je uspostavio Boden i sur. (1995.) i od tada je PLF postala najčešće korištena tehnika na kuniću kao modelu za spinalnu kirurgiju (Drespe i sur., 2005.). Dvije glavne odlike tog modela su repliciranje humane PLF tehnike i postotak nesrastanja kralješaka vrlo sličan onome u ljudi (Virk i sur., 2016.). Druge tehnike spinalne fuzije, poput anteriorne cervicalne, torakalne i lumbalne su samo sporadično opisane u kunića (Karaismailoglu i sur., 2002.).

Zahvat ima za cilj izložiti dorzalne površine poprečnih nastavaka slabinskih kralješaka od interesa (najčešće L4-L6) kako bi se ugradio graft materijal. Treba napomenuti da kunić ima 7 slabinskih kralješaka, za razliku od čovjeka koji ima 5. Inicijalni medijani rez na koži radi se na razini kralješaka od interesa uz proširenje na razinu jednog kralješka više u kranijalnom i kaudalnom smjeru.

Nakon otvaranja kože, paramedijano se otvara fascija i tupo se ispreparira prostor između M. multifidus i M. longissimus thoracis da se prikažu poprečni nastavci slabinskih kralješaka od interesa i njihova intratransverzalna membrana. Prije ugradnje graft materijala, dorzalne površine poprečnih nastavaka se dekorticiraju (ukloni se kortikalna kost i izloži koštana srž) kirurškom bušilicom. Nakon ugradnje graft materijala

između dva dekorticirana poprečna nastavka, rana se zatvara po slojevima.

Riordan i sur. (2013.) su objavili opsežnu meta-analizu o pouzdanosti Bodenovog modela PLF u kunića, analizirajući 56 publikacija u razdoblju od 1995. do 2011., koje uključuju 733 kunića. Stavljujući u korelaciju uspješnost fuzije i neke karakteristike kunića, donijeli su zaključake bitne za uspješnu provedbu PLF modela u kunića: 1) uspješnost fuzije je veća u ženki nego u mužjaka, ali razlika nije značajna, 2) nema značajne razlike u uspješnosti fuzije između kunića koji su naučeni na ljudsku manipulaciju i koji to nisu, 3) pronađena je značajna razlika između mase životinje i uspješnosti spinalne fuzije odnosno životinje mase manje od 3 kg pokazivale su manju uspješnost fuzije, 4) nema značajne razlike u uspješnosti fuzije između soja New Zeland White i Japanese White i 5) iako nije bilo značajne razlike između raznih starosnih skupina, preporuča se korištenje životinja starijih od 6 mjeseci.

Kao nadogradnju Bodenovog modela PLF u kunića, Grauer i sur. (2004.) su razvili „model spinalne pseudoartroze u New Zealand White kunića“. Taj model je logičan nastavak primarnog PLF modela jer, kao što je ranije navedeno, postotak nesrastanja u modelu PLF-a je visok i adekvatan animalni model je bio potreban za istraživanje te česte komplikacije. Taj model se temelji na dobro poznatom i ranije opisanom inhibitornom učinku nikotina na uspješnost spinalne fuzije (Silcox, 1995). U Grauerovom modelu, životinje su podvrgнуте standardnoj PLF

tehnici (Boden i sur., 1995.), ali uz aplikaciju nikotina u svrhu povećavanja šanse za nesrastanjem, odnosno za razvojem pseudoartroze.

Literatura

- Albee F. (1913) An experimental study of bone growth and the spinal bone transplant. JAMA 60:1044.
- Bae, H.W., S.S. Rajaee, L.E. Kanim (2013) Nationwide trends in the surgical management of lumbar spinal stenosis. Spine (Phila Pa 1976) 38:916-926.
- Boden, S.D. Schimandle J.H., Hutton W.C. (1995) An Experimental Lumbar Intertransverse Process Spinal Fusion Model: Radiographic, Histologic, and Biomechanical Healing Characteristics. Spine 20(4):412-420.
- Carlisle, E., Fischgrund J.S. (2005) Bone morphogenetic proteins for spinal fusion Spine J 5:240-249.
- Deyo, R.A., Mirza S.K., Martin B.I., Kreuter W., Goodman D.C., Jarvik J.G. (2010) Trends, major medical complications, and charges associated with surgery for lumbar spinal stenosis in older adults. JAMA 303:1259-1265.
- Donelson, R., McIntosh G., Hall H. (2012) Is it time to rethink the typical course of low back pain? PM R. 4(6):394-401.
- Drespe, I.H., Polzhofer, G.K., Turner A.S., Grauer J.N. (2005) Animal models for spinal fusion. Spine J 5:209-216.
- Farrar, J.T., Young J.P., LaMoreaux L., Werth J.L., Poole R.M. (2001) Clinical importance of changes in chronic pain intensity measured on an 11 point

- numerical pain rating scale. Pain 94:149–158.
- Grauer, J.N., Vaccaro, A.R. Kato, M. Kwon B.K., Beiner J.M., Patel T.C., Hilibrand A.S., Chiba, K. Albert, T.J. (2004) Development of a New Zealand white rabbit model of spinal pseudarthrosis repair and evaluation of the potential role of OP-1 to overcome pseudarthrosis. Spine (Phila Pa 1976) 29(13):1405-1412.
- Hartvigsen, J., Hancock M.J., Kongsted A., Louw, Q.. Ferreira M.L, Genevay, S. Woolf A. (2018) What low back pain is and why we need to pay attention. The Lancet, 391(10137): 2356-2367.
- Jorgenson, S.S., Lowe T.G., France, J. Sabin J. (1994) A prospective analysis of autograft versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient. A minimum of 1-year follow-up in 144 patients. Spine 19:2048-2053.
- Karaismailoglu, T.N., Tomak Y., Andac A. (2002) Comparison of autograft, coralline graft, and xenograft in promoting posterior spinal fusion. Acta Orthop Traumatol Turc 36:147–154.
- Resnick, D.K. (2007) Evidence-based spine surgery. Spine (Phila Pa 1976)32(11):S15-9.
- Riordan, A.M., Rangarajan R., Balts J.W., Hsu W.K., Anderson P.A. (2013) Reliability of the rabbit postero-lateral spinal fusion model: A meta-analysis. Send to J Orthop Res. 31(8):1261-1269.
- Sandhu, H.S., Khan S.N (2002.): Animal Models for Preclinical Assessment of Bone Morphogenetic Proteins in the Spine. Spine 27(16):32-38.
- Silcox, O.H., Oaftari T., Boden S.D., Schimandle J.H., Hutton W.C., Whitesides T.E. (1995) The effect of nicotine on spinal fusions. Spine 20:1549-1553.
- Summers, B.N., Eisenstein S.M. (1989) Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. J Bone Joint Surg 71: 677-680.
- Tushar, Ch.P., Grauer, J.N. Erulkar J.S. (2002) Evaluation of OP-1 in a rabbit model of lumbar fusions. U: Bone Morphogenetic Proteins From Laboratory to Clinical Practice (Slobodan Vukicevic, Kuber Sampath, ur.) Springer Basel AG, str. 207-222.
- Valdes, M., Moore D.C., Palumbo M., Lucas P.R., Robertson A., Appel J., Ehrlich M.G., Keeping H.S. (2007) rhBMP-6 stimulated osteoprogenitor cells enhance posterolateral spinal fusion in the New Zealand white rabbit. The Spine Journal 7:318–325.
- Virk, S.S., Coble, D. Bertone A.L., Hussein H.H, Khan S.N. (2016) Experimental Design and Surgical Approach to Create a Spinal Fusion Model in a New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) J Invest Surg 30(4):226-234.
- Young, P.M., Berquist T.H., Bancroft L.W., Peterson J.J. (2007) Complications of spinal instrumentation. Radiographics 27:775-789.

Jeste li znali?

RETROAKTIVNA PROCJENE PROJEKTA

Branka Buković Šošić

Uvod

Svrha retroaktivne procjene (RP) je:

- procijeniti u kojoj mjeri su izvorne pretpostavke, uključujući težine pokusa, bile točne u vrijeme prijave projekta nadležnom tijelu u svrhu odobrenja
- procijeniti mogu li se identificirati dodatne 3R strategije u okviru projekta te kako se mogu uključiti u buduća istraživanja i
- povećati transparentnost prema javnosti, ako se retroaktivna procjena objavi.

Retroaktivne procjene projekata služe za potrebe poboljšanja dobrobiti korištenih životinja, kao i poboljšanje etike, kvalitete znanosti i upravljanja projektima.

Zakonodavni okvir

1. Zakon o zaštiti životinja (Narodne novine, broj 102/17)
2. Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine, broj 55/13 i 39/17) (u dalnjem tekstu: Pravilnik)
3. Direktiva 2010/63/EU Europskoga parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o

zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe

4. Project Evaluation and Retrospective Assessment, DG Environment, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm

Zahtjevi zakonodavstva

Retroaktivnoj procjeni moraju biti podvrgnuti svi projekti:

- a) koji koriste primate koji ne uključuju čovjeka
- b) koji uključuju pokuse razvrstane kao »teške« (Razvrstavanje projekata po težini je u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine, broj 55/13 i 39/17))
- c) u kojima bi se prouzročila jaka bol, patnja ili tjeskoba, a za koje je vjerojatno da bi bili dugotrajni i da ih nije moguće olakšati, uključujući pokuse u skladu sa zaštitnom klauzulom iz članka 50. Pravilnika.

Koristi od retroaktivne procjene

Retroaktivna procjena daje priliku:

- da se sagledaju rezultati projekta u usporedbi s postavljenim ciljevima i, prema potrebi, razlozi zbog kojih ti ciljevi nisu postignuti
- da se usporede stvarne štete koje su uzrokovane životinjama u odnosu na štete predviđene u prijavi projekta
- da se usporedi stvarni broj upotrijebljenih životinja u odnosu na

procjenu i razmatranje razloga zbog kojih je došlo do promjena

- za prepoznavanje poboljšanja u budućim istraživanjima
- da se u slučaju da je tijekom istraživanja nešto pošlo po zlu analiziraju razlozi za to i izvuku pouke
- nadležnom tijelu za provjeru učinkovitosti procjene projekta/analizu šteta i koristi, čime se pruža sredstvo za osiguranje kvalitete i poboljšanje dosljednosti
- za povećanje transparentnosti i odgovornosti, posebno ako se objave rezultati RP
- za širenje informacija o ishodu projekta bez obzira na rezultate jer se time:
 - omogućuje bolje osmišljavanje sličnih istraživanja
 - podiže svijest o primjerenoj upotrebi životinja i najboljoj praksi
 - podiže svijest o neprimjerenoj upotrebi životinja i tako pridonosi načelu smanjenja
 - sprječava ponavljanje istih problema/pogrešaka i
 - pomaže nadležnom tijelu da preispita učinkovitost procjene projekta/analize šteta i koristi.

Isto tako je važno i objavljivanje rezultata retroaktivne procjene za takozvane „negativne rezultate“ (studije kojima nisu dokazane prvotne hipoteze) jer se time povećava baza znanja, smanjuju rizici i neopravdana udvostručivanja sličnih studija te usmjeravaju buduća istraživanja.

Čimbenici koji se uzimaju u obzir da bi se utvrdilo treba li provesti retroaktivnu procjenu:

- a) prilikom uvođenja novih modela ili novih istraživačkih područja
- b) pri značajnoj nesigurnosti u pogledu ishoda ili učinaka na životinje, npr. stvaranje ili uzgoj određenih genetički izmijenjenih linija
- c) u zakonodavnom (regulatornom) kontekstu, upotreba novih klasa spojeva za koje postoji malo osnovnih podataka, znanja ili iskustva
- d) projekti u svrhu obrazovanja ili ospozobljavanja.

Ako je riječ o projektima za koje se tijekom provođenja utvrdi da je težina pokusa veća od predviđenih (ako već nisu prepoznati kao takvi u prvotnom postupku odobravanja projekta), osoba odgovorna za provođenje projekta isto mora prijaviti nadležnom tijelu koje je odobrilo projekt kako bi se izmijenilo odobrenje projekta i dopustio nastavak (takvi se projekti označuju kao oni za koje je potrebna retroaktivna procjena).

Kada provesti retroaktivnu procjenu?

Retroaktivna se procjena provodi po završetku projekta. Primjerice, neke od elementa kojima se procjenjuje „jesu li postignuti ciljevi projekta“, moguće je koristiti tek po završetku projekta.

Retroaktivnu procjenu provodi nadležno tijelo koje na temelju potrebne dokumentacije koju je dostavio korisnik u svrhu odobravanja projekta procjenjuje je li i kada je potrebno provesti retroaktivnu procjenu projekta.

Kako osigurati informacije potrebne za provođenje retroaktivne procjene

Kako je u nekim slučajevima najprimjereniye vrijeme za provođenje retroaktivne procjene znatno nakon završetka projekta, od ključne je važnosti razmotriti uspostavu mehanizama kojima se osiguravaju potrebne informacije za retroaktivnu procjenu.

Iako je primarna odgovornost i dalje na korisniku, određenu odgovornost treba snositi i osoba odgovorna za cjelokupno provođenje projekta, a u svrhu osiguranja potrebnih informacija. Unutar procesa RP projekta potrebno je osigurati mogućnost određene fleksibilnosti, primjerice dostava stalnih/periodičnih povratnih informacija (npr. kroz publikacije, mogućnosti poboljšanja), posebno ako je riječ o dugotrajnim projektima (koji mogu trajati i do pet godina).

U svrhu ostvarivanja proporcionalnosti RP primjenjuju se kriteriji slični onima koji su utvrđeni za procjenu projekta. Informacije potrebne za RP projekta dobivaju se s lokalne razine, gdje su dostupne sve osobe koje su uključene u projekt, gdje postoji pristup svim važnim informacijama i mogu se pravodobno uvesti poboljšanja tijekom provođenja projekta, kao i od svih mjerodavnih osoba - onih uključenih u projekt i onih odgovornih za skrb o životinjama i njihovu dobrobit.

Za prikupljanje informacija razvijen je obrazac s već utvrđenim pitanjima kojemu se može pristupiti na

stranicama Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane na poveznici: <http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=64> Obrazac za dostavu podataka za provođenje retroaktivne procjene projekta. Takav je obrazac koristan za pripremu materijala za RP projekta kao i za osobe koje pregledavaju materijale.

Istraživači bi trebali dobiti povratne informacije kako bi u budućim istraživanjima mogli uvesti poboljšanja/promjene.

Smjernice o zahtjevima za informacijama potrebnim za RP

Za retroaktivnu procjenu projekta potrebno je dostaviti informacije o:

1. tome jesu li ostvareni ciljevi projekta
2. štetama koje su nanesene životinjama, uključujući broj i vrste upotrijebljenih životinja i težini pokusa te
3. svim elementima koji mogu doprinijeti poboljšanju provedbe zahtjeva za primjenu načela 3R (zamjene, smanjenja i poboljšanja).

Rezultati koje treba postići retroaktivnom procjenom:

1. Povratne informacije istraživačkoj skupini

Osoba (osobe) koja provodi RP treba bi korisniku dostaviti povratne informacije o pitanjima proizišlim iz postupka procjene. To može uključivati prijedloge za daljnja poboljšanja i

preporuke o širenju ključnih informacija.

2. Širenje informacija o upotrebi životinja i načelu 3R (i pozitivnih i negativnih)

1. unutar objekta

2. promicanje publikacija i prezentacija istraživača/korisnika

3. uloga Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe iz članka 36. Zakona u razmjeni najboljih praksi pri širenju informacija

4. prepoznavanje, prikupljanje i objavljivanje ključnih pitanja proizašlih iz retroaktivne procjene.

3. Ažurirane informacije o netehničkim sažecima projekata

Ažuriranjem informacija o netehničkim sažecima projekata poboljšava se transparentnost u pogledu stvarnih šteta i koristi povezanih s upotrebom životinja u znanstvene svrhe. Učinak se može poboljšati ažuriranjem netehničkog sažetka projekta nakon što se provede retroaktivna procjena projekta.

4. Dobivene informacije se mogu iskoristiti pri razmatranju učinkovitosti procjene projekta i pri osposobljavanju procjenitelja projekata i osoba koje provode retroaktivnu procjenu.

Ključni su ciljevi tih procesa osigurati da se znanstveni pokusi na životnjama provode jedino:

1. kad su valjano obrazloženi

2. kad ne postoje alternative korištenju životinja

3. kad se upotrebljava minimalan broj životinja i

4. tijekom pokusa se nanosi životnjama najmanju bol, patnju, tjeskobu ili trajna oštećenja

u skladu sa znanstvenim potrebama, uzimajući u obzir etička načela te postojanje sustava preispitivanja kako bi se osigurala stalna usredotočenost na poboljšanje načela 3R.

Korisne poveznice:

1. Europska komisija (DG Environment):

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm

2. Preporuke Europske komisije:
ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm

3. Vodič za procjenu projekta i retroaktivnu procjenu:
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/project_evaluation/hr.pdf

Dogadanja

3. ZNANSTVENO-STRUČNI SIMPOZIJ CROLASA-e I 2. ZAJEDNIČKI SKUP CROLASA-e I SLAS-a S MEĐUNARODNIM SUDJELOVANJEM "POKUSNE ŽIVOTINJE U ZNANSTVENIM ISTRAŽIVANJIMA"

Dubravka Švob Štrac

U organizaciji Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA) i u suradnji sa Slovenskim društvom za laboratorijske živali (SLAS), 25. i 26. listopada 2018. godine u Dvorani Matice hrvatske na Strossmayerovom trgu 4 u Zagrebu održan je Treći znanstveno-STRUČNI simpozij CroLASA-e i 2. zajednički skup CroLASA-e i SLAS-a s međunarodnim sudjelovanjem pod nazivom «Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima».

Organizacijski odbor Simpozija činili su Sofia Blažević, Julija Erhardt, Vladimir Farkaš, Damjan Franjević, Maja Lang Balija, Maja Lazarus, Andreja Prevendar Crnić, Blanka Smolić, i Dubravka Švob Štrac.

Znanstveni odbor Simpozija sačinjavali su Srećko Gajović, Andrea Gudan Kurilj, Marija Heffer, Dubravka Hranilović, Nataša Jovanov Milošević, Simona Kranjc, Valentina Kubale Dvojmoč, Nada Oršolić, Martina Perše, Tatjana Pirman, Bojan Polić, Damir Sapunar, te Ranko Stojković. Službeni jezici Simpozija bili su hrvatski i engleski jezik.



Simpozij je otvorila 25. listopada 2018. godine predsjednica CroLASA-e dr. sc. Julija Erhardt, zahvalila se organizacijskom i znanstvenom odboru kao i svim prisutnim sudionicima skupa, te napomenula da se ovaj skup održava na 40. obljetnicu postojanja FELASA-e. Dr. sc. Julija Erhardt ukratko je predstavila dosadašnji rad i način djelovanje FELASA. Okupljene je potom pozvala i predsjednica SLAS-a dr. sc. Martina Perše, koja je izrazila zadovoljstvo načinom suradnje naših dvaju društava.

Službeni program započeo je sekcijom u kojoj su dominirala predavanja o novim animalnim modelima i načinima njihovog korištenja u biomedicinskim istraživanjima.



Sekcija je otvorena izvrsnim plenarnim predavanjem prof. dr. sc. Bojana Polića „Nova uloga starog igrača: IFNy posredovana komunikacija imunološkog i endokrinog sustava kod virusnih infekcija“ koje je potaklo zanimljivu raspravu o kompleksnoj uzajamnoj povezanosti virusne infekcije, imunološkog odgovora, dijabetesa i pretilosti.

Slijedilo je također zanimljivo predavanje prof. dr. sc. Srećka Gajovića pod naslovom „Multimodalno oslikavanje kao važan alat za poboljšanje pretkliničkih studija ishemijskog moždanog udara kod miša“. U predavanju su predstavljeni najnoviji rezultati dobiveni primjenom multimodalnog pristupa koji je kombinirao bioluminiscenciju i MRI na MCAO modelu ishemijskog moždanog udara u genetski modificiranih miševa bez funkcije Tlr2 gena.

Prva sekcija završila je predavanjem dr. sc. Vladimira Farkaša „PET oslikavanje u istraživanju animalnih modela“ u kojem su ukratko opisani PET instrumentacija, osnovni principi snimanja PET-om, planiranje PET eksperimenta, obrada slike i podataka

dobivenih PET-om, te primjeri primjene PET snimanja u životinjskim modelima.

Druga sekcija započela je predavanjem dr. sc. Marijane Popović Hadžija „In vivo i in vitro modeli u istraživanju šećerne bolesti“ u kojem je predavačica najprije dala kratki pregled saznanja o dijabetesu, a zatim se fokusirala na mišje modele, s posebnim naglaskom na novu metodu za analizu urina, te preliminarne rezultate dobivene korištenjem Caco-2 stanične linije.

Slijedilo je predavanje doc. dr. sc. Kristine Pilipović „Eksperimentalni modeli traumatske ozljede mozga“, koje je dalo pregled, te kritičku analizu trenutno najčešće korištenih modela traumatske ozljede mozga (TBI), uključujući in vivo i in vitro pristupe u eksperimentalnom istraživanju TBI. Osim toga, predavačica je prikazala novije rezultate vlastitog istraživanja na različitim TBI modelima.



U predavanju dr. sc. Simone Kranjc, iz Slovenije „Genska terapija u modelu animalnih tumora“ mogli smo čuti o efikasnim metodama unosa genetskog materijala bez primjene virusa, posebice o elektroporaciji i

imunološkim aspektima prilikom terapije animalnih solidnih tumora.

Dr. sc. Željka Večerić Haler održala je predavanje pod nazivom „Terapija matičnim stanicama u životinjskom modelu ozljede bubrega - pretklinička obećanja i izazovi za transplantaciju“. U okviru predavanja predavačica je kritički sumirala rezultate transplantacije mezenhimalnih matičnih stanica u životinjskim modelima ozljede bubrega, istaknula najnovije dokaze iz kliničkih ispitivanja u tijeku i izrazila zabrinutost temeljenu na iskustvu vezano za translaciju rezultata transplantacije MSC-a sa životinjskih modela u kliničku terapiju zatajenja bubrega.

Posljednje predavanje u drugoj sekciji održao je prof. dr. sc. Domoagoj Đikić. U okviru njegovog predavanja „Metabolički sindrom, lipidna fiziologija - animalni i alternativni modeli“ predstavljeni su najčešće životinjski modeli (prehrambeni, genetski, epigenetski) korišteni u istraživanjima metaboličkog sindroma i lipidne fiziologije te primjeri mogućih alternativnih istraživačkih modela. Prikazan je i primjer usporedbe *in vivo* i *in vitro* modela u istraživanjima sinergističkog učinka akumulacije kolesterola i oksidativnog stresa u neurodegenerativnim bolestima.

Treća sekcija započela je uvodnim riječima gosp. Hrvoja Komca, direktora MMK trgovine koja je bila zlatni sponzor Simpozija, nakon čega je gosp. Carlo Demalde, predstavnik tvrtke Tecniplast & IWT održao predavanje

pod naslovom „Napredna rješenja za nastambe laboratorijskih životinja“ na kojem je predstavio najnovije proizvode za uzgoj i držanje laboratorijskih životinja.



Slijedilo je predavanje dr. sc. Igore Slivca „3R - Tehnologija životinjskih stanica - dosezi i izazovi“ u kojem smo mogli čuti o 3 glavna stanična modela, uspostavljena kao 2D ili 3D kultura stanica, a koja su široko primijenjena i u istraživanju i tehnologiji: primarne stanice, imortalizirane stanične linije i matične stanice.

Još jedno predavanje u sekciji posvećenoj 3R pristupu bilo je predavanje „Primjer 3R pristupa na modelu *D. melanogaster*: ispitivanje neurogenetike ovisnosti o psihostimulansima“ koje je održala prof. dr. sc. Rozi Andretić Waldovski. Predavačica je dala prikaz uporabe *D. melanogaster* u istraživanjima koja imaju za cilj definirati neurogenetske mehanizme koji su temelj razvoja ovisnosti o psihostimulansima, kokainu i metamfetaminu. Također je pokazala kako su studije usmjerene na određivanje kako geni utječu na promjenu ponašanja nakon izlaganja psihostimulansa kod *D. melanogaster*.

dobar primjer kako primjena principa 3R ne ograničava tipove ili ishode studija koji doprinose razumijevanju složenih poremećaja ponašanja u ljudi.

Nakon sekcije posvećene 3R pristupu slijedila je poster sekција na kojoj je su u okviru 16 postera kratko predstavljeni najnoviji rezultati istraživanja koja su uključivala laboratorijske životinje.

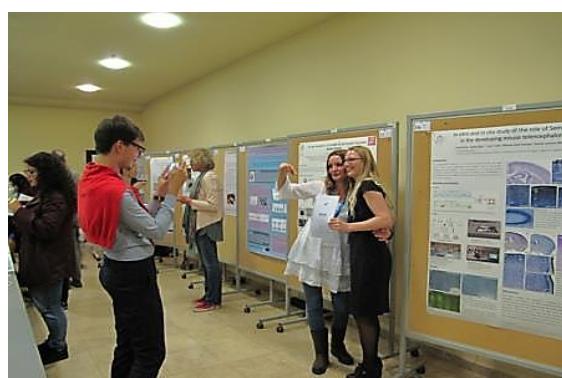


U posljednjoj sekciji prvog dana Simpozija mogli smo čuti predavanje dr. sc. Martine Perše pod naslovom „Standardi u znanstvenim istraživanjima“ Predavanje je saželo recentnu literaturu o temi i istaknulo standarde u istraživanjima na životinjama s ciljem obraćanja pažnje na načelo 3R, kao i na čimbenike koji utječu na ponovljivost studija i transparentnost izvješćivanja u skladu s ARRIVE smjernicom ili zlatnim standardnim popisom za objavljivanje.

Nakon toga, predavanje pod naslovom „Odabrani primjeri spontane patologije i patologije starenja kod GEMs, NSG i NOD miševa“ održala je prof. dr. sc. Andrea Gudane Kurilj- U predavanju su prikazani primjeri očekivanih fenotipova patologije, kao i uzroka ili

čimbenika smrti životinja posebno za sojeve kao što su C57BL/6, 129 i FVB/N zbog njihove aktualne relevantnosti i sveprisutnosti u pozadini genetski modificiranih miševa. Također su prikazani primjeri spontanih infekcija, spontanih post-transplantacijskih poremećaja i patologije starenja za NSG i NOD miševe koji se smatraju za „zlatni standard“ domaćina za ksenotransplantacijske pokuse.

Slijedilo je predavanje gosp. Petera Hepburna iz tvrtke Animal Care Systems pod naslovom „Unapređenje standarda u držanju laboratorijskih životinja na primjeru glodavaca“. Prvi dan Simpozija završio je dodjelom nagrade za najbolju postersku prezentaciju koju je tročlano povjerenstvo dodijelilo Sari Trsnki za postersku prezentaciju „A non-invasive rat model of perinatal hypoxic brain lesion“, te ugodnim druženjem uz glazbu, vino i sir.



Drugi dan Simpozija započeo je predavanjem prof. dr. sc. Dore Zelene iz Mađarske „Opto- i farmakogenetski pristupi u animalnim modelima“. U okviru predavanja sažete su kritične točke koje se odnose na opto- i farmakogenetsku manipulaciju

specifičnog područja mozga kod mutiranih miševa. Predavanje je naglasilo da su potrebni detaljni preliminarni pokusi i brojne kontrolne skupine kako bi se izabrao najbolji vektor i protokol i osiguralo da mutirane životinje nemaju specifičan fenotip, koji može utjecati na ispitivano ponašanje.

Zatim je mr. sc. Branka Buković Šošić iz Ministarstva poljoprivrede održala predavanje pod naslovom „Retroaktivna procjena pokusa“, u kojem je objasnila zašto je retroaktivna procjena pokusa važna za dobrobit životinja, etiku, kvalitetu znanosti i upravljanje projektima.

Dr. sc. Daša Ševeljević Jaran u predavanju „Razvrstavanje pokusa po bolnosti“ naglasila je kako se klasifikacija težine pokusa koristi za klasificiranje štetnih posljedica na životinje korištene u znanstvene svrhe, pri čemu je potrebno razmotriti: što se radi s životinjom, s kojim učinkom, koliko patnje može uzrokovati i koja poboljšanja mogu biti uključena.

Posljednje predavanje u ovoj sekciji održala je dr. sc. Tatjana Priman pod nazivom „Utjecaj različitih načina rukovanja na razvoj anksioznosti kod laboratorijskih miševa“. U svom predavanju predavačica je pokazala kako korištenje novih alternativnih metoda rukovanja primjenom tunela i otvorenih ruku može smanjiti tjeskobu, stres i nelagodu kod laboratorijskih miševa.

U sljedećoj sekciji prvo predavanje je nosilo naziv „Uloga optineurina u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi“, a održala ga je doc. dr. sc. Ivana Munitić. Rezultati prikazani u predavanju otvaraju mogućnost da poremećaj optineurin/ BK1-posredovane IFN-β osi dovodi do imunološkog zatajenja, što može predisponirati neurodegeneraciji, odnosno amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi.



Zatim je Kaja Blagotinšek Cokan održala predavanje „Modeli transgeničnih miševa i alternativni pristup za proučavanje bezalkoholne bolesti masnih i hepatocelularnog karcinoma“ u kojem je predstavila sistemski pristup u istraživanju ovih bolesti s posebnim naglaskom na transgenične miševe, izolirane hepatocite i dizajniranu imortaliziranu staničnu liniju hepatocita.

Posljednje predavanje na Simpoziju održao je Milan Kopeček iz tvrtke FUJIFILM VisualSonics, Inc pod naslovom „Photoacoustic and Microutrasound Imaging in preclinical research with the Vevo LAZR System: Principles and Applications“ u kojem je predstavio najnovija tehnička

dostignuća iz područja *in vivo* biološkog oslikavanja.

Nakon toga Simpozij je službeno zatvorila predsjednica CroLASA-e dr. sc. Julija Erhardt pri čemu se posebno zahvalila i sponzorima Simpozija: tvrtkama MMK trgovina, Techniplast, KFTechnology, Idexx, Charles River, Animal Care Systems, Bia, Dechra i FUJIFILM VisualSonics, te je najavila edukacijsku radionicu „Workshop on the severity classification and reporting under EU directive 2010/63/EU“.

Radionica je organizirana uz pomoć Ministarstva poljoprivrede, Odjela za dobrobit životinja, a vodili su je David Anderson i David Smith koji su u okviru FELASA-ine radne skupine intenzivno radili na izradi smjernica procjene težine pokusa, koje su postale i temeljni dio dizajna i provođenja pokusa, kao i dio redovitog statističkog izvješćivanja. Radionica se je sastojala od predavanja, studija slučaja i grupnog sudjelovanja, te rasprava. Radionica je bila besplatna za sudionike Simpozija te za članove Nacionalnog etičkog povjerenstva za zaštitu životinja korištenih u znanstvene svrhe.



Predstavljamo

NAJNOVIJI PRISTUPI U BIHEVIORALNOJ NEUROZNANOSTI: VIDEO PRAĆENJE, ANALIZA HODA I DRUGE TEHNIKE

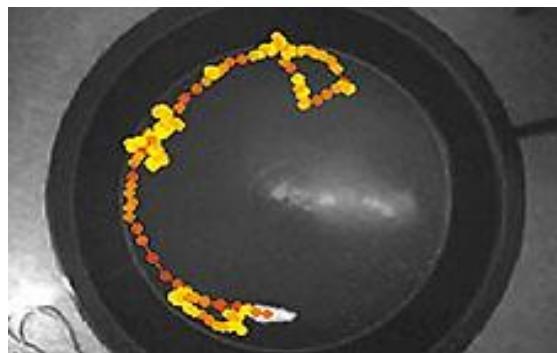
Dubravka Švob Štrac

Na predavanju održanom 16. 01. 2019. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu mr. Albert Willemsen iz tvrtke Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemska, održao je predavanje „State of the art in behavioral neuroscience: video tracking, gait analysis and other techniques“.

U okviru predavanja predstavio je rješenja za video nadzor životinja u različitim testovima ponašanja koji koriste labirinte (mazes), prepoznavanje novog objekta (novel object recognition), kondicionirano preferiranje mjesta (conditioned place preference), otvoreno polje (open field), prisilno plivanje (Porsolt forced swim) kondicioniranje strahom (fear conditioning) i mnogim drugim.

U ovim bihevioralnim testovima koji se primjenjuju za istraživanje učenja, pamćenja, anksioznog i depresivnog ponašanja, vrlo korisno oruđe je program EthoVision XT kojim se može

pratiti aktivnost životinja, prijeđeni put, vrijeme provedeno u određenom području, vrijeme potrebno da životinja dođe do određenog područja, socijalna interakcija, a koji omogućuje automatsko prikupljanje podataka.



Slika 1. EthoVision XT

EthoVision XT se koristi u širokom rasponu područja, uglavnom vezanih za neuroznanost, kao što su toksikologija, farmakologija, psihofarmakologija, otkrivanje lijekova, molekularna biologija, genetika, bhevioralna neuroznanost, ali i u primjenjenoj etologiji i studijama dobrobiti životinja.

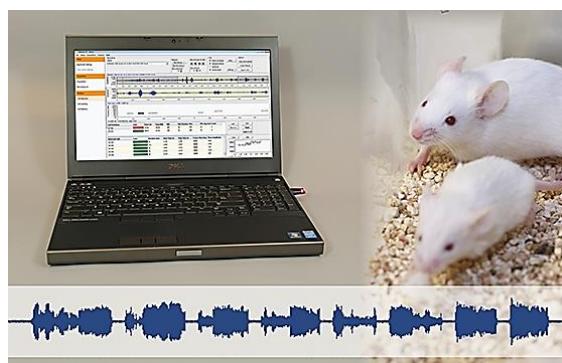
Osim pojedinačnih testova u kojima je kavez u kojem životinja normalno boravi odvojen od aparature za testiranje moguća je i primjena i integrirane testne platforme PhenoTyper u kojoj su te dvije cjeline integrirane. Ovaj sustav omogućuje kontinuirano praćenje sa izazivanjem minimalnih razina stresa jer vodi više računa o bhevioralnoj dinamici, i omogućuje testiranje prilagođeno ritmu životinje i to u prirodnim uvjetima sa niskom razinom stresa. Na taj način mogu se mjeriti lokomotorna aktivnost,

konzumacija vode i hrane, kognicija, anksioznost, kronični stres, deprivacija sna, operantno kondicioniranje itd. te tako unaprijediti interpretaciju podataka jedne domene uzimajući u obzir druge domene. Mjerenja su automatska i izbjegava se rukovanje životnjama pri čemu se štedi vrijeme i smanjuje varijabilnost izazvana utjecajem čovjeka.

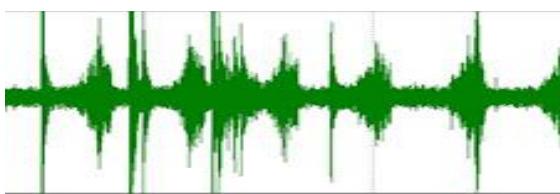


Slika 2. PhenoTyper

Praćenje ultrazvučnog glasanja životinja moguće je primjenom programa UltraVox XT koji omogućuje snimanje čitavog spektra zvukova i prikaz spektrograma u stvarnom vremenu te filtriranje zvukova prema frekvenciji, trajanju, amplitudi i prekidima.

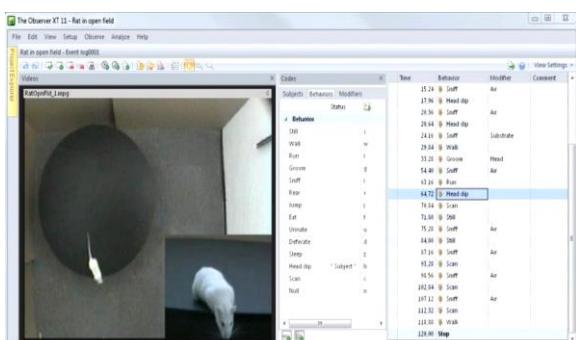


Slika 3. UltraVox XT



Slika 4. Sonogram

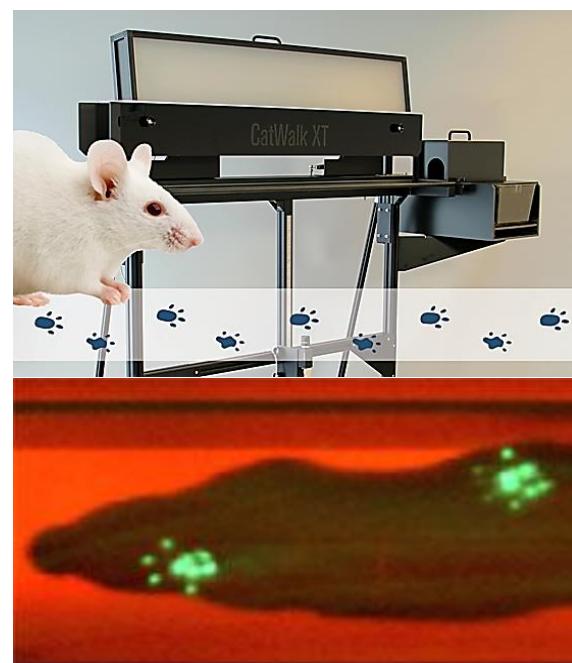
Još jedan vrlo koristan program je Observer XT koji predstavlja manualni program za videoanalizu koji se koristi tamo gdje automacija nije moguća. To je često slučaj kod suptilnih ponašanja (seksualno ponašanje, njega, agresivno ponašanje) ili kod teških uvjeta osvjetljenja.



Slika 5. Observer XT

Hod je vrlo značajni parametar za praćenje. Promjene u hodu mogu biti izazvane promjenama u središnjem ili perifernom živčanom sustavu, mišićima ili kostima, koje mogu biti utjecane sa dobi, genetskim, mehaničkim, kemijskim i drugim čimbenicima. Program CatWalk XT je sustav sa praćenje motoričkih performansi koji omogućuje detaljnu analizu hoda u štakora i miševa i to kod životinja koje dobrovoljno hodaju, a sastoji se od hardvera i softvera koji omogućuje detekciju koraka, odnosno otisaka šapa osvjetljenjem.

Štakor ili miš dobrovoljno prelaze staklenu ploču (prema ciljnoj kutiji), a otisci stopala se bilježe. CatWalk XT vizualizira otiske i izračunava statistiku vezanu za dimenzije ispisa i odnose vremena i udaljenosti između koraka. Analiza hoda CatWalk XT potvrđena je u istraživačkim i eksperimentalnim postupcima za nekoliko (neuroloških) poremećaja i lezija. Primjeri uključuju ozljedu kralježnične moždine i druge ozljede živaca, neuropatsku bol, arthritis, moždani udar, Parkinsonovu bolest, cerebelarnu ataksiju, traumatsku ozljedu mozga, oštećenje perifernih živaca itd.



Slika 6. CatWalk XT

S druge strane ErasmusLadder je cjeloviti sustav za procjenu motoričkih performansi i motoričkog učenja kod miševa. Posebno je zanimljiv za istraživače koji proučavaju mali mozak, cerebelarne poremećaje i ataksiju (npr.

Parkinsonovi modeli). Osim toga dokazano je koristan u mišjim modelima autizma. Ovaj kompletni sustav sastoji se od hardvera i softvera.

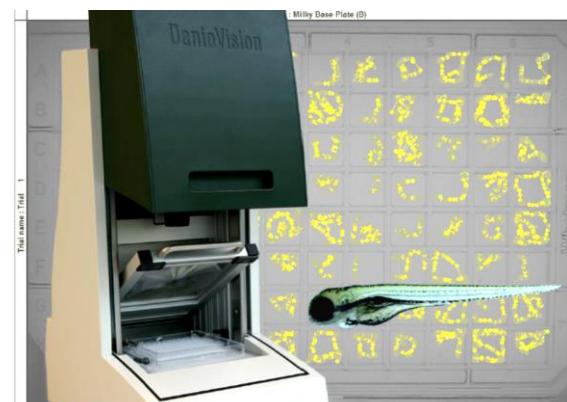
Sam uređaj sastoji se od horizontalnih ljestvi između dvaju ciljnih kutija. Miš prolazi kroz ove ljestve, dok prečke osjetljive na dodir omogućuju sustavu da mjeri vrijeme i duljinu koraka, pogrešne korake, stražnje korake i skokove, dok je funkcioniranje malog mozga testirano u izazovu koji uključuje podizanje barijere tijekom testiranja.



Slika 5. ErasmusLadder

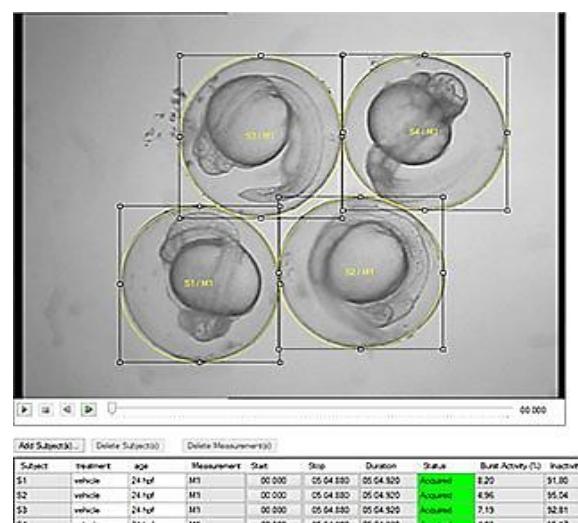
Cijeli niz specijaliziranih rješenja postoji i za video praćenje riba, i to u testovima otkrivanja novog tanka, t-maze testa, društvenog ponašanja (npr. plivanja u jatu), itd. DanioVision je cjeloviti sustav dizajniran za eksperimenate s ličinkama zebrica, a često se koristi u istraživanjima vezanim za razvoj lijekova, farmakologiju, genetiku ponašanja i cirkadijalni ritam. Komora za promatranje sastoji se od 96 bunarčića i omogućuje različite podražaje, kao što su ciklus dana i noći,

tapkanje, gornje svjetlo, optogenetika i još mnogo toga.



Slika 6. DanioVision

DanioScope je program za praćenje parametra embrija i ličinki zebrica, kao što su aktivnost embrija, kardiovaskularna mjerenja, morfologija i protok crijeva i krvi, kao i malformacije. Radi se o izravnom mjerenu na slikama pod mikroskopom. Pogodan je za istraživanja u području embriotoksikologije, farmakologije, razvoja, teratologije, itd.



Slika 7. DanioScope

Najave i zanimljivosti

- 14th FELASA in association with CLASA Congress, 10.-13. 6. 2019., Prag, Česka; <http://www.felasa2019.eu/>
- The LASA Animal Science (Transgenic) Section, Technical Forum: Surgical Techniques and Innovations, 27.-28. 2. 2019., Oxfordshire, UK; <http://www.lasa.co.uk/meetings/>
- 15th Transgenic Technology Meeting (TT2019), 7.-10. 4. 2019., Kobe, Japan; <http://www.tt2019.org/>
- 44th Colloquium of the French Association of Laboratory Animal Science and Technology, 2.-4. 10. 2019., La Rochelle, Francuska; <https://www.colloque-afstal.com/2019/>
- Polish Laboratory Animal Science Association (PolLASA) Congress, 9.-11. 9. 2019.
- Brošura: The German Working Group for Cage Processing in Animal Facilities (2016); <http://www.felasa.eu/announcements/new-cage-processing-in-animal-facilities-brochure>
Dobrobit životinja za pokuse: <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=64>
- EURL- ECVAM: <http://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

Informacije

Ospozobljavanje u području zaštite životinja u znanstvene svrhe u Hrvatskoj: <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=64>

FELASA akreditirani tečajevi: <http://www.felasa.eu/accreditation-board-for-education-training/felasa-accredited-courses2/>

The Fondazione Guido Bernardini (FGB) nudi 2 stipendije za obrazovanje tehničara koji se brinu za životinje u području biomedicinskih znanosti. Rok: 1. veljače 2019.

<https://www.fondazioneguidobernardini.org/en/news/technician-training-scholarship-2019.html>

The Fondazione Guido Bernardini tečajevi

<https://www.fondazioneguidobernardini.org/en/programs.html>

- "Organizing and operating activities in a rodent animal facility" 6.-8. 3. 2019., Milano, Italija
- "Intensive course on Biostatistic" 28.-29. 3. 2019., Milano, Italija
- "Microbiota and gnotobiotic rodents" 4.-5. 4. 2019., Milano, Italija
- "The management of genetically altered rodent colonies" 9.-10. 5. 2019., Milano, Italija
- "Refinements in husbandry of ferrets and pigs" 22.-23. 8. 2019., Hamburg, Njemačka
- "Microbiological monitoring of rodents: traditional and innovative approaches 26.-27. 9. 2019., Milano, Italija
- "Severity and humane endpoints in fish research" 4. 10. 2019., Bergen, Norveška
- "Organizing and operating activities in a laboratory animal facility: II - Critical points and bottlenecks", 21.-22. 11. 2019., Milano, Italija

ON-LINE Charles River Short Course

<http://shortcourse.criver.com/>