

BILTEN

Službeno

glasilo

2020

**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:

Marta Balog
Julija Erhardt
Maja Lang Balija
Gordana Nedić Erjavec
Dubravka Švob Štrac

Bilten izlazi jednom godišnje.

Zagreb, 2020. godina.

Pogled unatrag

30. GODIŠNICA HRVATSKOG DRUŠTVA ZA ZNANOST O LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA

Maja Lang Balija

Proslava 30. obljetnice postojanja našeg Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA) trebala je biti obilježena kao vatromet radionica, fantastičnih predavanja, te gostovanja brojnih znanstvenika i stručnjaka iz područja znanosti o laboratorijskim životinjama iz zemlje i svijeta.

Pripreme su tekle najvećim intenzitetom. Dvorane u Muzeju Mimara bile su rezervirane, svečane večere i društveni program u dogovaranju, a predavači iz različitih krajeva Hrvatske, Europe i ostalih zemalja pozvani. Tom prigodom CroLASA je planirala ugostiti i FELASA predsjedništvo na zajedničkom sastanku sa svojih 50 članova predstavnika društava laboratorijskih životinja iz Europe i svijeta. Sastanak se trebao održati u auli Rektorata Sveučilišta u Zagrebu.

A onda su zbog epidemiološke situacije s pandemijom koja je poharala svijet zaustavljene pripreme svečane proslave. Organizacijski odbor

pomislio je sve će se završiti do jeseni kada ćemo moći nastaviti s pripremama. Ali onda se 22. ožujka 2020. godine dogodio i jak potres u Zagrebu koji je u povijesnom središtu grada napravio veće materijalne štete. Oštećena je zgrada Rektorata i Pravnog fakulteta u Zagrebu, kao i Muzej Mimara. I tako je, na žalost, ta lijepa obljetnica našeg Društva silom prilika prebačena u virtualnu tj. „on line“ sferu. U prosincu 2020. na poludnevnom webinaru prikazana je retrospektiva rada Društva tijekom 30 godina rada.

Temelj za osnivanje Društva za laboratorijske životinje postavljen je 1980. godine osnivanjem sekcije unutar Hrvatskog društva fiziologa. Problemi kojima se sekcija bavila bili su nestandardizirane životinje, teškoće u nabavi hrani, needucirano osoblje, neadekvatan smještaj životinja, kao i nedovoljna briga o zdravstvenom stanju životinja unutar uzgoja.

Sekciji se pridruživalo sve više članova, pa je tako s početnih dvadeset narasla na preko sedamdeset članova. Hrvatsko društvo fiziologa prepoznao je interes članova Sekcije i omogućilo održavanje Prvog simpozija o laboratorijskim životinjama 1984. godine koji je imao znanstveni i edukativni karakter, ali i mjesto susreta stručnjaka istog područja.

Kako je broj članova rastao došlo je vrijeme da Sekcija preraste u Društvo, te je 14. lipnja 1990. godine na osnivačkoj skupštini izglasан prvi statut i izabrano prvo predsjedništvo pod vodstvom dr. sc. Lidije Šuman. Društvo počinje i s izdavanjem svojeg

glasila pod nazivom „Vijesti Društva za znanost o laboratorijskim životinjama“ koje je svake dvije godine objavljivalo relevantne članke iz područja sve do 2000. godine.

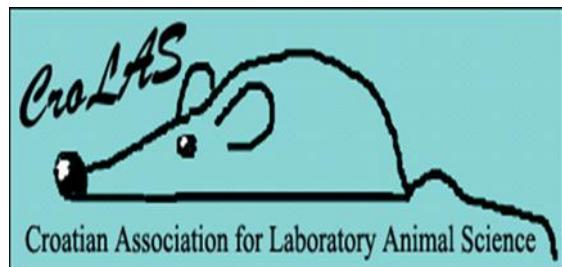


dr. sc. Lidija Šuman, prva i dugogodišnja predsjednica CroLASA-e

Godine 1993. Društvo sastavlja svoj Etički kodeks koji je usklađen s etičkim kodeksom Savjeta međunarodnih organizacija za medicinske znanosti (eng. *The Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*). I danas Etički kodeks Društva čini okosnicu etičkih i moralnih načela članova Društva, kao i vrijednosti u ponašanju svih znanstvenih i stručnih osoba koje rade s laboratorijskim životinjama. Iste godine Društvo se na poticaj Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo, aktivno uključuje u raspravu o donošenju Zakona o dobrobiti životinja.

Sljedeće godine Društvo se uključuje i u krovno društvo prirodnih znanosti – Hrvatsko prirodoslovno društvo. Članom međunarodnog komiteta za znanost o laboratorijskim životinjama (eng. *International Council for Laboratory Animal Science - ICLAS*) Društvo postaje

1999. godine, a 9. lipnja 2007. u Chernobbio, Lago di Como (Italija) Društvo postaje punopravni član FELASA-e (eng. *Federal European Laboratory Animal Science Association*).



CroLASA logo 2007. godine

Tijekom godina djelovanja Društvo je dva puta izmijenilo statut. Društvo za znanost o laboratorijskim životinjama promjenom statuta je 1997. godine izmijenilo i ime u današnji naziv Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama. Primitkom u članstvo FELASA-e Društvo dobiva svoju inačicu na engleskom jeziku: CroLASA (eng. *Croatian Laboratory Animal Science Association*). Prilikom druge izmjene statuta to ime ušlo je u statut kao službeno ime Društva na engleskom jeziku.

Ulazak u FELASA-u bio je od izuzetne važnosti za daljnji rad Društva, jer su time ostvareni brojni novi kontakti. U adresaru Društva popisano je 150 članova, mahom znanstvenika i istraživača u Hrvatskoj, uposlenih u istraživačkim centrima, u farmaceutskoj industriji, na fakultetima i u ostalim ustanovama gdje se koriste laboratorijske životinje. Članstvom u FELASA-i članovi Društva ostvaruju mogućnost izravnog utjecaja na politike vezane uz nove EU regulative, koje stavlju naglasak na poboljšan etički pristup radu s laboratorijskim

životinjama, s pravilima GLP (eng. *Good laboratory practice*), s nužnosti uvođenja SOP-a (eng. *Standard Operating Procedures*) u načinu rada i postupanja sa životinjama u animalnim nastambama, te s inovacijama u smještaju i održavanju laboratorijskih životinja.



dr. sc. Jadranka Bubić Špoljar,
dugogodišnja predsjednica CroLASA-e

Na poticaj Ministarstva poljoprivrede (Odjel za dobrobit životinja) propisuje se i način registracije tečajeva sukladno preporukama i kriterijima FELASA-e, pa tako od 2011. godine do danas veliki broj članova Društva sudjeluje u provođenju četiri akreditirana tečaja u Hrvatskoj (Prirodoslovno-matematički fakultet i Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Fidelta d.o.o. za istraživanje i razvoj te Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu).

Unutar 2017. godine ostvaruje se dobra suradnja sa Slovenskim društvom za laboratorijske životinje (SLAS), pa na poziv Slovenskog društva naše Društvo postaje suorganizator prve zajedničke edukativne radionice pod nazivom „Mikrobiološki i nutritivni standardi za laboratorijske glodavce“ te njihovog 3. kongresa, održanima 2017. godine na

Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani. Taj kongres ujedno postaje i 1. zajednički kongres naših Društava.



CroLASA logo 2015. godine

Osim navedenog, Društvo je do danas organiziralo još tri simpozija i jedan stručni skup:

1. 1996. godine zajedno s Institutom Ruđer Bošković organiziran je 1. simpozij pod nazivom "Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima - Prvi hrvatski simpozij s međunarodnim sudjelovanjem", a radovi sa simpozija objavljeni su u knjizi "Pokusni modeli u biomedicini", 2000. (ur. M. Radačić, I. Bušić, D. Eljuga, Med. naklada).

2. 2014. godine Društvo je organiziralo svoj 2. hrvatski simpozij s međunarodnim sudjelovanjem pod nazivom: „Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima“. Simpozij je održan na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, a organizatori su uz naše Društvo bili još i Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Institut Ruđer Bošković, te Medicinski i Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Simpozij je održan pod pokroviteljstvom grada Zagreba. Glavne teme simpozija bile su:

transgenične životinje, životinjski modeli bolesti, patološka, patohistološka i toksikološka istraživanja na laboratorijskim životnjama, dobrobit životinja i alternativne metode, dok je tema organiziranog okruglog stola bila Direktiva EU 2010/63.



dr. sc. Maja Lang Balija, dugogodišnja tajnica i predsjednica CroLASA-e

3. 2018. godine organiziran je i 3. znanstveno-stručni simpozij Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životnjama (CroLASA) i 2. zajednički skup CroLASA-e i Slovenskog društva za laboratorijske životinje (SLAS) "Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima". Glavne teme simpozija bile su: animalni modeli za istraživanja bolesti i razvoj liječenja, nove metode u istraživanju na laboratorijskim životnjama, unaprjeđenje standarda za primjenu životinja u pokusu s naglaskom na 3R načela i mnoge druge.

Novi trendovi u istraživanjima, te različite zanimljive teme od "A" (za Alzheimer) do "Z" (za zebrice) u radu s pokusnim životnjama bile su podloga za živu raspravu, priliku za razmjenu rezultata, ideja i prijedloga, te podlogu

za kontinuirano stručno usavršavanje. U sklopu simpozija održana je i edukacijska radionica „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.



CroLASA logo 2018. godine

4. Stručni skup pod nazivom „Edukacija stručnog i tehničkog osoblja koje radi s pokusnim životnjama“ održan je 2019. godine. Glavne teme skupa bile su planiranje, uzgoj i selekcija životinja za testiranja, unapređenje standarda u držanju laboratorijskih životinja, poticanje prirodnog ponašanja obogaćivanjem okoliša, novi pristupi u rukovanju i obuzdavanju laboratorijskih životinja, prepoznavanje tjeskobe, stresa i boli, humane metode eutanazije, itd. Također je održan i okrugli stol „Gdje je Hrvatska u odnosu na EU u edukaciji veterinarskih tehničara i njegovatelja laboratorijskih životinja“.

Nadalje, Društvo svoju aktivnost nastavlja i organizacijom edukacijskih radionica uz preporuku Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane.



dr. sc. Julija Erhardt, sadašnja predsjednica CroLASA-e

Dosad su osmišljene i održane radionice:

1. 2015. godine - radionica "Primjena 3R pristupa u radu s laboratorijskim životinjama" na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koju je završilo 56 polaznika.
2. 2016. godina - radionica "Predkliničko biološko oslikavanje (bioimaging)" na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na Institutu Ruđer Bošković koju je završio 31 polaznik, uključujući nekoliko polaznika iz Slovenije i Srbije
3. 2017. godine - radionica "Kako prijaviti pokus na životinjama" na Institutu Ruđer Bošković koju je završilo 80 polaznika. Radionica je ponovno održana 2019. godine, ovoga puta s predavačima iz novog sastava Nacionalnog etičkog povjerenstva.
4. 2017. godine - radionica "Dizajn pokusa na životinjama" na

Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koju su završila 33 polaznika

Rad Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama uvijek se temeljio na edukaciji članstva. Nužnost edukacije članova bila je i inicijalna ideja za osnivanje društva još 1990. godine. I danas upravljački odbor Društva slijedi tu tradiciju potrebe trajne edukacije osoba koje rade s laboratorijskim životinjama, a posebice edukacije mladih istraživača za rad s laboratorijskim životinjama.

Godine 2014. Društvo počinje s izdavanjem svog godišnjeg Biltena. Posebno smo ponosni što smo i kao Društvo 2018. godine postali sunakladnik knjige dr. sc. Lidije Šuman „Uvod u znanost o laboratorijskim životinjama“ koja je i prva knjiga koja obuhvaća teme vezane za rad s laboratorijskim životinjama objavljena na hrvatskom jeziku.

Retrospektivno gledano, jedna takva mala zajednica stručnjaka i znanstvenika, koja nikada nije brojila više od 150-tak članova, učinila je mnogo u svojih 30 godina intenzivnog rada. Svoju misiju kontinuirane edukacije iz područja teorijske i praktične primjene suvremenih načela u planiranju i provođenju pokusa na laboratorijskim životinjama nikad nije napustila.

Nadamo se da će i naša sljedeća obljetnica opet biti točno onakva kako je svi priželjkujemo, a to je da je održimo u „*in vivo*“ sferi.

Jeste li znali?

REPRODUCIBILNOST U ZNANSTVENIM ISTRAŽIVANJIMA KOJA KORISTE POKUSNE ŽIVOTINJE S POSEBNIM OSVRTOM NA MIKROBIOM

Marta Balog

Od samih početaka ozbiljnih znanstvenih istraživanja, reproducibilnost znanstvenih pokusa predstavljala je način utvrđivanja stvarnih znanstvenih činjenica. Reproducibilnost u znanosti se definira kao mogućnost ponavljanja nekog znanstvenog pokusa s rezultatima vrlo sličnima prethodno provedenom pokusu i temelj je modernih znanstvenih istraživanja (1).

Novija saznanja upućuju na nisku reproducibilnost u većini znanstvenih područja koja je manja od 50% (2-6). Pretklinička su istraživanja posebno istaknuta kao primjer niske reproducibilnosti. Smatra se da je više od polovice objavljenih publikacija iz takvih studija nereproducibilno, što predstavlja etički, znanstveni, ali i ekonomski problem (7).

Znanstvena zajednica trenutno o tom problemu uglavnom raspravlja u vidu izostanka dobre istraživačke prakse,

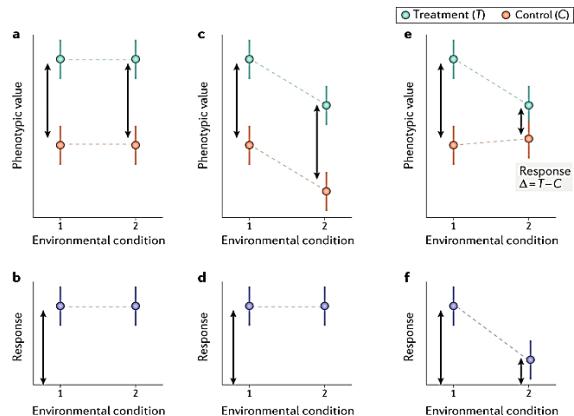
uključujući izostanak strogih znanstvenih kriterija, malu statističku snagu, nedovoljan opis metodologije, pristranost u procesu objavljivanja publikacija te zanemarivanje bioloških varijacija u dizajnu studija (1, 8).

Biološke varijacije vrlo su česte u prirodi te se razlike između jedinki iste vrste mogu očitovati u raznim fenotipskim svojstvima. Takve varijacije nastaju radi učinaka genotipa i odgovora organizma na okoliš u kojem živi, a uključuju čimbenike kao što su razvojni stadij, dob, rano iskustvo, mikrobiom te socijalni status. Mogu se očitovati na svim razinama, od molekularnih mehanizama do ponašanja (9, 10).

Varijacije uzrokovane okolišem vrlo su složene i mijenjaju se s vremenom i karakteristikama okolišnih čimbenika kao što su hrana, predatori, druge jedinke s kojima dijele okoliš te toksini. Uspostavljen je pojam norme reakcije kojom se opisuje način na koji jedan ili više okolišnih čimbenika djeluju na razvoj fenotipa, a očekivani fenotipi se mogu mapirati s obzirom na vrijednosti okolišnih parametara. Takvi se očekivani fenotipi mogu razlikovati među različitim genotipovima (11).

Učinci okolišnih čimbenika se tijekom života organizama teško uočavaju morfološkim, fiziološkim i bihevioralnim analizama, iako mogu uzrokovati promjene na razini proteinskog izražaja te pridonijeti finom ugađanju genotipa (12). Uobičajeno se učinak tretmana u znanstvenim istraživanjima na pokusnim životinjama mjeri u obliku

fenotipa. Rezultati istraživanja osciliraju s obzirom na ukupno stanje životinje proizašlo iz genotipa te iskustava tijekom razvoja, kao i vanjskih okolišnih čimbenika (Slika 1).



Slika 1. a) Fenotipske vrijednosti izmjerene u kontrolnoj i eksperimentalnoj skupini životinja mogu biti snažne što znači da takve životinje mogu biti neosjetljive na promjene okolišnih uvjeta. b) Primjer snažnog odgovora na tretman (dvostrukе strelice). c,d) Ukoliko su fenotipske vrijednosti osjetljive na okolišne uvjete, odgovor može biti snažan ukoliko su okolišni učinci zbrojeni. e,f) Odgovor na tretman može ovisiti o kontekstu ukoliko postoji interakcija između tretmana i okoliša.

U znanstvenim istraživanjima koja koriste pokusne životinje problem bioloških varijacija najčešće se rješava strogom standardizacijom životinja i njihova okoliša. Standardizaciju možemo shvatiti na više načina – možemo ju smatrati primjenom identičnih okolišnih uvjeta za sve životinje uključene u studiju, ali i primjenom standardnih postupaka umjesto pokušaja da se cijeli postupak u potpunosti ponovi na identičan način (13).

Standardizacijom se smanjuje varijabilnost i povećava statistička snaga što omogućuje smanjenje broja korištenih životinja i povoljno utječe na etičke aspekte studije. Na taj se način ipak, u potpunosti ne uzima u obzir biološka varijacija. S obzirom da je varijacija osnovno svojstvo bilo koje populacije organizama, učinci tretmana u pokusu mogu se jasno interpretirati samo ukoliko se uzme u obzir i biološka varijacija.

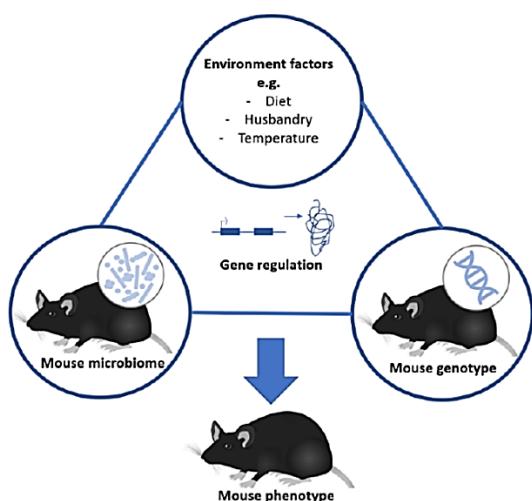
Definiranje ciljne populacije bi stoga trebalo uzeti u obzir genotipske i okolišne varijacije koje bi mogle utjecati na ishod studije. Vrlo usko fokusirane studije tako se često ne mogu primijeniti na cijelu populaciju ukoliko se primjerice koriste samo jedinke muškog spola jer isti tretman može uzrokovati različiti učinak u ženki (14). Isto tako, životinje koje žive samostalno pokazuju drugačiji odgovor na tretman u usporedbi sa životnjama koje žive u skupinama (15).

Jedan od izvora fenotipskih varijacija je i raznolikost mikroorganizama koji nastanjuju pojedini organizam (bakterije, virusi, gljivice), odnosno mikrobiom. Njihov genetski materijal može biti prisutan u čitavom tijelu pokusne životinje, recimo miša. Novija znanstvena istraživanja razotkrila su neke posebnosti mikrobioma te su utvrdila njihovu važnost u mehanizmu određenih bolesti kao što su karcinomi ili dijabetes (16-18).

Odnos između mikroorganizama i domaćina sastoji se od simbiotskih, komenzalnih ili patogenih interakcija koje mogu utjecati fiziološke procese

domaćina, uključujući metaboličke procese i imunološki sustav (19).

Varijacija u mikrobiomu miša, čestog modelnog organizma, utječe na fenotip domaćina na još uvijek nepotpuno jasan način. Može se pretpostaviti da je fenotip miša pod utjecajem mišjeg genoma, okoliša i mikrobioma kao odvojenih komponenti, ali i njihovih interakcija. Takve interakcije mogu objasniti različite odgovore miševa na neki tretman u različitim studijama (Slika 2).



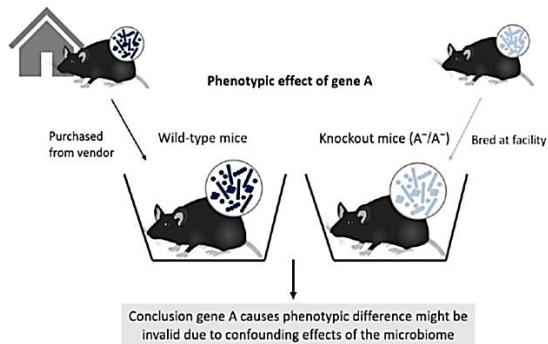
Slika 2. Shema složenih interakcija između okoliša, genotipa i mikrobioma u mišu kao modelnog organizma. Preuzeto iz (20)

Iako se u studijama na pokusnim miševima uglavnom koriste visokosrođene životinje i kontrolirani okoliš, rijetko se obraća pažnja na mikrobiom. Tijekom proteklih 15 godina, uočena je važnost mikrobioma i njegova uloga u reproducibilnosti znanstvenih istraživanja. U jednoj je studiji tako utvrđeno da su varijacije u osjetljivosti na infekciju *Salmonellom* u genetički sličnih miševa, kupljenih od

različitih proizvođača, posljedica varijacija njihovih mikrobioma (21).

Ukoliko ne možemo točno opisati i odrediti opseg utjecaja varijacija mikrobioma, njegov utjecaj na reproducibilnost može se opisati na dva načina: 1) takve varijacije mogu djelovati zbunjujuće na interpretaciju rezultata i uzrokovati netočne rezultate (primjerice lažno pozitivne) u izvornoj ili ponovljenoj studiji ili 2) mogu djelovati kao nepoznati čimbenik koji u izvornoj ili ponovljenoj studiji daje rezultat koji se ne može uopćiti (20). Varijacije u mikrobiomu miševa mogu biti izvor pristranosti u dizajnu znanstvenih studija. U većini takvih studija, znanstvenici pokušavaju uočiti uzrok i učinak između dvije varijable. U pokusima na miševima, to uobičajeno uključuje proučavanje učinka neovisne varijable na fenotipsko svojstvo pa se u tu svrhu koriste jedna ili više eksperimentalnih skupina i odgovarajuća kontrolna skupina.

Međutim, fenotipska razlika između skupina može nastati i radi varijacije u mikrobiomu ili složenih interakcija mikrobioma i varijabli, a ne samo radi neovisnih varijabli postavljenih u dizajnu studije. To su primijetili i Stappenbeck i Virgin koji su 2006. godine uočili problem nereproducibilnosti u slučaju kada je eksperimentalna skupina miševa bila uzgojena u vlastitoj instituciji, a soj divljeg tipa nabavljen od strane proizvođača (22). Takav način ustroja skupina životinja predstavlja lošu praksu iz više razloga, a na pravom je mjestu varijacija mikrobioma (Slika 3).

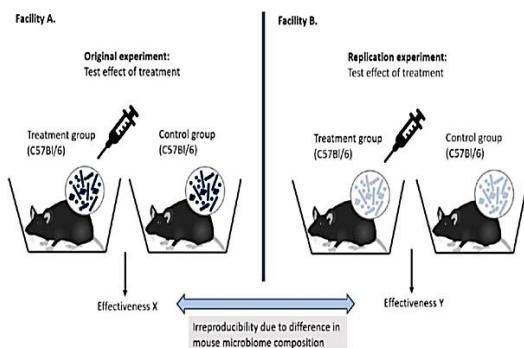


Slika 3. Usporedba između miševa divljeg tipa i "knock-out" miševa koja nije objektivna radi varijacija u mikrobiomu koje su nastale zbog odvojenog uzgoja. Preuzeto iz (20).

Još jedan učinak koji proizlazi iz varijacije mikrobioma može se uočiti u miševa koji žive u istom kavezu. U takvih se miševa često uočava sinkronizacija mikrobioma (vjerojatno radi koprofagije) (23, 24). U tom je slučaju otežana usporedba miševa koji su živjeli odvojeno od onih koji su živjeli u istom kavezu. Varijacija u mikrobiomu miševa može se uočiti i neuspjelim ponovljenim studijama u kojima nisu nužno naznačeni lažno pozitivni ili negativni rezultati. Moguće je da bi rezultati izvorne studije bili točni, no samo ukoliko se primijene identični eksperimentalni uvjeti, tj. ukoliko životinje imaju identičan sastav mikrobioma.

S obzirom na trenutni nedostatak validacije mikrobioma u svim studijama koje koriste pokušne životinje, moguće je problem mikrobioma opisati i kao nepoznati čimbenik koji tada ima glavnu ulogu u pronalasku drukčijih rezultata u ponovljenim studijama. S obzirom na utjecaj mikrobioma na fenotip miša i visoku varijaciju njegova sastava

između miševa uzgojenih različitim institucijama, izravno ponovljene studije mogle bi u stvarnosti predstavljati testiranje sasvim različitog fenotipa (Slika 4) (20).



Slika 4. Varijacije sastava mikrobioma miša može objasniti nereproducibilnost između (ali i unutar) uzgojnih objekata s obzirom da učinkovitost tretmana može biti specifična za određeni sastav mikrobioma. Preuzeto iz (20).

Ivanov i sur. su 2008. prvi uočili fenotipske razlike između miševa divljeg tipa C57BL/6 dobivenih u različitim uzgojnim objektima. Primijetili su kako miševi proizvođača Jackson laboratories imaju znatno niži broj Th17 stanica u usporedbi s miševima iz drugih izvora kao i da se to svojstvo može obrnuti fekalnom transplantacijom. Također su utvrdili da je takva razlika uzrokovana prisutnošću bakterijskih rodova *Cytophaga*, *Flavobacter* i *Bacteroidetes* (25).

Međutim, manje su jasne poteškoće ponavljanja pokuša unutar iste institucije. U jednom takvom primjeru, McCabe i sur. su ponovili studiju utjecaja lijeka na gustoću kostiju u miševa. Studija je ponovljena tri puta, svaki put s miševima iz vlastite uzgojne nastambe, a svaka od njih dala je različite rezultate - bez promjene,

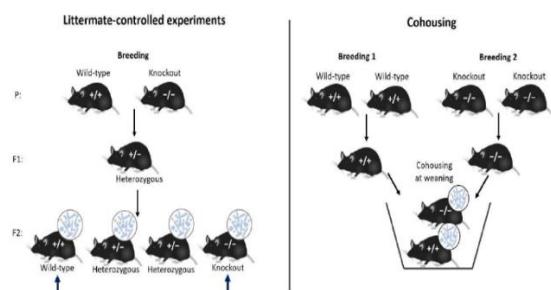
smanjenu te povećanu gustoću kostiju nakon primjene lijeka. Ista je skupina utvrdila razlike u mikrobiomu miševa u tri provedene studije, no nisu utvrdili točan mehanizam kojim se to dogodilo s obzirom da se radilo o istoj uzgojnoj nastambi, ali i istim istraživačima koji su provodili sve tri studije (26). Iako se može učiniti da takve studije predstavljaju "lošu znanost", omogućavanje mikrobiomu da djeluje kao "zbunjujući" čimbenik može biti i test pouzdanosti ili robusnosti studije. Vjerovatnost da će ponovljena studija proizvesti različiti fenotip od izvorne je velika, radi fenotipske plastičnosti i mnogih varijabli koje utječu na fenotip puskasnih životinja.

To otvara pitanje je li uopće moguće u potpunosti ponoviti neku studiju ili njihovo ponavljanje gotovo uвijek predstavlja test pouzdanosti. Neuspjelo ponavljanje izvorne studije, uzrokovano nenamjernim razlikama u određenim varijablama, ne treba shvatiti kao loš ishod. Takve studije pridonose novom shvaćanju, neuočenih izvora varijacija. Primjerice, ukoliko je novi kemoterapijski lijek za liječenje karcinoma debelog crijeva učinkovit u jednoj pretkliničkoj studiji, ali ne i u ponovljenoj studiji, to bi mogao biti povod za utvrđivanje uloge mikrobioma u učinkovitosti lijeka i omogućavanje personaliziranog liječenja.

Trenutno nije moguće rutinski analizirati mikrobiom svih miševa za sve studije, pa je reproducibilnost studija s obzirom na mikrobiom ograničena na one koje su tematski povezane sa sastavom mikrobioma. U

studijama iz drugih područja ponavljanje istih studija metodom pokušaja i pogreške moglo bi uzrokovati neodobravanje etičkih tijela s obzirom na standarde načela 3R.

Ipak, postoje metode uzgoja kojima se mogu kontrolirati učinci mikrobioma, a uključuju uzgoj više miševa iz dvije ili više eksperimentalnih skupina u istom kavezu tijekom ranog razdoblja. Kako bi proces uzgoja bio više homogen, može se primijeniti i prijenos strelje iz jednog u druge kaveze, ukoliko je u studiju uključen veći broj životinja. Druga metoda uključuje korištenje "knock out" ili drugih transgeničnih sojeva te usporedbu s miševima divljeg soja, a uzgoj se tada započinje parenjem životinja "knock out" i genotipa divljeg soja u prvoj generaciji te heterozigotnih životinja u drugoj generaciji. Usporedba između tako dobivenih životinja oba genotipa kontrolirana je za mikrobiom, jer su životinje oba genotipa potekle iz istog kavezza (Slika 5) (20).



Slika 5. Shema kontroliranog legla (eng. *littermate-controlled*) i uzgoja dvije eksperimentalne skupine miševa u istom kavezu (eng. *cohousing*) kojima se može standardizirati sastav mikrobioma miševa. Preuzeto iz (20).

Jedna je studija 2009. god. potvrdila učinkovitost takvog zbrinjavanja

mladunaca tijekom ranog razdoblja s tim što je bolja standardizacija mikrobioma uočena kada su mladunci proizašli iz kontroliranog legla (parenjem transgeničnih s miševima divljeg tipa) (27). Drugo je rješenje proizvodnja pokusnih miševa s točno definiranim sastavom mikrobioma, no to predstavlja skup i dugotrajan proces, a također se dovodi u pitanje i kakav bi sastav tog mikrobioma trebao biti.

Posljednjih nekoliko godina, u nekoliko se pokušaja testirala hipoteza presađivanja mikrobioma miševa iz prirode na pokusne miševe. Jedna je studija tako ukazala da životinje s presađenim mikrobiomom miševa iz prirode imaju manje razine upalnih procesa i otpornije su na upalu potaknutu nastankom tumora (28). U studiji u kojoj su embriji pokusnih miševa soja C57BL/6 preneseni u ženku divljeg miša iz prirode, potomci su više nalikovali divljim miševima s obzirom na mikrobiom i imunološki profil krvi i slezene. Za razliku od mikrobioma konvencionalnih miševa, mikrobiom tako dobivenih miševa bio je stabilniji tijekom nekoliko generacija, i s obzirom na okolišne promjene (29).

ZAKLJUČAK

U primjeru na pokusnim miševima moguće je uvidjeti kako varijacije između životinja s obzirom na mikrobiom mogu obuhvaćati i smanjenje i prihvaćanje takvih varijacija te mogu poslužiti kao strategije za povećanje reproducibilnosti pokusa. Smanjenje varijacije u tom slučaju može smanjiti i zbumujuće rezultate, dok prihvaćanje varijacija osigurava mogućnost donošenja općeg zaključka

primjenjivog na heterogenu populaciju ili uvođenje personalizirane terapije. Svaku od strategija treba odabrati s obzirom na specifičnu znanstvenu hipotezu i cilj istraživanja.

Potpuna standardizacija eksperimentalnih uvjeta mogla bi uzrokovati slabo odražavanje stvarnog svijeta i opće populacije. U pokušajima da se okoliš što više standardizira i održi potpuno čistim, uzgojne bi nastambe nenamjerno mogle eliminirati složenost mikrobioma pokusnih životinja i na taj način utjecati na smanjenu reproducibilnost i mogućnost uspješne translacije rezultata.

LITERATURA:

1. Voelkl B, Altman NS, Forsman A, et al. Reproducibility of animal research in light of biological variation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020;21(7):384-93.
2. Ioannidis JPA. Why Most Published Research Findings Are False. *PLOS Medicine*. 2005;2(8):e124.
3. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6251):aac4716.
4. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452-4.
5. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(9):712.
6. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLOS Biology*. 2015;13(6):e1002165.

7. Collins FS, Tabak LA. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature*. 2014;505(7485):612-3.
8. Goodman SN, Fanelli D, Ioannidis JP. What does research reproducibility mean? *Science translational medicine*. 2016;8(341):341ps12.
9. Forsman A. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*. 2015;115(4):276-84.
10. Freund J, Brandmaier AM, Lewejohann L, Kirste I, Kritzler M, Krüger A, et al. Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science* (New York, NY). 2013;340(6133):756-9.
11. Hartman JL, Garvik B, Hartwell L. Principles for the buffering of genetic variation. *Science* (New York, NY). 2001;291(5506):1001-4.
12. Halldorsdottir T, Binder EB. Gene × Environment Interactions: From Molecular Mechanisms to Behavior. *Annual review of psychology*. 2017;68:215-41.
13. Willmann R, De Luca A, Benatar M, Grounds M, Dubach J, Raymackers JM, et al. Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. *Neuromuscular disorders* : NMD. 2012;22(1):43-9.
14. Sorge RE, Mapplebeck JC, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci*. 2015;18(8):1081-3.
15. Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. Neuroscience and biobehavioral reviews. 2014;40:1-5.
16. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3(1):31.
17. Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, et al. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Revista espanola de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2015;107(11):659-71.
18. Jamshidi P, Hasanzadeh S, Tahvildari A, Farsi Y, Arbabi M, Mota JF, et al. Is there any association between gut microbiota and type 1 diabetes? A systematic review. *Gut pathogens*. 2019;11:49.
19. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* (New York, NY). 2001;292(5519):1115-8.
20. Witjes VM, Boleij A, Halfman W. Reducing versus Embracing Variation as Strategies for Reproducibility: The Microbiome of Laboratory Mice. *Animals* : an open access journal from MDPI. 2020;10(12).
21. Velazquez EM, Nguyen H, Heasley KT, Saechao CH, Gil LM, Rogers AWL, et al. Endogenous Enterobacteriaceae underlie variation in susceptibility to *Salmonella* infection. *Nature Microbiology* 2019;4(6):1057-64.
22. Stappenbeck TS, Virgin HW. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. *Nature*. 2016;534(7606):191-9.
23. McCafferty J, Mühlbauer M, Gharibeh RZ, Arthur JC, Perez-

Chanona E, Sha W, et al. Stochastic changes over time and not founder effects drive cage effects in microbial community assembly in a mouse model. *The ISME journal.* 2013;7(11):2116-25.

24. Hildebrand F, Nguyen TL, Brinkman B, Yunta RG, Cauwe B, Vandenebeele P, et al. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology.* 2013;14(1):R4.

25. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008;4(4):337-49.

26. Servick K. Of mice and microbes. *Science* (New York, NY). 2016;353(6301):741-3.

27. Robertson SJ, Lemire P, Maughan H, Goethel A, Turpin W, Bedrani L, et al. Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models. *Cell reports.* 2019;27(6):1910-9.e2.

28. Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, et al. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell.* 2017;171(5):1015-28.e13.

29. Rosshart SP, Herz J, Vassallo BG, Hunter A, Wall MK, Badger JH, et al. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science* (New York, NY). 2019;365(6452):eaaw4361.

Jeste li znali?

VIŠE OD 3R: VAŽNOST ZNANSTVENE VALJANOSTI ZA ANALIZU ŠTETE I KORISTI ISTRAŽIVANJA NA ŽIVOTINJAMA

Hanno Würbel
Prevela i prilagodila
Julija Erhardt

Hanno Würbel, (Animal Welfare Division, Veterinary Public Health Institute, University of Bern), objavio je u časopisu Labanimal (46 (4) 2017) članak o važnosti znanstvene valjanosti u pokusima na životinjama, adresirajući krizu reproducibilnosti u istraživanju čija realizacija u zadnje desetljeće i pol potresa znanost (Ioannidis, J.P.A. (2005) Why most published research findings are false. PLoS Med. 2, e124). Osim 3R načela i analize koristi i štete, Würbel uvodi još i treće načelo, koje naziva 3V, a odnosi se na prikladnost znanstvenog protokola i analizira aspekte znanstvene valjanosti.

Kriza ponovljivosti u biomedicinskim istraživanjima predstavlja novi izazov pri provođenju analize štete i koristi (HBA, eng. *harm-benefit analysis*): kako poboljšati valjanost studija da bismo povećali njihovu korist?

Svake se godine u eksperimentalnim postupcima u svijetu koristi 50-100 milijuna kralježnjaka. Korištenje životinja za istraživanje zakonski je regulirano izričitim razumijevanjem da će pružiti značajno novo znanje i relevantne koristi, a životnjama neće biti nanesena nepotrebna šteta. HBA je uobičajeni alat za donošenje konačnih odluka o tome ispunjavaju li protokoli studije ta očekivanja. Stoga je HBA ključni dio evaluacije projekata i izričito se zahtijeva Direktivom EU 2010/63; također se podrazumijeva u američkom Vodiču za njegu i uporabu laboratorijskih životinja i naglašava u Kodeksu o zdravlju kopnenih životinja od strane Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE).

HBA slijedi pravno načelo razmjernosti¹ i uključuje 3 glavna pitanja: (1) je li studija prikladna za postizanje legitimnog cilja, (2) je li potrebna i (3) je li primjerena i optimalna. Pitanje (3) odnosi se na stvarnu HBA koja procjenjuje jesu li očekivane koristi studije veće od štete nametnute životnjama. Pitanja (1) i (2) instrumentalni su preduvjet za stvarnu HBA, a odnose se na znanstveno obrazloženje na kojem se temelji očekivani ishod studije (prikladnost) i na potencijalnu alternativu šteti koja će biti nametnuta životnjama (nužnost).

Procjena potencijalnih alternativa u osnovi ispituje je li princip 3R iskorišten kako bi se umanjila šteta nametnuta životnjama. Dakle, da bi se protokol studije nastavio do konačne procjene koristi i štete, mora uvjerljivo tvrditi da se očekivani rezultat ne može postići korištenjem nijedne ili nijedne osjetilne²

(sentient) životinje (Replace, zamijeniti), da će koristiti najmanje životinja koliko je to moguće (Reduce, smanjiti) ili da će koristiti najmanje štetne postupke (Refine, poboljšati). Minimiziranje štete nanesene životnjama obogaćivanjem uvjeta držanja životinja, navikavanje na postupke, neinvazivne tehnike i primjena anestetika i analgetika mogu pomaknuti težinu u analizi koristi i štete u pokusima na životnjama.

¹U kaznenom zakonu, načelo proporcionalne pravde koristi se za opisivanje ideje da kažnjavanje određenog kaznenog djela treba biti proporcionalno težini samog kaznenog djela.

²Riječ „osjetilan“ ne obuhvaća u potpunosti šire značenje eng. riječi „sentient“. Prema Merriam-Webster riječniku engleskih pojmoveva, „sentient“ je definiran kao (1) živo biće koja reagira ili je svjesno svojih osjetilnih dojmova, (2) svjestan i/ili (3) vrlo osjetljiv u percepciji ili osjećaju. Ne postoji hrvatska riječ koja bi u potpunosti pokrila sva značenja implicirana s riječi „sentient“.



Slika 1. Poboljšani postupak za HBA u istraživanjima na životnjama. Dok 3R metode smanjuju težinu štete životnjama na HBA vagi, metode za poboljšanje znanstvene valjanosti istraživanja (3V) maksimiziraju vrijednost rezultata studije, olakšavajući tako očekivane koristi.

NAPUHAVANJE PREDNOSTI

Što je sa stranom jednadžbe koja se odnosi na korist znanstvenog istraživanja? Ako studija ne daje rezultate koji su znanstveno valjani i ponovljivi, životinje se mogu protratiti na neuvjerljiva istraživanja, bez obzira na to koliko im se nanese malo štete.

Dok odbori za etički nadzor nastoje smanjiti štetu nanesenu životinjama pažljivo analizirajući primjenu 3R, znanstvena valjanost i ponovljivost rezultata istraživanja obično se uzima zdravo za gotovo. Takvo povjerenje ne mora biti opravdano, kao što je to istaknuto „krizom ponovljivosti“ u biomedicinskim istraživanjima.

Tijekom proteklog desetljeća sakupili su se dokazi koji ukazuju na to da su znanstvena valjanost i ponovljivost biomedicinskih istraživanja alarmantno loši. Na temelju sustavnih pregleda i simulacija, Ioannidis je zaključio da je „za većinu dizajna i postavki studija vjerojatnije da je tvrdnja istraživanja lažna nego istinita“. To potkrepljuju dokazi o rizicima od pristranosti tijekom istraživanja *in vivo*, spektakularnih slučajeva neponovljivosti i velikih neuspjeha u translaciji na veliko (pri primjeni u biotehnologiji i biomedicini, op. prev.).

Sustavnu pogrešku (pristranost), lošu ponovljivost i neuspjeh pri translaciiji istraživanja mogu uzrokovati nedostaci na svim razinama istraživanja, uključujući dizajn, provođenje, analiza i izvještavanje o pokusima. Na primjer, studije mogu koristiti loše validirane životinjske modele ili variable ishoda; mogu se temeljiti na uzorcima koji su

premali ili neobični; mogu kršiti načela dobre istraživačke prakse (na primjer, randomizacija, slijepa procjena ishoda, apriorni izračun veličine uzorka) ili koristiti neprikladne statistike (na primjer, p-hakiranje); ili mogu izvještavati o rezultatima selektivno ili uopće ne.

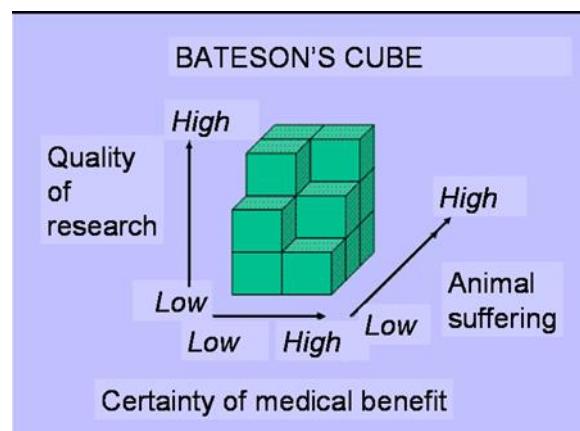
Sve ovo može štetiti znanstvenoj valjanosti i reproducibilnosti rezultata objavljenih u primarnoj znanstvenoj literaturi, čime se kompromitira ishod istraživanja. Na sličan način kao što načelo 3R služi za provedbu strategija koje u najmanjoj mogućoj mjeri šteti životinjama, moćnije načelo će možda biti potrebno za provedbu strategija koje maksimiziraju znanstvenu valjanost, te na taj način facilitirati koristi pokusa na životinjama.

To dobro ilustrira sljedeća analogija. Kada su dostupna poboljšanja za štetni postupak (na primjer, post-kirurška analgezija), ali koja se u protokolu studije zanemaruju, to predstavlja kršenje načela 3R, što nanosi nepotrebnu štetu životinjama. Slično tome, nepoznavanje mjera protiv rizika od pristranosti (na primjer, randomizacija, slijepa procjena ishoda) može se smatrati kršenjem principa dobre istraživačke prakse, čime se kompromitira ishod studije.

Međutim, slično neizbjegnoj šteti, ne mogu se izbjegći svi rizici od pristranosti. Na primjer, kada se procjenjuju razlike u ponašanju između miševa različite boje dlake, procjena slijepog ishoda može biti nemoguća. Iako procjena ishoda studije koja nije podvrgnuta slijepoj procjeni (*non-blinded*),

predstavlja rizik od pristranosti ishoda studije, ona nije neetična. Suprotno tome, kad je slijepa procjena ishoda izvediva, ali se zanemaruje bez opravdanja, to predstavlja slučaj neodgovorne upotrebe životinja, što je neetično, a u EU je i protuzakonito.

Postoje rasprave o tome treba li znanstvenu valjanost mjeriti na stranu štete ili na stranu koristi jednadžbe ili bi ona trebala biti dio neovisne treće dimenzije "vjerojatnosti koristi" kao u "Batesonovoj kocki" (Slika 2). Međutim, u svom nedavnom izvještaju o trenutnim konceptima o koristi i šteti (HBA) pri analizi pokusa na životinjama, radna skupina AALAS-FELASA zaključila je da „provodenje HBA na sustavan način, a time definiranje i opisivanje koristi nije uobičajena praksa“, ali da je „dobro osmišljen eksperiment temeljni kriterij za pouzdane informacije i za stvaranje bilo kakve koristi“.



Slika 2. Batesonova kocka je model koristi i štete za istraživanja na životinjama, koji je razvio Prof Patrick Bateson 1986. godine. Kocka ima tri osi koje mjere patnju, sigurnost u korist i kvalitetu istraživanja. Ako je istraživanje visokokvalitetno, sigurno

korisno i neće nanijeti patnju, tada će pasti u šuplji dio (gore sprijeda), što znači da bi istraživanje trebalo nastaviti. Bolna, nekvalitetna istraživanja s manjom vjerojatnošću uspjeha bit će dolje na čvrstom području i ne bi se trebala nastaviti. Većina istraživanja neće biti jasna, ali vodeće načelo je "šuplje" treba nastaviti, "čvrsto" ne.

TABLE 1 | Considerations for harm-benefit analysis

Suitable	Assess validity (3Vs) construct validity internal validity external validity
Necessary	Assess harms (3Rs) replace reduce refine
Adequate	Harm-benefit analysis weight of harms: consider 3Rs weight of benefits: consider 3Vs conduct harm-benefit analysis

Tablica 1. Razmatranja za HBA

3V ZNANSTVENE VALJANOSTI

Würbe stoga predlaže da se analiza koristi i štete proširi dodavanjem sustavnije procjene znanstvene valjanosti i predlaže uključivanje tri ključna aspekta znanstvene valjanosti: valjanost konstrukta (cV)³, unutarnja valjanost (iV) i vanjska valjanost (eV), što će se iz praktičnih razloga u dalnjem tekstu nazivati 3V. Dakle, prije stvarne analize koristi i štete (HBA), protokoli istraživanja ne bi trebali biti procijenjeni samo za 3R, već i za 3V (Slika 1 i Tablica 1).

³Preuzeto iz Henderson et al. 2013, 10(7) e1001489, PLOS Medicine. Prijetnje valjanosti u dizajnu i provođenju pretkliničkih studija učinkovitosti: Sustavni pregled smjernica za in vivo pokuse na životinjama

Okvir 1. Valjanost konstrukcije i pretklinička istraživanja

Valjanost konstrukcije odnosi se na stupanj do kojeg su opravdani zaključci iz pojedinosti o uzorkovanju eksperimenta (npr. jedinice, postavke, tretmani i ishodi) do entiteta koje ti uzorci trebaju predstavljati. U pretkliničkim istraživanjima, „valjanost konstrukcije“ se koristi za opisivanje odnosa između ishoda ponašanja u pokusima na životinjama i ponašanja ljudi koje se namjerava modelirati (npr. da li smanjena izvedba štakora u „testu prisilnog plivanja“ pruža odgovarajući prikaz fenomenologije ljudske depresije).

Naša analiza proširuje ovaj poznatiji pojam na same životinje, kao i na tretmane i uzročne putove. Kad istraživači izvode pretkliničke eksperimente, oni implicitno postavljaju teorijske odnose između svojih eksperimentalnih pokusa i kliničkog scenarija koji pokušavaju oponašati. Kliničkoj generalizaciji prijeti kada su te teorijske veze pogrešne. Postoji nekoliko načina na koji se u pretkliničkim studijama može ugroziti valjanost konstrukcije.

Prvo, istraživači mogu koristiti tretmane, životinjske modele ili procjene ishoda koji se slabo podudaraju s kliničkim okruženjem, kao kad pretkliničke studije koriste model akutne bolesti za predstavljanje kronične bolesti u ljudi.

Drugi način na koji konstruktivna valjanost može biti ugrožena je ako istraživači pogriješe u izvođenju eksperimentalnih operacija. Npr. istraživači koji namjeravaju modelirati intravensku primjenu lijeka umjesto u repnu venu kod štakora, nehotice daju lijek supkutano.

Treća prijetnja konstruktivnoj valjanosti u pretkliničkim istraživanjima je kada fiziološki poremećaji u podlozi ljudske bolesti nisu prisutni u životinjskim modelima te bolesti. U sva tri slučaja, pretklinička studija može biti vanjski valjana ako se teorije prilagode. Studije o akutnoj bolesti, iako nisu „valjane konstrukcije“ za kronične bolesti, mogu zadržati generaliziranost za akutne ljudske bolesti.

Procjena valjanosti dizajna eksperimenta trebala bi se temeljiti na dokazima o razini slaganja između životinjskog modela, sa testom ili varijablom ishoda i kvalitetom koja se namjeravala mjeriti. U slučaju varijabli ishoda to može uključivati dokaze o konvergentnoj i diskriminirajućoj valjanosti; u slučaju životinjskih modela za specifična stanja (na primjer, bolesti) kod ljudi ili drugih životinja, to može uključivati dokaze o tri glavna aspekta valjanosti modela: tzv. „face validity“, tj. stupanj do kojeg se postupak čini učinkovitim u smislu svojih navedenih ciljeva, nadalje valjanost konstrukcije/dizajna³ i prediktivna valjanost⁴.

⁴Životinjski model s visokom prediktivnom valjanosti (također se naziva i kriterijska valjanost), predviđa ponašanje u situaciji koju bi trebao modelirati, tj. omogućuje ekstrapolaciju učinka određene eksperimentalne manipulacije s jedne vrste na drugu vrstu, uključujući ljude, i od jednog stanja (npr. laboratorija) do drugog (npr. „stvarni svijet“) ili od jednog vremenskog razdoblja ispitivanja do drugog. (Van der Stay et all. (2009), Behav and Brain Func, 5:11. doi:10.1186/1744-9081-5-11)

Procjena interne valjanosti trebala bi se temeljiti na dokazima za znanstveno obrazloženje (npr. uporaba odgovarajućih kontrolnih skupina) i za znanstvenu strogost u smislu mjera protiv rizika od pristranosti (na primjer, definicija primarnih i sekundarnih varijabli ishoda, izračun veličine uzorka, randomizacija, „blinding“, plan statističke analize). I na kraju, procjena vanjske valjanosti trebala bi se temeljiti na dokazima o značajkama eksperimentalnog dizajna koje poboljšavaju ili olakšavaju zaključivanje o ponovljivosti i generalizaciji očekivanih rezultata.

To uključuje podjelu eksperimenata na više neovisnih replika (serija), uvođenje sistematskih varijacija (heterogenizacija) relevantnih varijabli (na primjer, vrste/sojevi životinja, uvjeti držanja, ispitivanja, itd.) ili provedba dizajna studija s više centara. Na taj bi način 3V mogli ponuditi dobrodošla vodeća načela za procjenu i maksimiziranje znanstvene valjanosti rezultata studije, povećavajući tako vjerojatnost postizanja očekivane koristi od pokusa na životnjama.

Trenutno etički pregled ne uključuje sustavnu procjenu znanstvene valjanosti tijekom HBA. Za istraživanja na životnjama u Švicarskoj nedavno je pokazano da bi vlastima koje licenciraju pokuse na životnjama zapravo nedostajale važne informacije da bi to učinile; obrazac za prijavu to izričito ne traži, pa ga stoga podnositelji zahtjeva ne daju.

U svjetlu trenutne „krize ponovljivosti“, Würbel predlaže da bi

sustavnija procjena 3V-a - slična procjeni 3R-a - kao dio HBA, pružila moćan alat za procjenu i poboljšanje znanstvene valjanosti i ponovljivosti *in vivo* istraživanja.

To se čini osobito relevantnim u pogledu ponovljivosti i mogućnosti generalizacije rezultata istraživanja. Opseg pokusa na životnjama često je vrlo uzak, većina studija provodi se kao mala laboratorijska ispitivanja. Zbog visoko standardiziranih uvjeta u laboratorijima, rezultati studija jednog laboratoriјa često imaju vrlo malo vanjske valjanosti.⁵

⁵*Vanjska valjanost je opseg u kojem se rezultati dobiveni korištenjem određenog životinjskog modela mogu generalizirati / primijeniti na i među populacijama (i na kraju, vrstama) i okolinama, ili "mjera koliko nam eksperimentalni nalazi pomažu da predvidimo ponašanje u stvarnom svijetu" (Van der Stay et all. (2009), Behav and Brain Func, 5:11. doi:10.1186/1744-9081-5-11)*

Ironično, napori 3R-a da se upotreba životinja smanji mogu nenamjerno pogoršati ovu situaciju promičući standardizaciju kao sredstvo za smanjenje varijacija tijekom eksperimenta s obzirom na manje veličine uzoraka. Međutim, to može biti kontraproduktivno jer standardizacija neizbjježno smanjuje vanjsku valjanost i kao posljedicu, ponovljivost.

Koristeći podatke iz 50 neovisnih studija o učinku hipotermije na volumen infarkta u životinjskim modelima moždanog udara, nedavno je provedena simulacijska studija za analizu ponovljivosti studija u samo

jednom laboratoriju u usporedbi s studijama u više laboratorijskih.

Nadalje, dok je manje od 50% jednolaboratorijskih studija dalo točnu procjenu veličine "istinskog" učinka (smanjenje volumena infarkta za 48%, kako je procijenjeno meta-analizom), simulacije su pokazale da su istraživanja temeljena na samo tri laboratorija mogu povećati ponovljivost s manje od 50% na preko 80%, bez povećanja lažno negativnih stopa ili potrebe za većim uzorcima.

Osim analize koristi i štete (HBA) u etičkom pregledu istraživanja na životinjama, analiza komponenti 3V načela bi također mogla postati instrument za stručnu provjeru zahtjeva za potporu istraživanja i rukopisa predanih za objavljivanje.

Pohvalno je što je NIH nedavno ažurirao svoje smjernice za ocjenjivanje prijedloga istraživanja uključujući ocjenu znanstvene strogosti (<https://grants.nih.gov/reproducibility/index.htm>), te da sve više i više časopisa podržavaju smjernice UK NC3Rs ARRIVE (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Međutim, sustavnija procjena znanstvene valjanosti na temelju 3V mogla bi pomoći u dalnjem razvoju inicijativa prema snažnijim smjernicama.

Kao i kod 3R, nema potrebe za fiksnim pristupom. Umjesto toga, donatori koji odlučuju o dodjeli bespovratnih sredstava, vlasti koje licenciraju eksperimente na životinjama i urednici koji ocjenjuju rukopise za objavljivanje

mogli bi definirati vlastite kriterije za procjenu svakog od 3V na način koji se čini najpovoljnijim za njihove vrste odluka.

Osim što bi olakšalo donošenje odluka, ovo bi također povećalo znanstvenu valjanost i ponovljivost rezultata istraživanja na životinjama. Iako je ovo očito važno iz znanstvenih razloga, važno je i iz etičkih razloga, jer pomaže u izbjegavanju rasipanja životinja zbog neuvjerljivih istraživanja i nametanja nepotrebne štete laboratorijskim životinjama.

LITERATURA:

Bateson, P. (1986) When to experiment on animals. *New Sci.* 109, 30-32.

Hanno Würbel (2017) More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Labanimal*, Volume 46, No 4. p.164-166.

Henderson et al. (2013) Threats to Validity in the Design and Conduct of Preclinical Efficacy Studies: A Systematic Review of Guidelines for In Vivo Animal Experiments. *PLOS Medicine*, Vol. 10:7, e1001489.

Ioannidis, J.P.A. (2005) Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2, e124.

Van der Stay et al. (2009) Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav and Brain Func*, Feb 25, 5:11. doi:10.1186/1744-9081-5-11

Predstavljamo

GENETSKO OSIGURANJE KVALITETE I GENETSKO PRAĆENJE LABORATORIJSKIH MIŠEVA I ŠTAKORA: IZVJEŠTAJ RADNE SKUPINE FELASA

F. Benavides, T. Rulicke, J.-B. Prins, J. Bussell, F. Scavizzi, P. Cinelli, Y. Herault, D. Wedekind

Laboratory Animals, 2019

Prevela i prilagodila
Gordana Nedić Erjavec

Osiguranje genetske kvalitete (QA), uključujući genetsko praćenje (GeMo) srođenih sojeva i pozadinsku karakterizaciju (BC) genetski izmijenjenih (GA) životinjskih modela, trebalo bi biti bitna komponenta bilo kojeg programa osiguranja kvalitete u laboratorijskim objektima za životinje. Genetska kontrola kakvoće jednako je važna za osiguravanje valjanosti životinjskog modela kao i praćenje zdravlja i mikrobiologije. Trebalo bi zahtijevati da studije na laboratorijskim glodavcima, uglavnom miševima i štakorima, koriste genetski definirane životinje. Ovaj rad, koji je predstavila FELASA-ina radna skupina za genetsko

osiguranje kvalitete i genetsko praćenje laboratorijskih miševa, opisuje ciljeve i dostupne metode za genetske programe osiguranja kvalitete u objektima za glodavce. Glavni ciljevi bilo kojeg genetskog programa osiguranja kvalitete su: (a) provjera autentičnosti i ujednačenosti srođenih sojeva i podsojeva, čime se osigurava genetski pouzdano održavanje kolonije; (b) otkrivanje moguće genetske kontaminacije i (c) precizno opisivanje genetskog sastava linija GA. Iako se ova publikacija uglavnom usredotočila na genetsku provjeru kvalitete miševa i štakora, principi će se primijeniti i na druge vrste glodavaca, od kojih su neke ukratko spomenute u kontekstu srođenih i nesrođenih sojeva.

STANDARDIZIRANI
LABORATORIJSKI GLODAVCI

Srođeni sojevi

Prema Međunarodnom odboru za standardiziranu genetsku nomenklaturu miševa i Odboru za nomenklaturu genoma štakora, srođeni soj je onaj koji se razmnožava sistematskim parenjem braće sa sestrama (ili mlađeg roditelja s potomstvom) tijekom 20 ili više uzastopnih generacija, a jedinke soja mogu se pratiti do jednog para predaka u dvadesetom ili sljedećem naraštaju.

Pritom će životinje unutar populacije prosječno zabilježiti $\leq 2\%$ zaostale heterozigotnosti, a jedinke se mogu smatrati genetski identičnim (izogenim).¹ Međutim, procjenjuje se da su potrebne 24 generacije parenja braće i sestara kako bi se postigla stopa heterozigotnosti $<1\%$ te 36 generacija kako bi se postigla (gotovo) potpuna

izogenost.² Izogenost podrazumijeva histokompatibilnost, što znači da su sojevi singenični. Sinegene životinje trajno će prihvatići transplantaciju tkiva bilo koje jedinke istog soja i spola.

Za razliku od kloniranih životinja i monozigotnih blizanaca (koji su 100% identični za sve genomske lokuse), srođeni glodavci, osim što su izogeni, su i homozigoti na gotovo svim genomskim lokusima. Ukratko, svaki srođeni soj predstavlja jedinstveni, premda slučajni assortiman alela.³ Ako bi se soj stvarao ispočetka, koristeći iste izvore, nakon istih 20 generacija srođivanja, zbog slučajne raspodjele i zadržavanja alela, nastao bi genetski različit soj.

Osnovni fenotipski podaci za najčešće srođene sojeve miševa dostupni su zahvaljujući koordiniranim međunarodnim naporima pokrenutim od strane Laboratorija Jackson i uspostavljeni putem baze podataka 'The Mouse Phenome Database' (<http://phenome.jax.org/>).⁴

Internetska stranica 'The Mouse Genome Informatics' (MGI)⁵ nudi popis, koji je sastavio dr. Michael Festing (http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi), 420 srođenih mišjih i 230 srođenih štakorskih sojeva (od kojih su neki izgubljeni ili ukinuti), zajedno s kratkim opisima. Popis uključuje široko korištene srođene sojeve miševa A/J, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, FVB/N i druge te sojeve štakora ACI, BN, F344, LE i WKY.

Nesrođeni sojevi

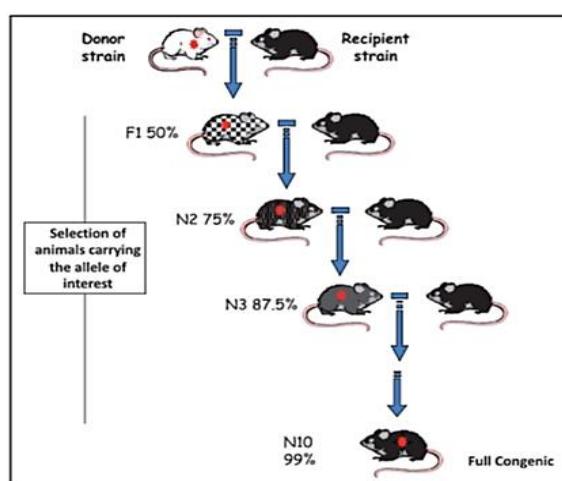
Nesrođeni sojevi su populacije laboratorijskih životinja koje se razlikuju od srođenih sojeva po tome što su genetski heterogene. U usporedbi sa srođenim sojevima ili F1 hibridima, genetska konstitucija dane životinje, nasumično uzete iz nesrođenog soja, nije unaprijed poznata. Međutim, sve životinje u skupini dijele skupne karakteristike (identitet), kao što su albino (iako nisu svi nesrođeni miševi ili štakori albino), laka uzgojivost i relativna pitomost u usporedbi s drugim sojevima, što su sve značajke koje ove životinje čine vrlo popularnim kao hraniteljima kod tehnika potpomognute reprodukcije.

Primjeri nesrođenih sojeva miševa su ICR (CD-1), CFW i NMRI (svi izvedeni od izvornih 'švicarskih' miševa koje je u SAD uvela Clara J. Lynch 1926.) i (nešvicarski) CF-1. Primjeri nesrođenih štakora su Sprague Dawley (SD), Wistar (WI) i Long-Evans (LE). Budući da nesrođeni sojevi nisu genetski definirani, kontrola kvalitete obično se temelji na procjeni očekivanih fenotipskih svojstava, poput boje dlake, rasta i reproduktivnih karakteristika, na temelju podataka iz velikih kolonija komercijalnih uzgajivača.

Budući da su nesrođene kolonije, poput ljudske populacije, heterogene, često se koriste u toksikološkim i farmakološkim istraživanjima.⁶ Međutim, nekoliko genetičara je osporilo tu praksu i kritiziralo studije u kojima su nesrođeni miševi korišteni neprimjereno, trošeći živote životinja i dragocjene resurse u suboptimalnim eksperimentima.⁷

Ostali standardizirani sojevi miševa i štakora

Hibridi F1 proizlaze iz križanja dvaju odvojenih srođenih sojeva i heterozigotni su na svim lokusima za koje roditeljski sojevi imaju različite alele. Sve jedinke F1 legla su genetski identične i histokompatibilne. Kongeni sojevi nastaju križanjem dva soja: soja donora koji nosi alel ili kromosomsko područje od interesa i soja primatelja ili pozadine koji će primiti lokus od interesa. Potomci F1 generirani križanjem davatelja i primatelja se povratno križaju sa sojem primatelja. Identificiraju se potomci koji nose alel od interesa i povratno križaju s pozadinskim sojem. Taj se postupak obično ponavlja tijekom 10 ili više uzastopnih generacija (slika 1), osim ako se ne koristi povratno križanje potpomognuto biljegom (brzi kongenici). Ponovljeno povratno križanje dovodi do toga da kromosomi pozadinskog soja progresivno zamjenjuju one donorskog soja, osim kromosomske regije koja nosi alel od interesa.



Slika 1. Shema predstavlja slijed koraka u uspostavljanju kongeničnog soja.

Genetski izmijenjeni (*genetically altered; GA*) glodavci

Prije predstavljanja različitih vrsta GA glodavaca, valja spomenuti da u osnovi postoje dva različita pristupa karakterizaciji genske funkcije. Izravna genetika (od fenotipa do genotipa) ima za cilj karakterizirati promjenu gena koja je odgovorna za specifični mutirani fenotip (tipično iz spontanih ili kemijski induciranih mutacija). Obrnuta genetika je suprotan pristup i ima za cilj karakterizirati funkciju gena analizirajući posljedice (na fenotipskoj razini) promjena koje su znanstvenici projektirali na razini DNA.

Ovaj odlomak predstavlja četiri osnovne vrste GA glodavaca, one stvorene: (a) pronuklearnom mikroinjekcijom, (b) vektorski posredovanom transgenezom (c), homolognom rekombinacijom u matičnim embrionalnim (ES) stanicama, (d) nukleazama za krojenje gena i (e) ili kemijski induciranim ili spontanim mutacijama. Objavljeni su detaljni opisi tehnologija korištenih za stvaranje GA.⁸ Prije odabira tehnike krojenja gena za stvaranje genetski modificirane životinje, važno je provjeriti odgovarajuću bazu podataka, poput onih koje održavaju 'The Jackson Laboratories' i 'International Mouse Phenotyping Consortium', kako bi se vidjelo postoji li već odgovarajući životinjski model.

Transgenija pronuklearnom mikroinjekcijom

Transgeni miševi uvedeni su početkom 1980-ih⁹ i bili su prve transgene životinje. Poželjno je koristiti izraz

'transgeni' samo za životinje čiji su geni promijenjeni slučajnim umetanjem DNA. Brojni su pojmovi koji se koriste za opis genetskih promjena na životinjama: miševi dobiveni genetskim inženjerstvom (*genetically engineered mice*; GEM) ili genetski modificirani miševi (*genetically modified mice*; GMM) tipično se koriste za opisivanje bilo koje vrste genetske modifikacije u mišu. Također, koristimo izraz GA glodavac kako bismo opisali one koji nose spontane ili kemijski inducirane mutacije, te izraz 'linija' umjesto 'soj' za GA glodavce.

Transgeni glodavci gotovo su isključivo stvoreni pronuklearnim mikro-injektiranjem stranih fragmenata DNA izravno u jedan od dva pronukleusa jednostaničnog embrija (zigota), što je tehnika koja se još uvijek često koristi. U ovom procesu aditivne transgeneze, mikroinjektirani transgen nasumično se integrira u genom kao pojedinačna kopija ili češće kao konkometar s promjenjivim brojem kopija. Modeli miša i štakora stvorenji ovim sustavom obično eksprimiraju ili, u rezultirajućem konkatemeru, prekomjerno eksprimiraju, transgen stavljaju pod kontrolu tkivno-specifičnog, razvojno-specifičnog ili ubikvitarnog promotora (zajedno s ostalim regulatornim elementima), što je sve sadržano u konstrukciji transgene DNA. Preporučeni generički simbol za transgenu inserciju je Tg.

Osnivačke transgene životinje su hemizigotne za DNA segment i označene su Tg/0. Transgeni su dodatni segmenti DNA koji nemaju odgovarajući slijed divljeg tipa u

nemodificiranom homolognom kromosomu kod hemizigotnih životinja, zbog čega se preporuča upotreba '0' umjesto '+' (obično se koristi za označavanje alela divljeg tipa). Svaka transgena linija generirana slučajnom integracijom stvara jedinstveni životinjski model i svaki se potencijalni osnivač mora razvijati neovisno.

Tradicionalno, kako bi se razlikovalo homozigotne (Tg/Tg) i hemizigotne (Tg/0) miševe, miš od interesa je križan s netransgenim partnerom i potomci su statistički analizirani na Mendelovsku segregaciju transgena. Suvremenija tehnika koristi kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) za razlikovanje hemizigotnih od homozigotnih transgenih miševa.¹⁰

Kako bi se postigla čista genetska podloga (preporučeno), transgen se mora uvesti u embrije koji potječu od srođenog soja. Kasniji napredak u konstruktima korištenih u transgenezi bilo je uvođenje inducibilnih sustava u kojima se ekspresija transgena može uključiti i isključiti. Primjeri ove strategije su ekspresijski sustavi Tet-on i Tet-off. U tim se sustavima transkripcija datog transgena stavljaju pod kontrolu tetraciklin-kontroliranog trans-aktivatorskog proteina, koji se može regulirati, reverzibilno i kvantitativno, izlaganjem transgenih miševa ili tetraciklinu (Tc) ili jednom od njegovih derivata, poput doksiciklina (Dox). I Tet-on i Tet-off su binarni sustavi koji zahtijevaju stvaranje dvostrukih transgenih (bigenskih) miševa.¹¹

Transgeneza posredovana vektorima

Alternativne metode za transgenezu slučajnim integriranjem temelje se na vektorima različitog podrijetla. Najvažniji i vrlo učinkoviti su retrovirusni/lentivirusni vektori¹² i transpozoni.¹³ Također se prethodno tretirani spermatozoidi uspješno koriste kao vektori u kombinaciji s intracitoplazmatskom injekcijom sperme (*intracytoplasmic sperm injection; ICSI*).¹⁴

Svaka tehnika ima prednosti i nedostatke te odgovarajući princip integracije transgena može utjecati na kvalitetu dobivenih GA modela. Na primjer, virusni vektori i transpozoni se integriraju kao jedna kopija, međutim višestruke integracije, nasumično distribuirane u genomu, nisu rijetkost. Pritom najviše zabrinjava utjecaj prijenosa gena posredovanog spermom na genetski materijal sperme, moguće izazvan predtretmanom spermatozoida.¹⁵

Ciljana mutageneza homolognom rekombinacijom pomoću ES stanica

Druga važna tehnologija koristi mišje embrionalne matične (ES) stanične linije. Embrionalne matične stanice su nediferencirane, pluripotentne embrionalne stanice dobivene iz unutarnje stanične mase preimplanacijskih blastocista koje mogu sudjelovati u stvaranju loze zmetnih stanica kimernih miševa, što je neophodan korak u stvaranju osnivačkih miševa koji nose ciljanu mutaciju.

Povijesno gledano, prve ES stanične linije izvedene su iz zmetaka obitelji

129 (129S2, 129P3, itd.), odnosno srođenih sojeva izvorno uzgojenih za izolaciju stanica embrionalnog karcinoma (EC). Danas su dostupne ES stanične linije mnogih mišjih sojeva, a one podrijetlom iz linije C57BL/6N su postale široko rasprostranjene i često se biraju za transnacionalne projekte (npr. EUCOMM).

U slučajevima kada konstitutivni multi aleli dovode do složenih fenotipova, smanjene održivosti ili imaju drugih nedostataka, mogu se koristiti uvjetni aleli, pritom omogućavajući kontroliranje vremena i tkiva u kojem je gen isključen, obično pomoću Cre/loxP sustava.¹⁶ Proizvodnja uvjetnih genskih 'nokautova' (KO) zahtijeva dvije neovisne linije, jednu koja daje izvor Cre rekombinaze, enzima izведенog iz bakteriofaga P1, u ispitivanom tkivu, i drugi koji sadrži loxP mjesta s obje strane slijeda DNA od interesa koje treba križati kako bi se generirali dvostrukou mutirani miševi. Enzim Cre reže i rekombinira tako 'označenu' DNA na loxP mjestima. Transgen Cre se može učiniti inducibilnim, čineći cijeli sustav sofisticiranim.

Široko se koristi tamoksifenom inducibilan Cre^{ERT2}, koji se može aktivirati na prostorno-vremenski način primjenom tamoksifena.¹⁷ Strategija Cre-loxP također se može koristiti za regulaciju ekspresije reporter-gena. Na primjer, gen lacZ može pokretati ubikvitarni promotor (npr. Rosa 26) sa stop sekvencom omeđenom loxP mjestima, koja sadrži nekoliko terminatorskih kodona umetnutih između promotora i lacZ kodirajuće sekvence.

Prekrojavanje gena pomoću nukleaza

Tijekom posljednjih 10 godina razvijen je niz novih tehnika za proizvodnju ciljanih mutacija pomoću konstruiranih nukleaza. Te tehnike, ovdje kratko opisane, pružaju metode neovisne o ES stanicama za stvaranje ciljanih mutacija u laboratorijskih miševa, štakora i drugih vrsta.

Kako bi se postigle mutacije pomoću cinkov prst nukleaza (*zinc-finger nucleases; ZFN*), moraju se dizajnirati dva komplementarna i za sekvencu specifična peptida s više prstiju koji sadrže domenu FokI nukleaze. Svaki je peptid dizajniran da prepozna određenu sekvencu DNA koja obuhvaća 9-18 baznih parova (bp) s obje strane 5-6 bp sekvence, što definira ciljano područje. Kada se ubrizgaju u pronukleus ili citoplazmu zigota, ZFN sklopovi čvrsto se vežu, po jedan na svaki lanac, s obje strane ciljanog mjesta. Dimerizirana FokI endonukleaza tada stvara lomove dvolančane DNA (*double strand DNA breaks; DSBs*) koji pokreću stanične mehanizme za popravljanje štete.

Šteta se obično popravlja homologijom usmjerениm popravkom (*homology-directed repair; HDR*) ili nehomolognim spajanjem krajeva (*non-homologous end joining; NHEJ*). HDR zahtijeva homologni predložak koji će voditi popravak i tako ponovo uspostavlja izvornu sekvencu. NHEJ je mnogo manje precizan i uzrokuje delecije nukleotida koji dovode do pomaka okvira koji stvaraju potencijalne krvne ili mutacije gubitka funkcije.

Miševi i štakori koji nose nulte alele ili modifikacije specifične za sekvene već su proizvedeni uporabom ZFN tehnologije.¹⁸ Kao i ZFN, tehnologija efektorske nukleaze nalik na transkripciji aktivator (*transcription activator-like effector nuclelease; TALEN*) uključuje kombinaciju nespecifične DNA endonukleaze spojene za DNA vezujuću domenu, ali se može lakše konstruirati (u usporedbi sa ZFN-om) tako da cilja određenu sekvencu DNA.

Sustav CRISPR/Cas (pri čemu se CRISPR odnosi na skupove pravilno razmaknutih kratkih palindromskih ponavljanja (*clusters of regularly interspaced short palindromic repeats*)), koji se obično koristi kao CRISPR/Cas9, temelji se na primitivnom obrambenom mehanizmu koji omogućuje bakterijama i arhejama da se bore protiv zaraze virusima, plazmidima i fagima.¹⁹ Na CRISPR-u temeljene RNA vodiči (gRNA) su dizajnirane na način da usmjeravaju Cas endonukleazu na rezanje DNA na željenom mjestu kroz RNA vođeni procijep DNA. RNA-vodjene endonukleaze mogu se konstruirati da cijepaju gotovo svaku sekvencu DNA prikladnim dizajniranjem gRNA, na primjer za dobivanje KO miševa.²⁰

CRISPR/Cas tehnologija ima nekoliko prednosti u odnosu na ZFN i TALEN. Glavna prednost je jednostavnost dizajna i fleksibilnost korištenja RNA specifične za sekvencu u interakciji s enzimom Cas umjesto složenog proteina specifičnog za slijed (DNA vezujuća domena) spajenog s nukleazom. Mutacije u više gena mogu

biti postignute u jednom koraku ubrizgavanjem u miševe više gRNA koje istovremeno ciljaju različite gene.²¹

Takvo višestruko uređivanje gena uspješno je u stanicama, kao i u embrijima miša i štakora.²⁰ CRISPR / Cas9 je korišten za stvaranje insercija, delecija i točkastih mutacija. Sustav je vrlo fleksibilan, brz i učinkovit i predstavlja revoluciju genetičkog inženjerstva kod sisavaca.²² Omogućuje stvaranje KO i 'nokin' (KI) linija u bilo kojem genetskom okruženju. DNA se može ubaciti elektroporacijom (uz ograničenja veličine) ili ubrizgati u citoplazmu ili pronukleuse jednostaničnih ili dvostaničnih embrija, čime se izbjegava uporaba ES stanica i kimera.

Međutim, kako je svaka konstruirana životinja jedinstvena, ova tehnologija zahtijeva opsežnu analizu sekvenci kako bi se okarakteriziralo više potencijalnih životinja utemeljitelja te osigurala prisutnost željene mutacije i odsutnost neželjenih mutacija unutar i izvan ciljane sekvence ili nepredvidivih većih promjena genoma,^{23,24} uz istovremenu identifikaciju mozaičnih životinja utemeljitelja (G0). Jednom identificirana, odabrana životinja utemeljitelj trebala bi se uzbajati s divljim životnjama kako bi se procijenio prijenos mutacije.

Spontane i kemijski inducirane mutacije

Popis vrsta GA glodavaca nije potpun bez uključivanja spontanih i kemijski induciranih mutacija. Spontane

mutacije, obično identificirane promatranjem abnormalnog fenotipa, imaju nekoliko prednosti. Prvo i najvažnije, postižu se gotovo bez troškova i općenito su slobodno dostupni. Drugo, s obzirom da se identificiraju na temelju promatranja, obično imaju očiti fenotip. Treće, spontane mutacije predstavljaju veliku raznolikost molekularnih događaja, kao što su delecije, insercije i točkaste mutacije, generirajući ne samo alele gubitka funkcije već i hipomorfne i hipermorphne alele. Konačno, mutacije nastaju u različitim sredinama, uključujući srođene i nesrođene sojeve.

Nekoliko spontanih mutacija rezultiralo je modelnim glodavcima za ljudska stanja. Tu spadaju klasične mutacije poput gole (*Foxn1^{nu}*), teške kombinirane imunodeficijencije (*Prkd^{cscid}*), bez dlake (*Hr^{hr}*), dijabetesa (*Lep^{rb}*), pretilosti (*Lep^{ob}*) i X-vezane mišićne distrofije (*Dmd^{mdx}*) kod miša te mutacije kod modela golih Rowett (*Foxn1^{rnu}*) štakora i Zuckerovih štakora modela dijabetesa (*Lepr^{fa}*).

Otkriće izvanrednih vrlina alkilirajućeg agensa N-etil-N-nitrozo-uree (ENU) kao mutagena bilo je prekretnica u povijesti genetike miša. Znanstvenici su korištenjem ENU-a generirali i propagirali brojne mutirane alele kodirajućih gena, čime su uspostavili dragocjeni alat za anotaciju genoma. Budući da ENU obično stvara točkaste mutacije, široko se koristi u pregledima izravne genetike. Glavni nedostatak mutogeneze izazvane ENU-om je taj što ona stvara slučajne, a ne ciljane mutacije. Pokrenuto je nekoliko projekata za sustavno i opsežno

fenotipiziranje potomaka mužjaka dobivenih mutagenezom ENU-om. Veliki programi mutageneze ENU-om provedeni su u Njemačkoj, Engleskoj i SAD-u.²⁵

Osiguranje kvalitete i razmjena GA glodavaca

Što provjeriti nakon ('in-house') proizvodnje ili kod nabavke GA glodavca? Mogućnost križanja različitih GA linija u kombinaciji sa sve većom složenošću ciljnih pristupa uvelike je povećala broj dostupnih GA modela. Potreba za križanjem različitih GA linija u svrhu specifičnih istraživanja dodatno povećava složenost, posebice na razini genetske podloge.

Mnogi su mutanti nastali i još uvijek se stvaraju na hibridnoj genetskoj podlozi. Stoga je neophodno voditi adekvatnu evidenciju detaljnih informacija za sve genetski modificirane sojeve. Te se informacije moraju prenijeti zajedno sa sojem svim suradnicima i korisnicima. Najvažniji podaci uključuju točno ime soja, cjelovit opis mutacije, genetsku podlogu životinja, protokol genotipizacije i uočene fenotipske promjene. Sve to zajedno čini minimum podataka za preporučenu 'putovnicu glodavaca', a postoji nekoliko obrazaca dizajniranih za katalogizaciju tih podataka. Preporučujemo tehnički list koji je izradila FELASA-ina radna skupina za unaprijeđenje metoda za genotipizaciju genetski modificiranih glodavaca.²⁶

Svako ime mutiranog soja mora pružiti precizne informacije o zahvaćenom genu, vrsti mutacije i genetskoj podlozi.

Za 'in-house' dobivene sojeve, laboratorij iz kojeg je mutant potekao mora posjedovati registracijski kod dodijeljen od strane Instituta za laboratorijske životinje (*Institute for Laboratory Animal Research Laboratory; ILAR*).

Pregled važnosti nomenklature nalazi se u 'FELASA-inim smjernicama za proizvodnju i nomenklaturu transgenih glodavaca'.²⁷ Ime dizajnirano prema međunarodnim pravilima nomenklature jedino je sredstvo za jednoznačno razlikovanje sojeva. To je važno kada se isti soj održava u različitim objektima širom svijeta i/ili je naveden u arhivama i bazama podataka. Nadalje, neophodno je da se sojevi pravilno opisuju u publikacijama pomoću univerzalne nomenklature. Bez zajedničke nomenklature postaje nemoguće precizno predstaviti rezultate znanstvenog istraživanja. Nejasna ili nepotpuna imena stvaraju pogreške zbog kojih se eksperimenti ne mogu reproducirati.

Podrijetlo i posljedice genetskih varijacija

Ozbiljan izazov s kojim se suočavaju objekti za glodavce je održavanje srođenih sojeva genetski čistim te GA linija na definiranoj pozadini. Promjene u genetskoj strukturi srođenih sojeva mogu se proizvesti (a) kontaminacijom slučajnim križanjima i (b) genetskim odstupanjem zbog rezidualne heterozigotnosti ili zadržavanja de novo spontanih mutacija.

Genetska kontaminacija

Slučajno parenje jedinki iz jednog srođenog soja sa životnjama drugog podrijetla daleko je najvažniji izvor promjena genetskog profila u srođenih sojeva. Genetska kontaminacija ove vrste, koja uvijek rezultira iznenadnom i masivnom izmjenom alela, vjerojatnija je između sojeva koji imaju sličnu boju dlake (npr. albino (*Tyr^c/Tyr^c*), agouti (*A/A*) ili ne-agouti (*a/a*)). Potreban je poseban oprez ukoliko su linije s istim alelima za boju dlake smještene u neposrednoj blizini.

Spontane mutacije i polimorfizmi

Spontane mutacije izvor su nekontrolirane genetske varijacije koje je često nemoguće otkriti jednostavnim fenotipskim promatranjem ili rutinskim genetskim nadzorom (*genetic monitoring*; GeMo). Genetski polimorfizam je prisutnost alternativne sekvene DNA (aleli) na pojedinom lokusu unutar jedinki, skupina ili populacija, s učestalošću većom od 1%. Dvije vrste genetskih markera obično se koriste u asociacijskim studijama i genetskoj kontroli kvalitete: mikrosateliti i polimorfizmi zamjene jedne baze (*single nucleotide polymorphisms*; SNP) (vidi 'Sustavi biljega' u nastavku).

Genetski pomak i stvaranje podsojeva

Iako trajno srođivanje učinkovito eliminira udio novih mutiranih alela, druga neotkrivena frakcija može se postupno ustaliti u homozigotnom stanju, zamjenjujući izvorni alel što je postupak poznat kao genetski pomak. Genetski pomak nezamjenjivo doprinosi divergenciji sojeva i stvaranju podsojeva kada se isti soj

neovisno propagira na različitim mjestima.²⁸

Primjera mišjih podsojeva ima na pretek, na primjer postoji oko 10 dokumentiranih BALB/c podsojeva i oko 15 podsojeva C57BL/6, uključujući podsojeve J i N iz Jackson Laboratorija (Jax), odnosno Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH).²⁹ Jednako tako, mnogi sojevi srođenih štakora imaju najmanje dva podsoja, na primjer soj SHR ima najmanje četiri podsoja (uključujući SHR/Ola i SHR NCrl), dok WKY i F344 imaju najmanje po tri podsoja. Varijabilnost tih štakorskih podsojeva potvrđena je sekvencijskom analizom,³⁰ pri čemu WKY pokazuje najviši stupanj varijacije podsoja (to je dijelom posljedica opskrbe modelom prije no što je propisano srođivanje kroz 20 generacija).

Nepoželjne 'passenger' mutacije

Mutacije skrivene u genomima podsojeva ili GA linija koje mogu utjecati na ishod eksperimenta, ponekad se nazivaju i 'passenger' mutacijama.³¹ U literaturi ima mnogo primjera gdje su podsojevi podrijetlom iz istog srođenog soja stekli nove fenotipove kao posljedicu genetskog pomaka.³²

Primjerice, miševi podsoja C57BL/6JOlaHsd su homozigoti za delekciju gena za α-sinuklein (Snca) i multimerin (*Mnrrn1*).^{33,34} Isto tako, neke spontane mutacije su dovele do odvajanja C57BL/6J i C57BL/6N, najčešćih podsojeva soja C57BL/6, odvojenih 1951. godine. Uključuju mutaciju degeneracije mrežnice u genu *Crb1* (*Crb1^{rd8}*), prisutnu samo u N

podsoju, i deleciju u genu *Nnt*, prisutnu samo u podsustavu J.^{35,36}

Berghe i suradnici nedavno su izvijestili da su 'passenger' mutacije također česte u većini GA linija izvedenih iz 129 ES stanica te da te mutacije opstaju i nakon stvaranja potpuno kongenih sojevi.³⁷ Otkriće nije trivijalno te su Berghe i sur. procijenili da bi se blizu 1000 kodirajućih gena moglo nepravilno eksprimirati u kromosomskim segmentima izvedenim iz stanica 129 koji se još uvijek odvajaju u tim kongenim linijama. Ovo otkriće naglašava potrebu za pravilnim odabirom kontrolnih životinja kako bi se identificirali fenotipovi nastali uslijed pozadinskih mutacija ili kombinacije pozadinskih mutacija i genetske modifikacije od interesa, a ne samom modifikacijom.

Važnost korištenja standardne nomenklature

Pravila koja vode nomenklaturu utvrdio je Međunarodni odbor za standardiziranu genetsku nomenklaturu miševa i štakora te se ona kontinuirano ažuriraju. Ta pravila, posljednji put revidirana u siječnju 2016. godine, opisana su na web stranici MGI u odjeljku 'Smjernice za nomenklaturu sojeva miša i štakora' (<http://www.Informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>).

Koristan i vizualan Brzi vodič za nomenklaturu miša dostupan je na <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/geneticsand-nomenclature#>.

Programi genetske kontrole kvalitete

Trenutni zlatni standard za genetsku kontrolu kvalitete laboratorijskih glodavaca se oslanja na polimorfne genetske biljege kako bi se razlikovale različite genetske podloge. Genetski biljezi su specifične sekvene DNA s poznatim mjestom na kromosomu i ključni su alati za genetsku kontrolu kvalitete. Genetska kontrola kakvoće presudna je za određivanje genetskog sastava životinje i utvrđivanje ujednačenosti i autentičnosti soja. Imajte na umu da se nesrođene kolonije ne mogu testirati na autentičnost. Umjesto toga, kolonija se provjerava na razinu genetske heterogenosti kako bi se otkrile genetske kontaminacije i pratio napredak uzgojnih programa i odabira budućih uzgojno valjanih životinja.

Sustavi biljega

Kod miša i štakora su opisani mnogi polimorfizmi, međutim u trenutnim programima osiguranja kvalitete samo se mikrosateliti i SNP-ovi koriste kao genetski biljezi. Mikrosatelitski biljezi, poznati i kao polimorfizmi duljine jednostavne sekvene (*Simple Sequence Length Polymorphisms*; SSLP) ili kratka uzastopna ponavljanja (*Short Tandem Repeats*; STR), i dalje se koriste u modernim GeMo programima, jer su jeftini i jednostavniji.^{38,39}

Životinje se genotipiziraju analizom PCR produkata umnoženih iz kratkih, uzastopno raspoređenih, ponavljujućih sekveni DNA. Ponavljanja su obično duga 2–6 bp i ponavljaju se nekoliko do desetke puta stvarajući alelnu raznolikost među sojevima. Početnice genomske DNA su dizajnirane za

jedinstvene sekvence koje okružuju ponavljanja. PCR produkti, tipično veličine oko 100-300 bp, analiziraju se pomoću agarozne ili poliakrilamidne gel elektroforeze. MGI web stranica sadrži sveobuhvatne SSLP informacije, uključujući sekvence početnica i varijacije u veličini u bp za nekoliko srođenih sojeva miša (<http://www.informatics.jax.org/marker>).

Zbirka mapiranih, visoko polimorfnih, SSLP biljega za srođene laboratorijske sojeve štakora dostupna je u Nacionalnom projektu BioResource - baza podataka o štakorima i povezana je s Izvještajem o mapi baze podataka o genomu štakora (*Rat Genome Database*; RGD) (<http://rgd.mcw.edu>). Genotipizacija obzirom na SNP-ove je alternativa mikrosatelitima koja se danas široko koristi za GeMo. Takva genotipizacija je jeftina i može se izvoditi u većini istraživačkih institucija ili prepustiti vanjskim partnerima.

SNP-ovi su najčešće genetske varijacije i postoje u kodirajućim i nekodirajućim regijama. Gotovo svi SNP-ovi su dvoalelni, prezentirajući u jedinci jedan od samo dva moguća nukleotida (npr. homozigotni G/G ili T/T), ili oba (npr. heterozigotni G/T). Petkov i suradnici iz Jackson Laboratorija opisali su alelnu raspodjelu 235 SNP-ova u 48 sojeva miša i odabrali paletu od 28 SNP-ova dovoljnih za karakterizaciju većine od otprilike 300 srođenih, sojeva divljeg porijekla, prirođenih, konzomičnih i rekombinantnih srođenih sojeva koji se održavaju u Jackson Laboratoriju.⁴⁰ Nekoliko publikacija je izvijestilo o korisnim SNP-ovima za štakore. Na primjer, Zimdahl i kolege opisali su

mapu s više od 12 000 SNP-ova na temelju gena iz transkribirajućih regija.⁴¹

GeMo srođenih i nesrođenih sojeva

Većina GeMo tehnika koje se trenutno koriste temelje se na mikrosatelitima ili SNP-ovima. Međutim, GeMo se ne bi trebao oslanjati samo na molekularne tehnike, već bi trebao zauzeti šire stajalište koje uključuje fenotipske parametre poput boje dlake, ponašanja i uzgojnih karakteristika. Komercijalni uzgajivači izuzetno su senzibilizirani na rizik genetske kontaminacije i redovito nadgledaju svoje sojeve zbog genetske kontaminacije, ali ne nužno i genetskog pomaka, koristeći različite skupove SNP-ova za praćenje njihovih izvornih kolonija.

Laboratorij Jackson uključio je jedinstveni, patentirani Program genetske stabilnosti⁴² osmišljen kako bi učinkovito ograničio kumulativni genetski pomak kroz obnavljanje svojih temeljnih zaliha od rodoslovnih, krio konzerviranih embrija svakih pet generacija. Na primjer, počevši od 2005. godine, počeli su prodavati samo miševe C57BL/6J dobivene od dva odabrana miša kroz stotine njihovih smrznutih zametaka (dovoljno da traju 25-30 godina). Treba napomenuti da prilikom oporavka sojeva iz smrznutih zaliha treba provoditi dobar GeMo kako bi se osiguralo da genetska kontaminacija ili pogrešni genotipovi nisu bili prisutni prije zamrzavanja. Kod nesrođenih sojeva, GeMo pomaže u očuvanju genetske heterogenosti i bazena alela kolonije. Ovaj složeni postupak zahtjeva analizu velikog broja

životinja i usporedbu tih podataka s povijesnim podacima koji dokumentiraju prisutne alele, njihovu učestalost i razinu heterozigotnosti u određenoj koloniji. U nekim slučajevima rezultati mogu otkriti gubitak genetske varijabilnosti što rezultira kolonijom s vrlo niskom heterogenošću.

Stupanj genetske heterogenosti u nesrođenim kolonijama ovisi o njihovoj povijesti. Niska heterogenost može biti rezultat lošeg odabira buduće uzgojne zalihe, odstupanja od odobrenih (rotacijskih) uzgojnih sustava ili efekta uskog grla uzrokovanih malim uzgojnim bazenom, što je uobičajeno kada se uvozi mala skupina uzgojno valjanih životinja ili se koristi za ponovno uspostavljanje kolonije. Suprotno tome, visoka heterogenost može rezultirati nedavnim križanjem.

Općenito, nesrođeni sojevi karakteriziraju se mjerljivim fenotipskih svojstava i izračunavanjem odgovarajuće srednje vrijednosti i standardnih devijacija. U osnovi, genetska kontrola nesrođenih sojeva usmjerena je na izbjegavanje križanja u srodstvu ta na stabiliziranje genetske raznolikosti tijekom velikog broja generacija.

GeMo srođenih miševa i štakora dobivenih 'in-house'

Ovdje je najbolja preporuka kupiti životinje od pouzdanih prodavača i zamijeniti uzbunjalište životnjama istog dobavljača nakon 10 generacija, umjesto da se održavaju neovisne kolonije klasičnih srođenih sojeva. Kao dodatna pogodnost, upotreba životinja

istog dobavljača omogućuje sprječavanje stvaranje podsojeva koji nakupljuju potencijalne mutacije i održavanje sličnog mikrobioma. Ipak, interne kolonije uvijek treba testirati pomoću malog seta informativnih mikrosatelitskih biljega ili SNP-ova kako bi se potvrdio integritet.

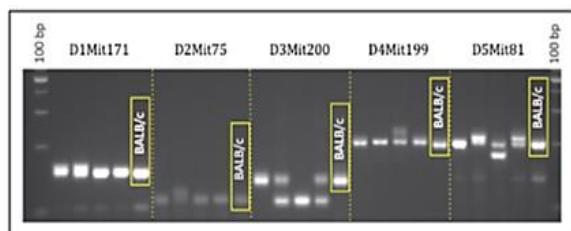
Korištenje malog skupa mikrosatelita (SSLP)

Mikrosateliti se mogu koristiti za provjeru jesu li životinje u srođenoj koloniji čiste, bez tragova genetske kontaminacije. To je posebno važno u objektima koji održavaju sojeve iste boje dlake u istoj sobi, što je posebno opasna praksa, osobito kada se ne koriste sustavi pojedinačno ventiliranih kaveza (*individually ventilated cage; IVC*). Mikrosatelitsko testiranje obično se može provesti interno.

Broj markera koji se koriste za ispitivanje nije standardiziran: svaka situacija i objekt razlikuje se po tome koji sojevi i koliko njih se čuva. Unatoč tome, set od 40 polimorfnih SSLP-ova, ravnomjerno raspoređenih po autosomima, isključit će nedavnu genetsku kontaminaciju, ako markeri mogu razlikovati sojeve koji se analiziraju. Tumačenje SSLP podataka je jednostavno.

Budući da su srođene životinje izogene i homozigotne, od njih će na elektroforetskom gelu proizaći samo jedan signal, koji predstavlja jedan alel kada se genotipizira za određeni SSLP. Prisutnost bilo kakve heterozigotnosti, naznačene dvama signalima ili signalima koji se ne podudaraju s DNA kontrolnog soja, treba smatrati

indikacijom potencijalne kontaminacije soja (Slika 2). Koliko često treba procjenjivati identitet soja kolonije, ovisi o veličini kolonije, generacijskom intervalu itd. Općenito, testiranje jednom u dvije godine razumno je za objekt koji održava mali broj kolonija dobro odvojenih u smislu boja krvna i s malim brojem uvoza.



Slika 2. Primjer genetičke kontaminacije detektiran s SSLP PCR.

Korištenje malog seta SNP-ova

Samo za potrebe GeMo-a, 40 polimorfnih SNP-ova, ravnomjerno raspoređenih po kromosomima, razuman je broj za otkrivanje nedavne genetske kontaminacije (ovu preporuku treba prilagoditi ovisno o uvjetima ili rizicima u svakoj ustanovi). SNP genotipizacija trenutno je dostupna na različitim platformama koje se razlikuju u troškovima i mogućnostima automatizacije. Kompetitivni PCR specifičan za alel (KASP), varijacija PCR-a specifičnog za alel, koristi alelno specifičnu oligo ekstenziju i prijenos energije fluorescentne rezonancije⁴³ te ima tu prednost što se može automatizirati korištenjem ploča s 96 ili 384 jažice i robota za pipetiranje.

Druga opcija, tehnologija PCR-a u stvarnom vremenu (TaqMan®), koja koristi specifične početnice zajedno sa

fluorescentno obilježenom TaqMan sondom specifičnom za sekvencu, učinkovita je i jednostavna za automatizaciju, međutim, cijena po pojedinačnom ispitivanju je viša u odnosu na KASP testove te zahtijeva skuplji uređaj za PCR u stvarnom vremenu.

Konačno, 'microarray' genotipizacija SNP-ova obično se ne koristi za interni GeMo, ali može biti opcija za dobavljače srođenih miševa. Kada koristite uslugu 'microarray' genotipiziranja, imajte na umu da će samo postotak SNP-ova biti polimorfan kod analiziranih sojeva (npr. oko 40% za neke klasične kombinacije srođenih sojeva). Informacije o tome koje alele (C, G, A ili T) očekivati za određenu kombinaciju SNP/soj i njihov genomske položaj dostupni su za stotine tisuća SNP-ova i za uobičajene sojeve srođenih miševa i štakora u lako dostupnim bazama podataka i preglednicima genoma.

GeMo nesrođenih kolonija. GeMo nesrođenih sojeva je mnogo složeniji jer te životinje nisu genetski ujednačene. Nesrođene kolonije u osnovi su skupina blisko povezanih životinja, zajedničkih predaka i skupnog identiteta, ali koje pokazuju određenu razinu genetske heterozigotnosti.

Budući da nesrođene kolonije čine populaciju, a ne soj, teško je uspostaviti standardni program GeMo sa samo nekoliko genetskih markera. Međutim, s odgovarajućim brojem SNP-ova ili SSLP-ova, frekvencije alela unutar populacije mogle bi ukazivati na identitet soja.⁴⁴

Jedan od glavnih problema internih nesrođenih zaliha je taj što se često održavaju s vrlo malim brojem životinja u uzgojnoj koloniji, uzrokujući smanjenje broja alela zastupljenih u populaciji. To može utjecati na genetski pomak i povećati koeficijent srođenosti. Takve kolonije niti su uistinu nesrođene niti srođene. Iako se SSLP ili SNP mogu koristiti za procjenu razine heterozigotnosti unutar kolonije, ako nije moguće zadržati odgovarajući broj uzgojno valjanih životinja, bolje je kupiti nesrođene glodavce od prodavača koji održavaju veliku koloniju i koriste preporučene sheme uzgoja kako bi smanjili križanje u srodstvu.

Pozadinska karakterizacija (BC) za GA i mutirane linije

Eksplozija u broju GA linija pogoršava problem nedefiniranog 'mješovitog podrijetla' kod pokusnih glodavaca. To je posebno zabrinjavajuće za inducibilne i uvjetne modele koji zahtijevaju križanje dviju neovisnih linija (npr. linije koje izražavaju Cre križane s *loxP* linijama). S obzirom na to da genetska podloga utječe na fenotip, posebno utjecajem gena modifikatora, mutacije, spontane i inducirane, transgeni i ciljani aleli koji se uvode u novu pozadinu možda neće pokazivati očekivani fenotip.^{45,46}

Jedan od prvih slučajeva koji je prijavio ovaj fenomen uključivao je klasičnu mutaciju za dijabetesa (*Lepr^{db}*) koja je predstavljala prolazni dijabetes u podlozi C57BL/6, ali očit dijabetes u C57BLKS.⁴⁷ Ostali primjeri uključuju učinke podloge na stopu preživljavanja kod KO miševa za *Egfr* (receptor za

epidermalni faktor rasta)⁴⁸ i učestalost tumora kod KO miševa za *Pten*.⁴⁹ Iz tog razloga, svaka GA linija treba biti okarakterizirana u smislu njezine genetske podloge. Štoviše, znanje o genetskoj pozadini mutacija također je važno za odabir odgovarajućih kontrolnih životinja.⁵⁰

Ravnomjerno raspoređeni genetski biljezi koji pokrivaju čitav genom mogu se koristiti u skeniranju genoma za procjenu postotaka genoma koji dolaze iz različitih srođenih izvora. Ovaj proces BC-a pružaju neka komercijalna poduzeća i odgovarajuća postrojenja unutar institucije. Tipični BC koristi polimorfne markere kako bi razlikoval prepostavljene srođene sojeve.

U većini slučajeva miševa to su sojevi C57BL/6 i 129, jer su u prošlosti ES stanice korištene za razvoj KO i KI miševa homolognom rekombinacijom bile izvedene isključivo iz podsojeva 12951, dok su se obično ženke WT C57BL/6 koristile za dokazivanje prijenosa zametnih linija iz kimera. Bez naknadnih povratnih križanja, ova je shema rezultirala mješovitom pozadinom B6;129.

Međutim, dostupnost ES staničnih linija izvedenih iz drugih sojeva (posebno iz C57BL/6) i uvođenje tehnika uređivanja genoma koje omogućuju izravno stvaranje ciljanih promjena u bilo kojem soju miša ili štakora,⁵² polako mijenja ovaj scenarij. U svakom slučaju, problem mješovite pozadine može se potpuno zaobići (a) ubrizgavanjem transgena ili nukleaza (Cas9-sgRNA) u srođene embrije iz odabranog soja; (b) modificiranjem

gena od interesa u ES stanicama iz preferiranog pozadinskog soja (npr. korištenjem C57BL/6 ES stanica) i (c) križanjem kimera i osnovnog KO/KI-a s miševima istog soja kao ES stanice korištene za ciljanje.

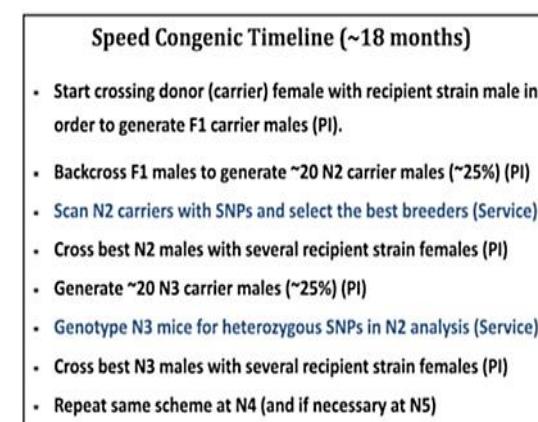
Napokon, ako je linija GA već razvijena ili je nabavljen, treba izvesti BC, a ako je potrebno, treba razviti potpuno kongeni soj, bilo klasičnim ili povratnim križanjem potpomognutim biljegom. Povremeno povratno križanje srođenog soja u pozadinski soj (renomiranoj izvoru) također minimalizira divergenciju i održava kongeni soj genetski blizu pozadine soja kontrolnih životinja.

Povratno križanje potpomognuto biljegom za osiguranje kvalitete i usavršavanje

Korištenje DNA biljega omogućilo je mnogo brži i rigorozniji proces razvoja kongenog soja koji se naziva povratno križanje potpomognuto biljegom ili 'brzi kongenici'.⁵³ Ovaj se postupak oslanja na upotrebu polimorfnih genetskih markera koji pokrivaju čitav genom za određivanje postotka donorskog genoma prisutnog u životinjama, zatim odabir životinja s najmanjim postotkom donorske DNA za sljedeće povratno križanje u soj primatelja.

To ovisi o regijama između polimorfnih genetičkih markera koje potječu od genoma davatelja: što je gušći broj markera, to se može bolje utvrditi genom donora. Uobičajena praksa je upotreba 100–300 markera. Ovim se postupkom približno za pola smanjuje broj generacija potrebnih za postizanje

pune kongenosti (npr. s N10 na N5), a time i vrijeme razvoja soja. Korištenjem povratnih križanja potpomognutih biljezima i pravog broja životinja možemo dobiti oko 80% pozadine primatelja na N2, oko 94% pri N3 i oko 99% pri N4 (u usporedbi s klasičnim srednjim vrijednostima od 75,0, 87,5 i 93,7%). Dijagram toka koji prikazuje protokol srođivanja standardne brzine prikazan je Slikom 3.



Slika 3. Slika predstavlja tipični vremenski slijed markerom prosredovanog (brzog kongeničnog) procesa povratnog križanja.

U idealnom slučaju, postupak povratnog križanja započinje sa ženkonom donorom i mužjakom primateljem. Onda će muški F1 mutant nositi ispravan Y-kromosom, a nakon parenja s primateljicom, mužjaci generacije N2 će nositi točne X- i Y-kromosome soja primatelja (izbjegavajući upotrebu genetskih markera na tim kromosomima).⁵⁴

Markel i sur. su predviđjeli da, ako se koristi 20 najboljih uzgojno valjanih životinja (nosača) u svakoj generaciji protokola 'brzih kongenika', više od 98% genoma primatelja može se postići

u N5.^{55,56} Međutim, kromosomski segmenti koji okružuju odabrani lokus teže će ostati povezani s njim, a to je ograničenje kongenih linija zbog potencijalne prisutnosti gena modifikatora u tim segmentima, što je takođvani 'problem susjednog gena'.⁵⁷

Programi genetske stabilnosti i krioprezervacije

Za srođene, koizogene i kongene sojeve, metode uzgoja i programi genetske stabilnosti pomažu u umanjivanju divergencije podsojeva uslijed genetskog pomaka, a također i u sprječavanju genetske kontaminacije slučajnim križanjima s drugim sojevima. Kako bi se smanjio genetski pomak, treba smanjiti broj generacija internog uzgoja, a linije predane u repozitorije poput JAX, EMMA, MMRRC, IMSR ili RIKEN arhivirati kao zamrznute embrije i/ili spermu.

To osigurava liniju i osigurava način za zamjenu uzgojne matice svakih 10 generacija, kako preporučuje Program genetske stabilnosti laboratorija Jackson (*The Jackson Laboratory Genetic Stability Program; GSP*), a kako bi se usporio kumulativni genetski pomak.⁴² Za nesrođene sojeve namjera je minimizirati križanje u srodstvu, održavati heterozigotnost i upravljati genetskim pomakom koji bi inače doveo do divergencije kolonija.

Idealno bi bilo da se nesrođene kolonije održavaju s oko 25 uzgojnih parova, koji svi moraju dati svoj doprinos sljedećoj generaciji, kako bi se izbjegao porast koeficijenta križanja u srodstvu po generaciji za više od 1%.

Manje kolonije brzo se udaljavaju prema homozigotnosti jer su uzgojne životinje usko povezane.⁵⁸ Usvojene su strategije krioprezervacije za dugo-ročno skladištenje embrija i spolnih stanica u nekoliko velikih centraliziranih spremišta, uključujući EMMA/INFRAFRONTIER (Europska arhiva mutiranih miševa), Knock Out Mouse Project (KOMP) Repository, The Jackson Laboratory Repository, The Center for Animal Resources and Development (CARD) i Riken Bio Resource Center koji laboratorijima mogu osigurati krioprezervirani materijal ili žive miševe.

Ta spremišta olakšavaju dostupnost ovih sojeva svjetskoj znanstvenoj zajednici i pružaju rezervu u slučaju gubitka nekog soja. Internetska baza podataka The International Mouse Strain Resource (IMSR) je baza sojeva miševa i mutiranih ES staničnih linija dostupnih u cijelom svijetu, uključujući srođene, mutirane i genetski modificirane sojeve (<http://www.findmice.org/>).

REFERENCE

1. Silver L. *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
2. Simecek P, Forejt J, Williams RW, et al. High-resolution maps of mouse reference populations. *G3* (Bethesda) 2017; 7: 3427–3434.
3. Guenet JL, Benavides F, Panthier J, et al. *Genetics of the Mouse*. Berlin: Springer, 2015.

4. Paigen K and Eppig JT. A mouse phenome project. *Mamm Genome* 2000; 11: 715–717.
5. Eppig JT. Mouse Genome Informatics (MGI) Resource: Genetic, genomic, and biological knowledgebase for the laboratory mouse. *ILAR J* 2017; 58: 17–41.
6. Chia R, Achilli F, Festing MF, et al. The origins and usesof mouse outbred stocks. *Nat Genet* 2005; 37: 1181–1186.
7. Festing MF. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol* 2010; 38: 681–690.
8. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, et al. Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 2003.
9. Gordon JW and Ruddle FH. Integration and stable germline transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; 214: 1244–1246.
10. Ballester M, Castello A, Ibanez E, et al. Real-time quantitativePCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques* 2004; 37: 610–613.
11. Gossen M and Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5547–5551.
12. Lois C, Hong EJ, Pease S, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by entiviral vectors. *Science* 2002; 295: 868–872.
13. Ivics Z, Mates L, Yau TY, et al. Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nat Protoc* 2014; 9: 773–793.
14. Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999; 284: 1180–1183.
15. Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008; 78:761–772.
16. Sauer B and Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5166–5170.
17. Feil S, Valtcheva N and Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol* 2009; 530: 343–363.
18. Carberry ID, Ji D, Harrington A, et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 2010; 186: 451–459.
19. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337: 816–821.
20. Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 154: 1370–1379.
21. Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by

- CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153: 910–918.
22. Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, et al. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun* 2014; 5: 4240.
23. Kosicki M, Tomberg K and Bradley A. Repair of doublestrand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 765–771.
24. Rezza A, Jacquet C, Le Pillouer A, et al. Unexpected genomic rearrangements at targeted loci associated with CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *Sci Rep* 2019; 9: 3486.
25. Nolan PM, Peters J, Strivens M, et al. A systematic, genome-wide, phenotype -driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet* 2000; 25: 440–443.
26. Bonaparte D, Cinelli P, Douni E, et al. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: A report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. *Lab Anim* 2013; 47: 134–145.
27. Rulicke T, Montagutelli X, Pintado B, et al. FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. *Lab Anim* 2007; 41: 301–311.
28. Peters H, Reifenberg K and Wedekind D. Substrains of Inbred Strains. GV-SOLAS Specialist Information, 2013.
29. Mekada K, Hirose M, Murakami A, et al. Development of SNP markers for C57BL/6N-derived mouse inbred strains. *Exp Anim* 2015; 64: 91–100.
30. Hermsen R, de Ligt J, Spee W, et al. Genomic landscape of rat strain and substrain variation. *BMC Genomics* 2015; 16: 357.
31. Kenneth NS, Younger JM, Hughes ED, et al. An inactivating caspase 11 passenger mutation originating from the 129 murine strain in mice targeted for c-IAP1. *Biochem J* 2012; 443: 355–359.
32. Stevens JC, Banks GT, Festing MF, et al. Quiet mutations in inbred strains of mice. *Trends Mol Med* 2007; 13: 512–519.
33. Specht CG and Schoepfer R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci* 2001; 2: 11.
34. Specht CG and Schoepfer R. Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein- deficient mice. *Genomics* 2004; 83: 1176–1178.
35. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, et al. Deletion of nicotinamidenucleotide transhydrogenase: a new quantitative intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 2006; 55: 2153–2156.
36. Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, et al. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 2921–2927.
37. Vanden Berghe T, Hulpiau P, Martens L, et al. Passenger mutations confound interpretation of all

- genetically modified congenic mice. *Immunity* 2015; 43: 200–209.
38. Benavides F, Glasscock E, Coghlann LG, et al. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Lab Anim* 2001; 35: 157–162.
39. Mashimo T, Voigt B, Tsurumi T, et al. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genet* 2006; 7: 19.
40. Petkov PM, Ding Y, Cassell MA, et al. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* 2004; 14: 1806–1811.
41. Zimdahl H, Nyakatura G, Brandt P, et al. A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science* 2004; 303: 807.
42. Taft RA, Davisson M and Wiles MV. Know thy mouse. *Trends Genet* 2006; 22: 649–653.
43. Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, et al. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res* 2001; 11: 163–169.
44. Hartl DL. Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations. Wilmington, MA: Charles River Genetic Literature, 2001.
45. Linder CC. The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim (NY)* 2001; 30: 34–39.
46. Doetschman T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol Biol* 2009; 530: 423–433.
47. Hummel KP, Coleman DL and Lane PW. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL- 6J strains. *Biochem Genet* 1972; 7: 1–13.
48. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269: 230–234.
49. Freeman D, Lesche R, Kertesz N, et al. Genetic background controls tumor development in PTEN-deficient mice. *Cancer Res* 2006; 66: 6492–6496.
50. Bourdi M, Davies JS and Pohl LR. Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 794–796.
51. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, et al. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997; 16: 19–27.
52. Fernandez A, Josa S and Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mamm Genome* 2017; 28: 237–246.
53. Wakeland E, Morel L, Achey K, et al. Speed congenics: A classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* 1997; 18: 472–477.

54. Dobrowolski P, Fischer M and Naumann R. Novel insights into the genetic background of genetically modified mice. *Transgenic Res* 2018; 27: 265–275.
55. Markel P, Shu P, Ebeling C, et al. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet* 1997; 17: 280–284.
56. Gurumurthy CB, Joshi PS, Kurz SG, et al. Validation of simple sequence length polymorphismregions of commonly used mouse strains for marker assisted speed congenics screening. *Int J Genomics* 2015; 2015: 735845.
57. Chen S, Kadomatsu K, Kondo M, et al. Effects of flanking genes on the phenotypes of mice deficient in basigin/ CD147. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 147–153.
58. Berry MM and Linder CC. Breeding systems: Considerations, genetic fundamentals, genetic background and strain types. In: Fox JGBS, Davisson MT, Newcomer CE, et al, (eds) *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. 1: History, Wild Mice and Genetics. Cambridge, MA: Academic Press, 2007, pp. 53-78.

Jeste li znali?

ANIMALNI MODELI ZA COVID-19

Maja Lang Balija

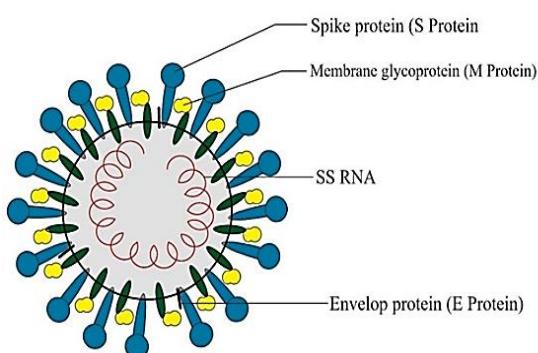


Kad se novi patogen u prosincu 2019. godine pojavio u kineskoj provinciji Hubei nitko nije ni slutio da će nekoliko mjeseci kasnije WHO zbog njega proglašiti pandemiju. Taj novi patogen pripada porodici korona virusa, a kako je jedan od glavnih simptoma bolesti nazvane COVID-19 (eng. *coronavirus disease 2019*) teški akutni respiratori sindrom, soj virusa je nazvan SARS-CoV-2 virus (eng. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*)(Zhu i sur. 2020).

Koronavirusi (Coronaviridae) su veliki jedno - lančani RNA virusi s ovojnicom, s genomom od približno 30 kilobaza, što ih čini najvećim među poznatim RNA virusima, a nalazimo ih i kod ljudi i kod životinja. Svi CoV dijele sličnosti u organizaciji i ekspresiji svog genoma. Tako i SARS-CoV-2 pokazuje veliku genetsku homologiju s SARS-CoV, drugim koronavirusima šišmiša sličnih SARS-u, kao i bliskoistočnim

respiratornim sindromom - MERS (eng. *Middle East Respiratory Syndrom*).

Genom SARS-CoV-2 virusa, sadrži 29.903 nukleotida i građen je od jedno-lančane (pozitivne) molekule ribonukleinske kiseline (RNK) koju virus koristi kao genetički materijal. Jedan od četiri strukturalna proteina je glikoprotein S koji podsjeća na šiljak (engl. *spikes*) koji iz unutrašnjosti virusa izlazi na površinu i ima ključnu ulogu u vezanju virusa za stanice domaćina. Uz S protein postoje još tri strukturalna proteina: protein M (engl. *membrane*), protein ovojnica E (engl. *envelope*) i N protein (engl. *nucleocapsid*). Struktura virusa SARS-CoV-2 prikazana je na Slici. 1.



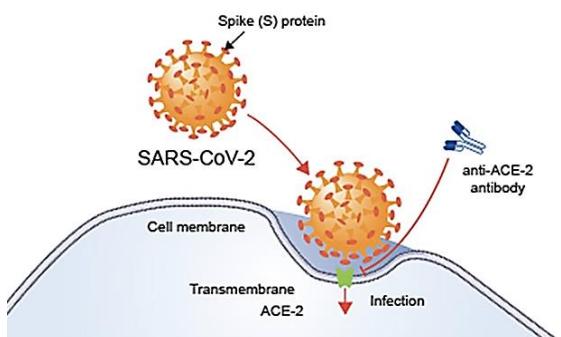
Slika. 1. Struktura virusa SARS-CoV-2

Prijenos bolesti prenosi se uglavnom od osobe do osobe kapljičnim putem u bliskim kontaktima sa zaražene na nezaraženu osobu ili kontaktom s kontaminiranim površinama na kojima virusi mogu ostati zarazni nekoliko dana (van Doremalen i sur., 2020.) COVID-19 može se manifestirati kao asimptomatska infekcija, zatim kao blaga infekcija gornjih dišnih puteva ili kao teška virusna upala pluća s respiratornim zatajenjem, pa čak i smrtnim ishodom.

Morbiditet i mortalitet kod ove bolesti je relativno visok. U svijetu je do danas potvrđeno više od 100 milijuna zaraženih osoba, od kojih je preko 2 milijuna umrlo. Znakovi i simptomi na početku bolesti uključuju povišenu temperaturu, glavobolju, umor, bolove u mišićima (mijalgiju), otežano disanje, te kašalj koji je u početku nadražujući i suh, a kasnije i produktivan uz stvaranje ispljuvka koji dodatno komplicira već ionako tešku kliničku sliku.

Dob pacijenta, ali i pridružene bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i respiratornih kroničnih bolesti snažni su čimbenici rizika za razvoj teške kliničke slike uz komplikacije i smrtnost oboljelih pacijenata. Najveće poteškoće u kontroli širenja ove bolesti epidemiologizma predstavlja širenje virusa putem asimptomatskih osoba (Gandhi i sur., 2020).

Na samom početku bilo je važno rasvijetliti mehanizam ulaska virusa u stanice domaćina. Istraživači su se usmjerili na istraživanje tzv. angiotenzin 2 konvergirajućeg (pretvarajućeg) enzima - ACE2 receptor (eng. *Angiotenzin Converting Enzyme 2*), proteina koji omogućava virusu da se spoji sa stanicom. ACE2 pomaže u modulaciji mnogih aktivnosti proteina zvanog angiotenzin II (ANG II) koji je odgovoran za povećanje krvnog tlaka, te pospješuje upalne reakcije povećavajući oštećenja epitela krvnih žila i razne ozljede drugih tkiva. ACE2 ima ulogu cijepanja ANG II na druge molekule koje djeluju suprotno učincima ANG II. Reklo bi se da ima inhibitorni učinak na ANG II.



Slika 2. Vezanje virusa SARS-CoV-2 na površini stanice.

Virus SARS-CoV-2 veže se na ACE2 mehanizmom „ključ-brava“. Taj protein prisutan je na površini mnogih vrsta stanica i tkiva uključujući pluća, srce, krvne žile, bubrege, jetru i gastrointestinalni trakt. Prisutan je i u epitelnim stanicama određenih tkiva, a koje predstavljaju zaštitne barijere. Razmjena plinova između pluća i krvnih žila događa se preko epitelne obloge. ACE2 prisutan je u epitelu nosa, ustima, plućima i to posebno u pneumocitima alveola.

Kad se virus SARS-CoV-2 veže za ACE2, spriječi ga u njegovom normalnom obavljanju funkcije za regulaciju signalizacije ANG II. Inhibitorni učinak SARS-CoV-2 nakon vezanja na ACE2 receptor pridonosi aktivnom ozljeđivanju tkiva od strane ANG II pri čemu posebno nastradaju pluća i srce kod bolesnika s COVID-19. (Sriram K., Insel P.A., 2020.).

Nedavno je otkriven i drugi protein kojeg SARS-CoV-2 koristi kao „rezervni“ receptor za infekciju humanih stanica, a koji se naziva neuropilin-1 (NPR-1) (Mayi i sur., 2021.). NPR-1 je važan u angiogenezi, napredovanju tumora i u nekim imunološkim funkcijama. *In vitro*

studija pokazala je da NPR-1 otvara virusu vrata kroz olfaktorni bulbus izravno u centralni živčani sustav i na taj način može omogućiti inficiranje živčanog sustava. Njegova uloga se još uvijek istražuje, kao i njegova mogućnost da služi u terapiji bolesti COVID-19.

Nije za sad poznato jesu li ovo jedini proteini koji omogućavaju ulaz virusa SARS-CoV-2 u stanicu. O patogenezi ove bolesti još uvijek postoje brojne nepoznanice. Kao i kod većine bolesti za proučavanje patogeneze i imunobiologije od velike bi koristi bio adekvatan životinjski model koji bi omogućio bolje razumijevanje interakcije virusa i domaćina.

Stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) u veljači 2020. okupila međunarodnu komisiju za razvoj animalnih modela kako bi ubrzala razvoj cjepiva i terapijskih sredstava za ublažavanje trenutne pandemije i spriječavanje ponovne pojave COVID-19. Zna se da svaki životinjski model dolazi sa svojim skupom nedostataka, a još veći problem nastaje ako se radi o virusima na koje životinje prirodno nisu osjetljive.

Munoz-Fontela C. i sur. (2020) u opširnom preglednom članku navode sve dosadašnje studije na različitim životinjskim vrstama koje su provedene širom svijeta na SARS-CoV-2 kako bi se procijenila njihova osjetljivost na infekcije i pogodnost animalnog modela za nastavak istraživanja. Pregled uključuje ukupno 11 vrsta životinja, što ovaj članak čini vrlo korisnim za usmjeravanje istraživačkih timova širom svijeta na odabir modela

za nastavak razvoja cjepiva i tretmana za COVID-19.

Među životinjskim modelima spomenuti su modeli transgenih miševa, model zlatnog hrčka, tvora i modeli ne-humanih primata kao životinje koje su osjetljive na SARS-CoV-2 i stoga se ističu kao kandidati za najbolji animalni model u razumijevanju bolesti. Također su provedene studije kako bi se utvrdilo mogu li druge životinje biti osjetljive na virus. Mačke i vidrice (minkovi) mogu se zaraziti, ali obično ne razvijaju bolest, iako mogu prenijeti infekciju na druge životinje u kontaktu. Suprotno tome, psi, pilići, patke i svinje nisu osjetljivi na virus.

Uvijek prvi i najraspoloživiji kandidat za početak istraživanja je upravo mišji model. Jednostavno i jeftino održavanje, raspoloživost dovoljnog broja jedinki, ali i raspoloživost mnoštva alata za proučavanje gotovo svih aspekata njihove biologije uvijek ga stavlju na mjesto prvog izbora u istraživanju.

Nadalje, prednosti boljeg poznavanja mišjeg genoma i mogućnost manipulacije genima i u slučaju istraživanja SARS-CoV-2 virusa omogućilo je dobivanje novih mišjih modela koje bi se moglo ispitati kao potencijalne *in vivo* sustave. Najveći izazov u početku istraživanja bilo je upravo to što virus SARS-CoV-2 koristi ljudski receptor nazvan ACE2 za ulazak u stanice, a mišji ACE2 je dovoljno različit da ga virus ne veže lako. Problem je prevladan korištenjem dvije

odvojene strategije: generiranje transgenih životinja koje izražavaju ljudski receptor i modificiranje virusa SARS-CoV-2 kako bi se bolje povezao s mišjim ACE2.

Sirijski hrčak (*Mesocricetus auratus*) vrsta je hrčaka koja se najčešće koristi u istraživanjima virusa u svijetu. I u ovom slučaju pokazao se kao koristan animalni model s obzirom da je ACE2 receptor kod hrčka kompatibilan s SARS-CoV-2, a životinje razvijaju jasne kliničke pokazatelje bolesti (Bertzbach i sur., 2020). Prilikom infekcije virusom SARS-CoV-2 dobivaju blage infekcije SARS-CoV-2, a njihov glavni simptom je gubitak težine koji je ponovljiv i moguće ga je izmjeriti. Te životinje razvijaju i pneumoniju koja se može otkriti patohistološkim pregledom pluća.

Druga zanimljiva vrsta hrčaka je Roborovski patuljasti hrčak (*Phodopus roborovskii*) (Trimpet i sur. 2020.), koji je manji od miševa i manje agresivan od sirijskih hrčaka. Patuljasti hrčci razvijaju intenzivniju kliničku sliku nakon infekcije SARS-CoV-2, razvijajući masivne krvne ugruške u plućima, koji su često prisutni i u teškim slučajevima COVID-19 kod ljudi. Ovo ukazuje na to da bi oni mogli biti dobar animalni model koji može imitirati teški oblik bolesti kod ljudi.

Uz hrčke, ne-humanu primatu jedan su od glavnih modela koje koriste istraživači za proučavanje terapije COVID-19. Studija je procjenjivala tri vrste primata (NHP) (indijske rezus makake, afričke babune i obične marmozete) i mlade i stare životinje,

kako bi se utvrdila osjetljivost na virus SARS-CoV-2 i razvoj bolesti COVID-19 (Melin i sur., 2020).

SARS-CoV-2 lako inficira primate, poput makaka, zbog kompatibilnosti njihovih ACE2 receptora, ali oni ne pokazuju simptome bolesti. Primati nakon infekcije SARS-CoV-2 razvijaju simptome koji su najsličnije blagim simptomatskim slučajevima većine zaraženih ljudi. U plućima razvijaju blage promjene vidljive tek patohistologijom tako da bi se životinje trebale eutanazirati u ranoj fazi infekcije kako bi se mogle pratiti promjene.

Na kraju bi trebalo naglasiti da, kako navode Lakdawala S.S. i Menachery V.D. (2020.), optimalni animalni model ovisi o znanstvenom pitanju koje smo si postavili. Studije koje ispituju djelotvornost cjepiva i antivirusnih lijekova, tradicionalno koriste modele teških bolesti, koje možda ne oponašaju uobičajenu humanu patologiju u većine bolesnika s COVID-19 bolesti i mogao bi ograničiti razumijevanje drugih važnih pitanja, uključujući dinamiku infekcije i prijenos.

Ljudi sa COVID-19 pokazuju široki raspon simptoma bolesti od asimptomatskih do ozbiljnih /teških pneumonija. „Prevođenje“ dobivenih eksperimentalnih podataka s jednog životinjskog modela i njihovih simptoma bolesti na ljude, vrlo su izazovni, jer ponekad mogu biti i obmanjujući.

Treba napomenuti da virus nije smrtonosan ni kod jedne do sad testirane vrste životinje, kao što ni

infekcija SARS-CoV-2 virusom u tih životinja nije izazvala tako teške simptome kao one koje se pojavljuju kod ljudi.

Ako se ovi modeli budu razvijali i dalje treba svakako obratiti pažnju na ulogu starosti i drugih vezanih zdravstvenih tegoba - ovi čimbenici su kritični parametri koji su potrebni za cijelovitu procjenu ljudskih bolesti. Epidemiološki podaci jasno su definirali da COVID-19 ima veću stopu smrtnosti u osoba starijih od 60 godina. Ipak, većina *in vivo* modela u istraživanjima koristi mlade i zdrave životinje. Modeli koji bi rekapitulirali ovaj fenotip starosti (eng. *aging phenotype*) bio bi nevjerojatno koristan za ispitivanje osnovne biologije koja stoji iza ovog fenomena.

Naravno treba se okretati i novijim strategijama u istraživanju (Clevers, 2020.). Novi modelni sustavi koji bi zamijenili animalne modele su svakako ispitivanje patogeneze virusa na „organoidima“, kultiviranim minijaturnim organizma (mozak, crijeva, pluća), izvedenim iz multipotentnih matičnih stanica čovjeka. Predviđa se da će se organoidi početi upotrebljavati i šire i kao eksperimentalna virološka platforma, jer njihova fiziologija dobro rekapitulira ljudsku, ali da nikada neće zamijeniti životinje.

LITERATURA:

Zhu et al. (2020) A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine 382:727-733.

van Doremalen et al. (2020) Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as

compared with SARS-CoV-1 (2020) New England Journal of Medicine 382:1564–1567.

Gandhi et al. (2020) The achilles' Heel od Current Strategies to Control COVID-19. The New England Journal of Medicine 382:2158–2160.

Sriram K., Insel P.A. (2020) A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. British Journal of Pharmacology 177:21.

Mayi BS, Leibowitz JA, Woods AT, Ammon KA, Liu AE, Raja A (2021) The role of Neuropilin-1 in COVID-19. PLoS Pathog 17(1): e1009153.

Munoz-Fontela C. et al (2020) Animal models for COVID-19. Nature 586: 509–515.

Bertzbach L.D. et al. (2020) SARS-CoV-2 infection of Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) reproduces COVID-19 pneumonia in a well-established small animal model. Transbound Emerg Dis. 2020;00:1–5.

Trimpert J. et all (2020) The Roborovski Dwarf Hamster Is A Highly Susceptible Model for a Rapid and Fatal Course of SARS-CoV-2 Infection. Cell Reports 33:108488.

Melin, A.D. et al. (2020) Comparative ACE2 variation and primate COVID-19 risk. Commun Biol 3, 641.

Lakdawala S.S. and Menachery V.D.(2020) The search for a COVID-19 animal model. Science 368 (6494), 942–943.

Clevers H. (2020) COVID-19: organoids go viral. Molecular cell biology 21:355.

Predstavljamo

NAJAVA 15. FELASA KONGRESA 2022. U MARSEJU

Julija Erhardt



AFSTAL (Francusko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama) i FELASA Vas pozivaju u Marseille, od 13-16. lipnja 2022. godine na FELASA-in kongres na temu "Komunikacija u istraživanju na životinjama" (Communication in Animal Research)

Glavne točke programa uključuju:

- posebne sekcije otvorene za zemlje u razvoju
- fauna morskog svijeta u istraživanjima
- posebna sekcija o institucionalnim komunikacijskim aktivnostima
- predložena radionica o komunikacijskom i medijskom treningu
- "Moji 3R-ovi za 180 sekundi": mladi istraživači predstavit će svoj rad, fokusirajući se na "3R"(tema nadahnuta s "Moj PhD za 180 sekundi" i "3 minute

- 3R-a" od „Lab Animal at Nature Research“ i NC3R.)
- priznanje tijelima za zaštitu životinja, nacionalnim odborima za dobrobit životinja, etičkim odborima, imenovanim veterinarima
- Vaše ideje i prijedlozi ...

Slobodne aktivnosti

- Doživite posebnu atmosferu jednog od najšarmantnijih europskih lučkih gradova
- Nezaboravan društveni program, uključujući svečanu večeru s pogledom na more

Organizacijski odbor FELASA 2022:

Predsjednik: Samuel Vidal

Članovi: Klas Abelson, Penny Alborough, Elodie Bouchoux, Heinz Brandstetter, Marie-Laure Cortes-Dubly, Thierry Decelle, Jean-Philippe Mocho, Belen Pintado, Sabrina Ravel, Ana-Isabel Santos

Važni datumi:

Otvaranje prijava za sponzore: 20. siječnja 2021.

Otvaranje prijava sažetaka: jesen 2021.

Otvaranje mrežne registracije: jesen 2021.

Za više informacija kontaktirajte:
felasa2022@mondial-contact.com

<http://www.felasa2022.eu/>



Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA) <https://www.crolasa.com>

Dogadanja

BUDUĆNOST EKSPERIMENTALNA NA ŽIVOTINJAMA

Jan-Bas Prins

Prevela i prilagodila Dubravka Švob Štrac

U sklopu webinar-a koji je organiziran 18. prosinca 2020. godine povodom obilježavanja 30. godišnjice Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA), prof. Jan Bas Prins održao je zanimljivo edukativno predavanje pod nazivom „Budućnost eksperimenata na životinjama“.

Prof. Jan-Bas Prins direktor je Pogona za biološka istraživanja i zamjenik nositelja dozvole za rad na Institutu Francis Crick u Londonu, od listopada 2018. godine. Doktorirao je u području laboratorijskih znanosti o životinjama kod prof. Van Zutphena na Sveučilištu u Utrechtu. Nakon postdoktorskih projekata na Sveučilištu u Oxfordu u Velikoj Britaniji i Sveučilištu Erasmus u Rotterdamu u Nizozemskoj, postao je voditelj pretkliničkog odjela Zavoda za plućnu medicinu na Erasmus Medicinskom Centru.

2002. godine prešao je na mjesto direktora Središnjeg pogona za životinje Sveučilišnog medicinskog centra Leiden u Nizozemskoj. Profesor je laboratorijskih znanosti o životinjama i član je Nizozemskog nacionalnog

odbora za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

Jan-Bas Prins predsjednik je organizacije Laboratory Animals Ltd, potpredsjednik Znanstvenog odbora Fondazione Guido Bernardini za obrazovanje i osposobljavanje u laboratorijskim znanostima, potpredsjednik Instituta za tehnologiju životinja, povjerenik za dobrobit životinja i znanstveni savjetnik za dobrobit životinja Infrafrontier-a (IF2020), bivši predsjednik FELASA-e, član Vanjskog vijeća za komparativnu medicinu pri Institutu Karolinska u Stockholm i *ad hoc* specijalist organizacije AAALAC.

Prof. Jan-Bas Prins u svom predavanju istaknuo je kako je teško predvidjeti budućnost pokusa na životnjama i istaknuo kako se na razini EU razmatraju brojne ideje koje su na tragu ukidanja primjene životinja u znanstvene svrhe. Ovakva razmišljanja izložena su još 2016. godine kada je u Briselu održana znanstvena konferencija pod nazivom „Non-animalni pristupi - put naprijed“ (*Non-animal approaches - The way forward*), organizirana od strane Europske komisije.

Sličan stav vidljiv je i u mišljenju Nizozemskog nacionalnog odbora za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NCad), a koje je objavljeno u dokumentu pod nazivom „Prijelaz na ne-animalna istraživanja- o mogućnostima za postupno ukidanje postupaka na životnjama i simulaciju inovacija bez laboratorijskih životinja“ (*Transition to Non-animal*

Reasearch-on oportunities for the phasing out of animal procedures and the simulation of innovation without laboratory animals), a u kojem se navode planovi da se svi pokusi za životnjama ukinu do 2025 godine.

Ovakvi planovi i razmišljanja generirali su puno rasprava i polarizacije u znanstvenoj zajednici, koji su posebice došli do izražaja 2020. godine zbog povećane potrebe za pokusima na životnjama uslijed Covid-19 pandemije. Tako su se na web stranici Max Delbrück Centra za molekularnu medicinu u Berlinu mogle vidjeti brojne izjave istraživača objedinjene pod naslovom „Zašto ne možemo izbjegći testiranje na životnjama“ (*Why cannot we yet avoid animal testing?*).

Također, zajedničko izvjeće Europskog udruženja za istraživanje životinja (EARA) i Europske federacije farmaceutske industrije i udruženja (EFPIA) osporilo je preporuku stručne skupine EU koja poziva na prestanak upotrebe životinja u istraživanju antitijela, uključujući Covid-19.

Naime, u svibnju 2020. godine referentni laboratorij EU komisije za alternative testiranju na životnjama (EURL ECVAM) objavio je izvjeće u kojem stoji da uporaba antitijela životinjskog podrijetla za istraživanje i liječenje bolesti, uključujući Covid-19, više nije prikladna za svoju svrhu, i da bi nadležna tijela za financiranje trebala izbjegavati financiranje takvih projekata.

U odgovoru EARA/EFPIA na ovu preporuku stoji kako bi ovakva preporuka za ukidanje istraživanja

protutijela životinjskog podrijetla imala ozbiljan utjecaj na EU inovacije i lijekove koji spašavaju živote.

Razmjena suprotnih mišljenja vidljiva je također u mnogim objavljenim radovima i člancima. Tako npr. u časopisu Current Biology Magazine 2020. godine izlazi članak velikog broja autora „Kako Covid-19 pandemija ističe nužnost istraživanja na životinjama“ (*How the Covid-19 pandemic highlights the necessity of animal research*). S druge strane, otvoreno pismo, na čelu sa ADI (*Animal Defenders International*), Svjetskoj znanstvenoj organizaciji (WHO), poziva na upotrebu metoda istraživanja bez primjene životinja u potrazi za cjepivom protiv COVID-19.

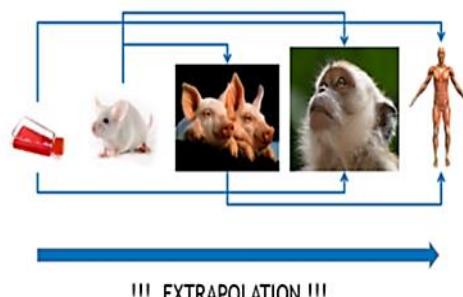
U pismu se ističe kako, iako ispitivanja na životinjama nisu potrebna i često su nepouzdana, ona se i dalje odvijaju na globalnoj razini. Na kraju, u blogu organizacije Frame, posvećenoj istraživanju alternativa pokusima na životinjama, ističe se kako je Covid-19 prilika za dobivanje boljeg pregleda nad većom i kompletnijom slikom o istraživanju životinja.

Direktiva 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe prilično je jasna u pogledu smjera istraživanja, te ističe primjenu 3R principa u radu sa pokusnim životinjama i u članku 13 naglašava da ne dovodeći u pitanje nacionalnu legalizaciju koja zabranjuje određene vrste metoda, države članice osiguravaju da se postupak ne provodi ako je prema zakonodavstvu Unije priznata druga metoda ili strategija

ispitivanja za postizanje traženog rezultata, a koja ne uključuje upotrebu žive životinje.

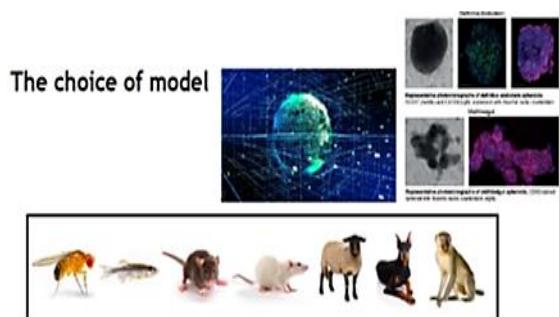
Primjena animalnih modela ima za glavne ciljeve postizanje najbolje moguće znanosti, najmanjeg broja životinja i najmanje moguće patnje. Pri tome moramo osigurati validnost modela i translaciju rezultata i upravo umjetnost znanosti predstavlja postavljanje istraživačkog pitanja pravom modelnom sustavu. Posebna pažnja mora se posvetiti ekstrapolaciji dobivenih podataka.

“The art of science is to pose a research question to the right model system”



Slika 1. Izbor modela istraživanja je ključan

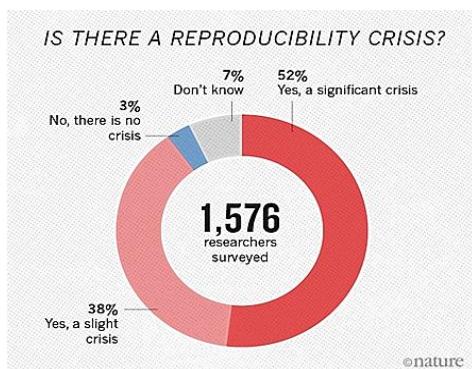
Jedan od problema predstavlja perspektiva znanstvenika i svih drugih koji sudjeluju u tom procesu. Naime, nekorištenje alternativne zamjene životinjama u pokusima obično se opravdava kompleksnošću modela i istraživačkog pitanja. Drugi problem je vrlo često sam izbor modela. Danas postoji zaista vrlo velik izbor istraživačkih modela koji se mogu koristiti: od *in silico* podataka, različih *in vitro* modela, organa na čipovima, 3D kultura do raznih animalnih modela i samih ljudi/ispitanika.



Slika 2. Danas postoji velik izbor istraživačkih modela

Treći problem može predstavljati metodologija koju koristimo. Stuart Richie je 2020. godine u svom seminaru održanom na Karolinska Institutu pod nazivom „Znanstvene izmišljotine: kako prijevara, pristranost, nemar i pretjerivanje podrivaju potragu za istinom“ (*Science Fictions: how fraud, bias, negligence and hype undermine the search for truth*), govorio o problemima reproducibilnosti, pristranosti prilikom objavljivanja, povlačenja objavljenih radova, upitnih istraživačkih praksi itd.

O problemima reproducibilnosti u znanosti govorilo se već 2016. godine u pregledu časopisa Nature koji otkriva kako više od 1500 znanstvenika vidi krizu reproducibilnosti koja potresa znanost i što bi po njihovom mišljenju moglo pomoći.



Slika 3. Kriza reproducibilnosti

S druge strane, članak objavljen u PMAS-u 2018. godine pod naslovom „Je li znanost doista suočena s krizom reproducibilnosti i trebamo li je?“ (*Is science really facing a reproducibility crisis and do we need it to?*) govori suprotno tome i tvrdi da je točnija, uvjerljivija i nadahnjujuća priča o epohalnim promjenama u znanosti i osnaživanju znanstvenika.

Pri tome su znanosti o laboratorijskim životinjama punopravni partner ostalih znanosti, uključujući vaskularnu i regenerativnu medicinu, znanost o imunitetu, infekcijama i toleranciji, neuroznanost, istraživanja starenja i razmnožavanja i onkologiju. Naša odgovornost je da sudjelujemo i igramo kritičnu ulogu. Esencijalne su i specifične uloge znanstvenika koji rade s laboratorijskim životinjama, veterinara i animalnih tehničara u njezi i dobrobiti životinja, veterinarskoj znanosti, obrazovanju i osposobljavanju, kao i u vrednovanju projekata.

Životinje koje su zdrave i sretne i o kojima se vodi adekvatna skrb i njega bitne su za dobre i validne znanstvene rezultate. Preporuke FELASA-e za zdravstveno praćenje kolonija miša, štakora, hrčka, zamorca i kunića u uzgojnim i pokusnim jedinicama koje su dane 2014. godine posebnu pažnju posvećuju mikrobiološkim infekcijama laboratorijskih životinja, koje u velikoj mjeri mogu utjecati na rezultate znanstvenih studija. Međutim, pri tome nije uzeto u obzir da i potpuno čist i sterilan okoliš rezultira u fenotipovima životinja koji se kao modeli vrlo teško mogu translatirati na ljude.

Takav stav je naglašen u znanstvenom radu pod naslovom „Pošaljite mikrobe“ (*Send in the germs*) objavljenom u časopisu Nature 2018. godine, u kojem se naglašava kako se laboratorijski miševi obično održavaju savršeno čistima, ali da neki imunolozi misle da bi ih doza prljavštine mogla učiniti korisnijima za znanost.



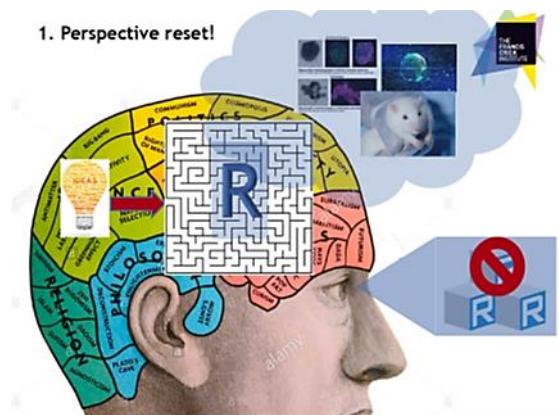
Slika 4. Da li su potpuno čisti miševi dobri za znanost?

Velik broj radova naglašava ključnu ulogu poboljšanja (*refinement*) u radu s laboratorijskim životinjama koje uključuje uklanjanje ili smanjivanje боли, uklanjanje stresa, odgovarajuće rukovanje životinjama, uzimanje uzoraka krvi, obogaćivanje okoliša, poboljšanje uvjeta smještaja, i slično.

U nedavnom radu objavljenom 2020. godine u časopisu Nature Reviews Neuroscience pod naslovom „Reproducibilnost istraživanja na životinjama u svjetlu bioloških varijacija (Reproducibility of animal research in light of biological variation)”, autori preporučuju uporabu sustavne heterogenizacije uzoraka i uvjeta aktivnim uključivanjem bioloških varijacija u dizajn studije kroz

diverzifikaciju uzoraka i uvjeta ispitivanja.

Pri planiranju eksperimenata potrebno je promijeniti prije svega našu perspektivu i umjesto da razmišljamo samo o smanjivanju (*reduction*) i poboljšavanju (*refinement*), potrebno je uzeti u obzir i mogućnost zamjene (*replacement*) pokusa na životinjama sa alternativnim metodama. Ukoliko promijenimo našu perspektivu i postepeno uvodimo takve pozitivne pomake, možemo postići da je svaka laboratorijska životinja iskorištena u dobru svrhu i u postojećim uvjetima s maksimalnom mogućom dobrobiti.



Slika 5. Potrebno je promijeniti perspektivu i uključiti mogućnost zamjene

Prof. Jan-Bas Prins zaključio je svoje predavanje ističući kako je svjestan da potpuna zamjena laboratorijskih životinja u pokusima za sada nije moguća, ali da postoje područja u kojima je to moguće u većoj mjeri kao što je to npr. obrazovanje i obuka, dok je u području temeljnih istraživanja to još uvijek vrlo teško, i bit će potrebno još puno truda i vremena.

Predstavljamo

**3R-CENTAR
SVEUČILIŠTA U
UTRECHTU**

Dubravka Švob Štrac

Misija 3R-Centra Sveučilišta u Utrechtu je potaknuti razvoj, prihvatanje i provedbu metoda koje mogu zamijeniti, smanjiti i poboljšati (3R) eksperimente na životinjama. Centar pruža informacije i savjete tijelima za zaštitu životinja Sveučilišta Utrecht i Sveučilišnog medicinskog centra Utrecht. Centar na više načina olakšava 3R u obrazovanju i istraživanju na životinjama pružajući informacije i savjete o modelima 3R. Komunikacijske aktivnosti centra uključuju pružanje informacija putem njegove web stranice, objavljanje biltena i sudjelovanje u relevantnim master programima i tečaju iz Laboratorijske znanosti o životinjama.

Na web stranici Centra (<https://www.uu.nl/en/organisation/3rs-centre/about-the-3rs-centre>) mogu se pronaći brojne zanimljive i korisne informacije, baze podataka, kodeksi praksi, smjernice, alati, linkovi i slično, vezani za dizajn pokusa, prehranu, smještaj i njegu, genetski modificirane i egzotične životinje, analgeziju, anesteziju i eutanaziju, humane krajnje točke, procjenu težine pokusa, udjelovanje laboratorijskih životinja, obrazovanje i osposobljavanje i mnoge druge aktualne teme.

Najave i zanimljivosti

- 15th FELASA in association with CLASA Congress, June 13–16, 2022, Marseille, France
<http://www.felasa2022.eu>
- EURL-ECVAM:
<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>

O sposobljavanje 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 tečajevi

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

- WHAT SHOULD YOU KNOW ABOUT YOUR RODENT FACILITY?. 02-03/02/2021
- online course "INTRODUCTION TO MICROBIOLOGICAL MONITORING IN RODENTS FACILITIES" 02/03/2021.
- Webinar "Italian Zebrafish 2021-2022" 04-11/02/2021

"Charles River - Workshops and training
https://www.criver.com/events?f%5B0%5D=event_type%3A1957