

BILTEN

Službeno
glasilo

2021

Hrvatsko
društvo za
znanost o
laboratorijskim
životinjama



BILTEN

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

Članovi uredništva:

Daša Ševeljević-Jaran
Gordana Nedić Erjavec
Julija Erhardt
Dubravka Švob Štrac

U ovom broju priloge pripremili:

Daša Ševeljević-Jaran
Gordana Nedić Erjavec

Bilten izlazi jednom godišnje.

Zagreb, 2021. godina.

Aktivnosti Društva

Na godišnjoj skupštini Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, održanoj 04. veljače 2021.g., izabrani su novi članovi tijela Društva i to kako slijedi:

Predsjedništvo

Predsjednica: Daša Ševeljević-Jaran
Potpredsjednica: Julija Erhardt
Tajnica: Maja Lazarus
Blagajnica: Gordana Nedić Erjavec

Upravni odbor

Marija Heffer
Damir Sapunar
Ilija Brzić
Višnja Novalić
Krešimir Severin

Nadzorni odbor

Dubravka Švob Štrac
Nataša Jovanov Milošević
Vesna Benković

Sud časti

Maja Lang Balijsa
Vladiana Crljen
Alenka Ballarin Perharić

Uz puno dobre volje i entuzijazma novoizabrani članovi tijela Društva su zahvalni na ukazanom povjerenju te će nastojati nastaviti voditi Društvo na način da se održe visoki standardi postavljeni od strane njihovih prethodnika. Također, novo Predsjedništvo se ovim putem, kako u

svoje, tako i u ime svih članova Društva zahvaljuje dosadašnjoj predsjednici Društva, Juliji Erhardt, te ostalim članovima Predsjedništva na radu i uloženom trudu za dobrobit Društva.

Novoizabrana predsjednica, Daša Ševeljević-Jaran, se obratila članovima Društva kroz dopis u kojem je definirala niže navedene ciljeve Društva za period 2021.-2023.g.

1) Pokretanje hrvatskog 3R centra (pri tom treba uzeti u obzir Ministarstvo Poljoprivrede i Ured za zaštitu dobrobiti životinja kao potencijalne partnere) koji bi poslužio kao centralna baza podataka svih najrelevantnijih radova iz LAS područja kao i baza linkova na ostale kvalitetne on-line izvore.

2) Pokretanje "expert" društvene mreže (tehničara i voditelja studija) kroz koju bi se mogla izmjenjivati znanja i iskustva te tražiti stručna pomoć kod planiranja i izvještavanja *in vivo* istraživanja, budući da ARRIVE i PREPARE smjernice nikad neće zamijeniti specifično individualno i kolektivno dugogodišnje praktično iskustvo u istraživanju s laboratorijskim životinjama. Prvi korak u tom smjeru bio bi popisivanje specifičnih znanja članova kako bi došlo do "kolektivnih znanja". Korisno bi bilo kad bi svaki član na popisu osim formalnog obrazovanja, naveo i listu stečenih iskustva "hands on" sa životinjskim modelima u bazičnim i primjenjenim istraživanjima, uzimajući

u obzir radna iskustva i tehničara i voditelja istraživanja.

3) Održavanje internih radionica samo za članove CroLASA-e. Takve radionice, održane od strane članova Društva, bi bile prigoda za službeno upoznavanje sa specifičnim zanjima i interesima članova te uvid u to s kakvim sve znanjima se raspolaže unutar Društva, koja nova područja se želi/treba istraživati te tko surađuje sa stranim institucijama i stručnjacima i u kojim zemljama, s ciljem povezivanja na međunarodnom nivou.

Sukladno ciljevima, glavne aktivnosti Društva u 2021. godini obuhvatile su formiranje radne skupine za izradu prijedloga sheme bodovanja kontinuiranog stručnog usavršavanja sa svrhom obnove LAS licence. Shema predstavlja prijedlog Pravilnika i objavljena je niže u sklopu Biltena.

Također, obavljene su pripreme za održavanje virtualnog mini simpozija u dogovoru sa suorganizatorom, Slovenskim društvom za laboratorijske živali (SLAS). Raspored i program predavanja objavljen je na web stranici Društva u prosincu 2021. godine, a održava se tijekom 4 dana (jednom mjesečno) od veljače do svibnja 2022. g., Simpozij obuhvaća 10 predavanja stranih i domaćih stručnjaka iz područja znanosti o laboratorijskim životinjama. Detaljnije obavijesti o registraciji i kotizaciji, programu LAS Serije webinarima su dostupne na mrežnim stranicama društva,

www.crolasa.com, a niže prenosimo opće informacije i program webinarima.

Organizator

Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA) u suradnji sa Slovenskim društvom za laboratorijske živali (SLAS)

Mjesto održavanja

Zoom platforma, 10000 Zagreb

Datum održavanja

16. veljače 2022., 9. ožujka 2022., 13. travnja 2022., 11. svibnja 2022.

Organizacijski odbor

Maja Lang Balija, Maja Lazarus, Martina Perše, Daša Ševeljević-Jaran, Dubravka Švob Štrac

Službeni jezici

Hrvatski i engleski jezik

Registracija

Za pristup webinarima dovoljno je jednom ispuniti registracijski obrazac na mrežnoj stranici CroLASA-e (www.crolasa.com) prije 10. veljače 2022. godine.

Kotizacija

Sudjelovanje na webinarima besplatno je za članove CroLASA društva koji su podmirili članarinu za 2021. godinu kao i za sve ostale zainteresirane kolege. Potvrdu o sudjelovanju na webinaru uz pripadajuće bodove Kontinuiranog stručnog usavršavanja članovi mogu zatražiti u Društvu bez naknade (crolasa14@gmail.com ili info@crolasa.com) nakon webinarima. Za ne-članove ova potvrda s bodovima izdat će se uz uplatu 50 kn po odabranom predavanju na račun

Udruga: HRVATSKO DRUŠTVO ZA ZNANOST O LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA, Rooseveltov trg 6, Zagreb
 IBAN: HR4623900011100319222
 Svrha: IME i PREZIME, datum webinar
 Hrvatska poštanska banka, d.d., Jurišićeva 4, 10 000 Zagreb

PROGRAM WEBINARA

1. LAS WEBINAR (16. veljače 2022.)

VRIJEME	TEMA	AUTOR
14 ⁰⁰ - 14 ³⁰	Uvodno predavanje	CroLASA & SLAS
14 ³⁰ - 15 ³⁰	How can NORECOPA help researchers PREPARE for better science	Adrian Smith, Norecopa, Norveška
15 ³⁰ - 16 ³⁰	Why you should consider sex as a biological variable in preclinical research	Urte Jaeh, Charles River, Italija
16 ³⁰ - 17 ¹⁵	Promotional lecture - products and services	Szymon Wyrwicki Kristijan Jurkovic AnimaLab Croatia d.o.o.
17 ¹⁵ - 17 ³⁰	Zatvaranje	CroLASA & SLAS

2. LAS WEBINAR (9. ožujka 2022.)

VRIJEME	TEMA	AUTOR
14 ⁰⁰ - 15 ⁰⁰	Good practice in communicating animal research to the public	Serban Morosan, University of Sorbonne, Francuska
15 ⁰⁰ - 16 ⁰⁰	AAALAC Program Description as a useful self-evaluation tool	Javier Guillen, AAALAC I Europe, Španjolska
16 ⁰⁰ - 16 ¹⁵	Zatvaranje	CroLASA & SLAS

3. LAS WEBINAR (13. travnja 2022.)

VRIJEME	TEMA	AUTOR
14 ⁰⁰ - 15 ⁰⁰	CRISPR Cas 9 gene editing in animal models	Maja Sabol, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska
15 ⁰⁰ - 16 ⁰⁰	How should we assess "severity" and how should we prioritize refinements?	Paul Flecknell, UK
16 ⁰⁰ - 17 ⁰⁰	Damned if you do - damned if you don't: The potential confounding effects of painful conditions and pain relief on experimental readouts	Klas Abelson, University of Copenhagen, Danska
17 ⁰⁰ - 17 ¹⁵	Zatvaranje	CroLASA & SLAS

4. LAS WEBINAR (11. svibnja 2022.)

VRIJEME	TEMA	AUTOR
14 ⁰⁰ - 15 ⁰⁰	Experimental design and reproducibility in preclinical animal studies" promotional lecture	Aurora Bronstad, University of Bergen, Norveška
15 ⁰⁰ - 16 ⁰⁰	Role of pathology in biomedical research	Snježana Čužić, Fidelta Ltd., Hrvatska
16 ⁰⁰ - 16 ³⁰	Zatvaranje	CroLASA & SLAS

Jeste li znali?

**Strategije smanjenja
genetskog odstupanja
(engl. *genetic drift*) i
povećanja
eksperimentalne
reproducibilnosti u
istraživanjima na
miševima**

Charles River Laboratories
International, Inc. 2017

Autor: Janine Low-Marchelli,
PhD, The Jackson Laboratory

Prilagodila: Daša Ševeljević-
Jaran

Sažetak

Genetsko odstupanje se odvija u svakoj samostalnoj mišjoj uzgojnoj koloniji i posjeduje potencijal da negativno utječe na eksperimentalnu reproducibilnost i znanstvene zaključke. Spontane mutacije uzrokovane genetskim odstupanjem mogu ostati neprimijećene godinama sve dok takve mutacije same za sebe ne postanu cilj specifičnog znanstvenog istraživanja. Iako se takve mutacije ne mogu u potpunosti spriječiti, posljedično genetsko odstupanje te

njihov utjecaj na znanstvena otkrića može se umanjiti promišljenim i pažljivim gospodarenjem mišjom zajednicom.

Budući se pojedine mišje zajednice razlikuju po veličini i strategijama gospodarenja, primjena cjelovite i točne nomenklature mišjih sojeva, kao i popisivanje (evidencija) izvornih podsojeva, poželjna je i korisna praksa za cijelu znanstvenu zajednicu.

**Značaj genetske stabilnosti miševa,
sudionika istraživanja**

Prosječni istraživač bioloških znanosti ne promišlja detaljnije o genetskom podrijetlu miša kao važnom znanstvenom čimbeniku. Glavni prioriteti znanstvenika su osiguranje financiranja istraživanja, razumijevanje značajki istraživane bolesti te publiciranje rezultata istraživanja.

Ipak, uspješno postizanje ovih ciljeva moguće je jedino ako se u mišjoj koloniji na kojoj se provodi istraživanje provode mjere održavanja genetske stabilnosti te prevencije genetskog odstupanja.

Pokusni miševi su jedinstveni, živi elementi znanstvenog istraživanja i kao takvi se mijenjaju tijekom svog života i, što je od većeg značaja, iz jedne generacije u drugu. Naposljetku, nasljedne promjene u slijedu DNK osnova su raznolikosti vrsta i evolucije u divljini. Čak i u odsustvu evolucijskog pritiska, slijed DNK je podložan promjenama.

Na prvi pogled, takve mutacije se čine tihim, beznačajnim fluktuacijama u genotipu pojedinca. Ipak, ove naizgled beznačajne mutacije mogu ozbiljno ugroziti reproducibilnost eksperimenta.

Znanstvenici koji provode istraživanja na miševima suočeni su s izazovom. Uzgoj miševa u svrhu *in vivo* istraživanja posjeduje svojstven rizik koji propagira genetsku raznolikost pa posljedično tome i raznolikost eksperimentalnih ishoda.

Od pokusa do pokusa, od publikacije do publikacije, raznolikost eksperimentalnih podataka i ishoda ne pogoduju znanstvenom napretku.

Svrha ovog rada jest educirati znanstvenike koji provode istraživanja na miševima o potencijalnim učincima genetskog odstupanja na napredak istraživanja te ponuditi i objasniti najbolje prakse sa ciljem njegovog smanjenja i poništenja ukoliko bi se utvrdila njegova pojava u mišjoj zajednici.

Detaljno izvještavanje službene nomenklature proizvođača mišjeg soja i uzgojnih postupaka kod publiciranja rezultata i prijava projekata samo su neke od jednostavnih poželjnih praksi koje istraživači mogu primijeniti, a koje unaprjeđuju reproducibilnost *in vivo* istraživanja i odgovornu primjenu životinja u istim.

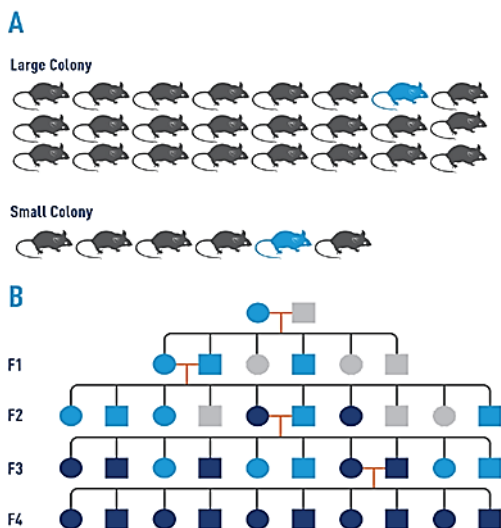
Kako dolazi do genetskog odstupanja i koja je njegova učestalost u mišjim zajednicama?

Visoko srođivanje ili parenje braće i sestara (engl. inbreeding) uspješna je metoda kojom se smanjuje heterozigotnost na svakom genskom lokusu miša čime se postiže jednoliki fenotip i osiguravaju osnove eksperimentalne reproducibilnosti. Genetska homozigotnost omogućuje usporedbu jedne varijable od interesa između kontrolne i eksperimentalne grupe te se posljedične razlike u očitanjima mogu dovesti u vezu sa varijablom koja se istražuje.

Slično principima koji su zastupljeni u divljini, genotip dviju populacija uzgojenih identičnim „inbreeding” postupkom u izolaciji s vremenom će se postupno promijeniti. Spontane mutacije se mogu pojaviti u vidu polimorfizama jednog nukleotida, delecija, inverzija, duplikacija i drugih takvih grešaka koje se događaju u vrijeme replikacije DNK i mejoze. Ovaj proces nasumičnih pojava, nestajanja i trajnog fiksiranja spontanih mutacija u mišjoj populaciji zovemo genetskim odstupanjem (Lee Silver, 1995). Pojavnost i količina genetskog odstupanja unutar aktivne rasplodne zajednice varira, ali se pretpostavlja da je dosta česta. Prosječno trajanje aktivnog perioda rasploda u miševa je 3-4 mjeseca, a spolna zrelost nastupa s 5-8 tjedana starosti. Potomstvo obično dolazi na svijet 3 tjedna nakon parenja roditelja. Izračun mjere spontanih mutacija u populaciji od preko milijun miševa temeljen na promjenama boje krzna ukazuje na to da jedna fenotipska mutacija može nastupiti svake 1,8

rasplodne generacije (Drake i sur., 1998; Russel and Russel, 1996).

Rizik od širenja spontane mutacije unutar rasplodne linije veći je u manjim populacijama (Slika 1A). Svaka mutacija prisutna u mišjoj roditeljskoj rasplodnoj liniji naslijedit će se u otprilike pola potomstva koje će biti heterozigoti za tu mutaciju (Slika 1B). U visoko srođenim rasplodnim mišjim zajednicama, postoji 25% šanse da se ovakve mutacije fiksiraju (postanu homozigotne) (Chamary and Hurst, 2004; Drake i sur., 1998).



Slika 1: Rizik širenja spontane mutacije veći je u malim nego u velikim kolonijama. A) Rizik širenja spontane mutacije je veći u maloj nego u velikoj koloniji. Vjerojatnost da će se u rasplodne svrhe koristiti miš sa slučajnom mutacijom (svjetlo plava boja) je veća u manjoj nego u velikoj koloniji. B) U svakom sljedećem rasplodnom ciklusu postoji 25% šanse

da će nova mutacija biti zastupljenija u mišjoj zajednici. Na primjer, pravilo nasljeđivanja prema Mendelu predviđa da će F1 (engl. Filial ili prva generacija visoko srođenih potomaka) biti sastavljena od 50% divljih tipova (siva boja) i 50% heterozigota za mutaciju boje krzna (svjetlo plava boja). Ako se slučajno za rasplod odabralo dva heterozigota, F2 (druga generacija visoko srođenih potomaka) će sadržavati 25% divljih, 50% heterozigota i 25% homozigota (tamno plava). Ovakva raspodjela se nastavlja sve dok cijela kolonija ne postane homozigotna za dotičnu mutaciju (F3, F4). Genom, međutim, može napraviti odmak u oba smjera ovisno o genotipu rasplodnih miševa - vjerojatnost da će se mutacija fiksirati je jednaka vjerojatnosti da će ona zauvijek nestati iz kolonije.

Pokazatelji koji potvrđuju da je došlo do genetskog odstupanja: obilježja podsojeva

Podsoj je grana visoko srođenih sojeva za koju se sumnja ili se pouzdano zna da se genetski razlikuje od roditeljske kolonije (<http://www.informatics.jax.org/mgi/home/nomen/strains.shtml#substrains>). Budući genetsko odstupanje može biti različito u dvije populacije visoko srođenih miševa koji su potekli od istih roditelja, obilježje podsoja najvažnija je komponenta nomenklature. Obilježje podsoja u svom opisu sadrži jedinstveni

laboratorijski kod kojeg dodjeljuje američki Institut za istraživanja na laboratorijskim životinjama (ILAR, engl. Institute for Laboratory Animal Research) (<http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>). Pomoću laboratorijskog koda identificira se laboratorij ili istraživač koji je proizveo ili održava koloniju dotičnog mišjeg soja (Tablica 1). Budući su laboratorijski kodovi složeni, rodoslovlje soja se može pročitati iz samog naziva soja/koda. Na primjer, dugi niz godina je soj C57BL/6NJ bio uzgajan i distribuiran od strane američkog Državnog zdravstvenog instituta (NIH) (N), a sada taj soj uzgaja i distribuira „The Jackson Laboratory” (J) (Slika 3). Ekstenzija u nomenklaturi uglavnom ukazuje na to da su između dva soja potvrđene genetske razlike.

ILAR dodjeljuje i održava jedinstvene identifikatore za institute, laboratorije ili pojedinačne znanstvenike koji su zaslužni za kreiranje i uspostavu rasplodne kolonije nekog novog mišjeg soja.

Tablica 1: Najčešći laboratorijski kodovi koji se koriste u nomenklaturi podsojeva

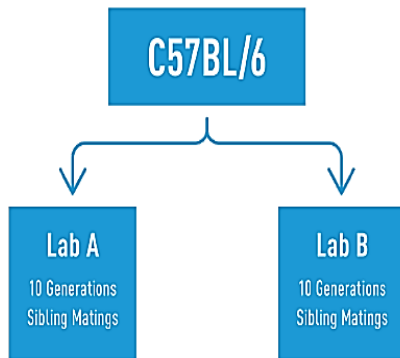
Lab Code	Organization
CrI	Charles River Laboratories
Hsd	Envigo (formerly Harlan Laboratories)
J	The Jackson Laboratory
N	National Institutes of Health
Rj	Centre D'Elevage R. Janvier
Tac	Taconic Farms, Inc.

Suspektne genetske razlike između rasplodnih generacija (naraštaja)

Svaki visoko srođeni soj koji se održavao neovisno od roditeljskog kroz 20 uzastopnih rasplodnih generacija (u trajanju od 5-6 godina) najvjerojatnije se genetski razlikuje od ishodišnih predaka pa se zato smatra podsojem. Dodatno, uzgoj novih naraštaja/generacija ima kumulativni učinak na genetsko odstupanje pa tako, ako su dva laboratorija otkupila od uzgajivača mišje sojeve istog porijekla, a potom je svaki laboratorij taj soj održavao i uzgajao kroz 10 generacija uzastopnih visoko srođenih parenja, svaki laboratorij je tako uzgojio jedinstveni podsoj koji se smatra 20 rasplodnih generacija razdvojen od onog u drugom laboratoriju (Slika 2).

Prve zajednice visoko srođenih mišjih sojeva (uključivši C57BL/6, DBA, C3H, BALB, CBA i druge) koje su korištene u biološkim istraživanjima uspostavljene su prije gotovo 100 godina i danas se često primjenjuju u iste svrhe. Kako su suvremene zajednice tih sojeva razdvojene za 200 i više generacija od svojih ishodišnih predaka, te kako ih mnogobrojne svjetske institucije interno uzgajaju, u svim tim suvremenim podsojevima je kroz stoljetni vremenski period došlo do značajnog (kumulativnog) genetskog odstupanja u odnosu na ishodišni soj od kojeg svi potječu. Uzimajući u obzir nastalo genetsko odstupanje, moguće je da se fenotipska vidljiva obilježja u populaciji današnjih

sojeva razlikuju od onih koja su zabilježena u ishodišnim populacijama, od prije stotinjak godina.



Slika 2: Razvoj podsoja

Podsoj se razvije nakon 20 uzastopnih visoko srođenih (brat x sestra) parenja (engl. inbreeding). Iako dva laboratorija iz primjera u Slici 2 nisu pojedinačno provela 20 uzastopnih ciklusa parenja u visokom srodstvu, Laboratorij A i B održavaju sojeve koji su razdvojeni sa 20 rasplodnih generacija. Dodavanje laboratorijskih kodova na imena sojeva generalni je pokazatelj da je između dva soja došlo do genetskog odstupanja.

Poznate genetske razlike između podsojeva koje se manifestiraju i kao fenotipske razlike

Podsojevi visokosrođenih miševa se, osim u genotipu, ponekad razlikuju i po fenotipskim obilježjima. Spontane mutacije ne uzrokuju uvijek vidljive promjene u fenotipu, već se se mogu fiksirati u homozigotnoj populaciji miševa bez vidljivih

manifestacija i promjena na fenotipu kroz duži niz godina te kao takve neprimjetno proći ispod radara istraživača koji gospodare mišjom kolonijom koristeći miševe u znanstvenim istraživanjima. Tek su vidljive fenotipske promjene očigledni dokaz da je došlo do genetskog odstupanja. Dakle, otkrivanje genetskog odstupanja može ovisiti o tome hoće li individualni laboratoriji koji provode istraživanja čiji rezultati ovise o takvim mutacijama, prepoznati da su neočekivani nisu posljedica „neuspjelog eksperimenta” te daljnjim ispitivanjem identificirati mutaciju koja je odgovorna za aberantni fenotip.

Na primjer, roditeljski visoko srođeni soj C3H poslužio je istraživačima iz „Jackson Laboratory” (JL dalje u tekstu) za uspostavu dva podsoja koji se naizgled nisu razlikovali duži niz godina. Dr. Walter Heston uzgojio je soj 1930. godine (sada poznat kao C3H/HeJ). 1952. godine, Heston je predao neke miševe iz svog uzgoja istraživaču JL-a, Dr. Henry Outzen-u (taj soj je sada poznat kao C3H/HeOuJ). Krajem 1960-tih, utvrđeno je da je Hestonov soj otporan na izazov lipopolisaharidom (LPS), dok je Outzen-ov soj ostao osjetljiv na izazov LPS-om. Kasnije je mutacija dovedena u vezu sa genom Tlr4 koji je odgovoran za prepoznavanje patogena i aktivaciju urođenog imunskog sustava (Poltorak i sur., 1998a; Watson i sur., 1978). Do trenutka identifikacije baze C u A na nukleotidu 2342 u genu Tlr4 mutacija se fiksirala u Heston-ovom podsoju,

vjerojatno u periodu između 1958. i 1965. (Poltorak i sur., 1998b). Da nekim slučajem Heston-ov C3H podsoj nikad nije bio tretiran LPS-om, vrlo vjerojatno se Tlr4 mutacija ne bi identificirala te bi zaključci iz povijesnih istraživanja iz područja bazične imunologije na ovim sojevima postali vrlo sporni.

Podsojevi sadrže specifične genomske sljedove (sekvence)

Genetsko odstupanje se, osim slučajnim otkrićem, može sa sigurnošću identificirati i potvrditi postupkom sekvenciranja genoma novonastalog mišjeg podsoja i njegovom usporedbom sa referentnim (ishodišnim) genomom. Ženka C57BL/6J je prva poslužila za kompletno sekvenciranje mišjeg genoma u sklopu "Mouse Genome Sequencing Consortium" (hrv. Konzorcij za sekvenciranje mišjeg genoma). Do danas je kompletno sekvencirano 15 glavnih visoko srođenih mišjih sojeva i svi su pripadnici „J” podsojeva, što je službeni ILAR kod za „Jackson Laboratory” (JL dalje u tekstu) sojeve (Adams i sur., 2015,

www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Strains) (Tablica 2)

Tablica 2: Genetske sekvence i fenotipske značajke su specifične za podsoj

Mouse Strain, Full Nomenclature	JAX® Strain Number	Complete Sequence in Ensembl	Number of Datasets in MPD	Protected by GSP
C57BL/6J	000964	Y	237	Y
129Sv1/SvEvJ	002448	Y	133	Y
A/J	000949	Y	177	
/AKR/J	000948	Y	114	
B6.129P2-ApoE ^{tm1.1} /J	002052	Y	7	Y
BALB/cJ	000951	Y	93	
BALB/cByJ	001026		118	Y
C3H/HeJ	000959	Y	158	Y
C57BL/6J	003304	Y	2	Y
CAST/EJ	000928	Y	97	
CBA/J	000956	Y	110	Y
DBA/2J	000970		90	Y
DBA/2J	000971	Y	166	Y
FVB/NJ	001800	Y	133	Y
LF/J	000970	Y	64	
NOD/ShiLJ	001978	Y	106	Y
NOD.CB17-Prkd ^{cm} /J	001303	Y	8	Y
NZ/O.HL/J	002105	Y	49	
PWK/PhJ	003715	Y	43	
SPRET/EJ	001146	Y	34	
WSN/EU	001145	Y	67	

Y=da

Samo su mišji podsojevi „J” u potpunosti sekvencirani, a rezultati sekvenciranja pohranjeni su u Ensembl bazu podataka (gdje Y znači da). Mnogi podsojevi imaju zabilježeni polimorfizam jednog nukleotida, a genotipska osnova podsoja C57BL/6J služi kao referentna (kontrola). Pored informacije o SNP-u (polimorfizam jednog nukleotida), tisuće za podsoj specifičnih fenotipskih karakteristika neovisno se kvantificiralo i rezultati pohranjeni u MPD (baza mišjih fenotipova) bazi podataka dostupni su za analizu. Velik broj sojeva JL se distribuirao posredstvom Charles Rivera (CR) u Europi i Japanu i ti sojevi su zaštićeni Jackson Laboratory (JL) patentom koji garantira provođenje programa genetske stabilnosti (Engl. Genetic Stability Program, GSP).

U svrhu identifikacije SNP-ova (polimorfizam jednog nukleotida), „indela“ (umetanje i gubitak nukleotida) i strukturnih varijacija u odnosu na genom referentnog miša C57BL/6J, sekvencirano je više od 20 visoko srođenih sojeva koristeći pristupe kratki redosljed (Frazer i sur., www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project).

Dodatno, poznate podatke o SNP-ovima za pojedine podsojeve može se pronaći i uspoređivati u prije spomenutoj bazi MPD koja je unificirana kolekcija genotipskih i fenotipskih karakteristika najčešće korištenih mišjih sojeva (<http://phenome.jax.org>).

Genotipska osnova mišjih sojeva utječe na znanstvene zaključke

Kako je ranije opisano na primjeru genetskog odstupanja dokazanom za C3H mišji soj, podsojevi mogu razviti spontane mutacije koje imaju potencijala utjecati na rezultate i zaključke istraživanja. Ako se eksperimente na životinjama ne provodi u skladu s dobrim istraživačkim praksama, kao na primjer primjenom podsojeva odgovarajućih genotipova, rezultati mogu ozbiljno ugroziti eksperimentalnu reproducibilnost. Bez obzira na to jesu li spontane mutacije nastale u uzgojnoj nastambi proizvođača ili u pojedinačnim uzgojnim nastambama krajnjih korisnika, kako znanstveni

istraživač koji provodi *in vivo* istraživanja može znati koji je podsoj najbolji za ostvarenje ciljeva njegovih istraživanja? Na žalost, nema jednostavnog odgovora na to pitanje. Najbolji način da se utvrdi ima li varijabla genotip utjecaja na ciljeve istraživanja jest da se istovremeno provedu identični pokusi na različitim podsojevima i usporede krajnji rezultati. Kako je to u praksi nemoguće provesti, najbolji način da se utvrdi utjecaj genotipa na rezultate istraživanja jest da se o tome educira putem publikacija drugih istraživača i da se nastavi dopunjavati specifična znanja o tome koristeći se u istraživanjima identičnim, strogo genetski definiranim podsojevima.

C57BL/6 podsojevi

Između svih podsojeva visoko srođenih mišjih sojeva postoje razlike. Soj C57BL/6 je najčešće korišten u *in vivo* istraživanjima i, kao takav, najčešće citiran u literaturi, u preko 37000 publikacija indeksiranih na PubMed-u (Tablica 3). Ovaj rad će se fokusirati samo na publikacije koje opisuju razlike između članova obitelji podsojeva C57BL/6. Trenutačno postoji preko 16000 publikacija u sklopu kojih su istraživanja provedena na originalnom podsoju C57BL/6J. Postoji manji broj publikacija u sklopu kojih su istraživanja provedena na podsojevima proizašlim iz originalnog soja C57BL/6J. Oko 1200 publikacija opisuje istraživanja provedena na podsojevima

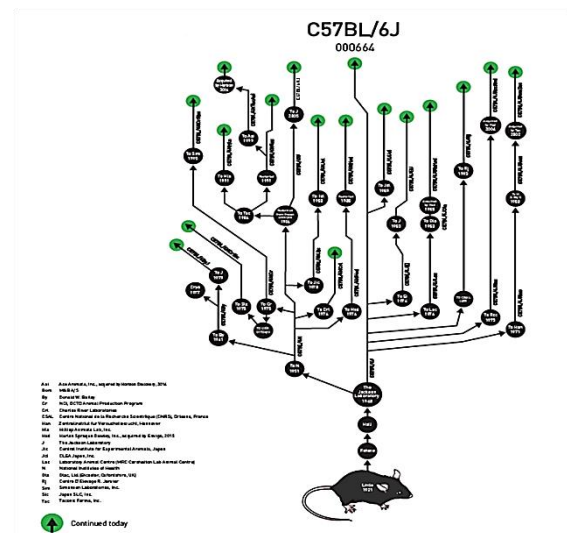
originalnog soja C57BL/6N. U nadolazećim godinama se očekuje da će primjena podsojeva C57BL/6N značajno porasti jer će s vremenom biti ciljano svih 20000 gena mišjeg genoma u C57BL/6N embrionalnim matičnim stanicama u sklopu projekta „International Knockout Mouse Consortium (IKMC)“ (Međunarodni konzorcij „knockout_KO“ miševa) ili tehnologijom ciljane mutacije. (<http://www.mousephenotype.org/>).

Tablica 3: Zastupljenost podsojeva C57BL/6 u znanstvenim publikacijama. U vrijeme publiciranja ovog rada, termini korišteni za pretraživanje PubMed baze podataka su bili C57BL/6J i C57BL/6N.

Search Term	PubMed Entries
C57BL/6	37122
C57BL/6ByJ	112
C57BL/6J	16390
C57BL/6J0laHsd	53
C57BL/6JBomTac	11
C57BL/6JRj	7
C57BL/6N	1182
C57BL/6NCrl	71
C57BL/6NJ	11
C57BL/6NHsd	41
C57BL/6NTac	78

Izvorni (originalni) JL podsoj C57BL/6J poslan je 1951. godine u američki Državni zdravstveni institut (National Institute of Health_NIH). Tako nastali podsoj C57BL/6N je kasnije distribuiran u nekoliko instituta, 1974. u CR laboratorije (današnji soj C57BL/6NCrl), u Harlan

(danas Envigo) iste godine i ponovno 1988. (današnji soj C57BL/6NHsd) te u Taconic 1991. godine (današnji soj C57BL/6NTac). 2005. godine N podsoj se vratio u JL i danas je poznat kao C57BL/6NJ podsoj. Trenutačno, najmanje 100 rasplodnih generacija razdvaja podsojeve C57BL/6J od C57BL/6N (Slika 3).



Slika 3: povijest razvoja C57BL/6 podsojeva

Clarence Cook Little, osnivač „the Jackson Laboratory“, 1921. godine uspostavio je prvu stabilnu koloniju mišjeg soja C57BL/6. U međuvremenu, soj je distribuiran stotinama instituta i tisućama laboratorija krajnjih korisnika diljem svijeta. Zahvaljujući spontanim mutacijama koje su dovele do genetskog odstupanja, svaki podsoj C57BL/6 je u srodstvu s ostalim, ali istovremeno svaki podsoj posjeduje jedinstvene poznate i nepoznate razlike u sekvencama vlastitog genoma.

Nekoliko objavljenih radova demonstrira nasljedne fenotipske razlike između podsojeva J i N koje su nastale kao posljedica nastalog genetskog odstupanja. Miševi su važni životinjski modeli za proučavanje uloge gena koji su sekvencirani, ali čija funkcija nije utvrđena pa se tako, ovisno o specifičnosti znanstvenog pitanja, neki podsojevi više preferiraju i češće koriste u istraživačkoj praksi od ostalih (Bryant, 2011). Neki klasični i suvremeniji primjeri su navedeni, kako slijedi:

- Ekspresija mutiranog gena *Nnt* u C57BL/6J miševa pokreće glukozom potaknute procese sekrecije inzulina, za razliku od C57BL/6N podsoja u kojih takvi procesi izostaju (Freeman i sur., 2006).

- C57BL/6J miševi pokazuju sklonost prema alkoholu i redovito ga konzumiraju, dočim to ne vrijedi za C57BL/6N^{Cr1} soj miševa (Mulligan i sur., 2008). Studijama mapiranja genskog lokusa i kvantificiranja utjecaja gena na fenotipske osobine ova dva podsoja moguće je osigurati bolje razumijevanje uloge ovih gena u razvoju ovisnosti o alkoholu kod miševa i ljudi.

- C57BL/6N podsojevi posjeduju alele *Crbrd8* odgovorne za razvoj retinalne degeneracije, dok C57BL/6J podsoj posjeduje divlji tip alela (Mattapallil i sur., 2012).

- C57BL/6J^{OlaHsd} miševi su homozigotni za mutaciju koja prouzrokuje spontano brisanje gena odgovornih za upravljanje sinteze

proteina alfa sinuklein i multimerin-1 (Specht and Schoepfer, 2001, 2004). Nakupljanje alfa sinukleina u centralnom živčanom sustavu je tipičan nalaz za Parkinsonovu bolest: mutacija prisutna u C57BL/6J^{OlaHsd} podsoju izgleda ne utječe na prionima potaknutu sinaptotoksičnost (Asuni i sur., 2010), ali generalno utječe na degeneraciju motoričkih neurona (Pelkonen and Yavich, 2011; Pena-Oliver i sur., 2012). Osim toga, C57BL/6J^{OlaHsd} miševi imaju smanjenu gustoću kostiju u usporedbi sa C57BL/6J i C57BL/6J^{RccHsd} podsojevima (Liron i sur., 2017).

- Miševi C57BL/6N^{Hsd} nose mutaciju *Dock2* koja utječe na procese signaliziranja B-stanica i imunološku toleranciju što nije odlika većine C57BL/6 podsojeva (Mahajan i sur., 2016).

U sljedećem primjeru, rezultati desetogodišnjih znanstvenih istraživanja jednog laboratorija dovedeni su u pitanje jer su se pogrešno temeljili na dva genetski značajno različita C57BL/6 soja (www.jax.org/news-and-insights/iax-bloq/2016/mav/whv-it-took-2-years-for-a-harvard-research-lab-to-get-back-to-research). U objavljenim originalnim studijama autori su koristili nedefinirani podsoj C57BL/6 i njegovu genetsku podlogu za kreiranje *Siae* „Knock Out” miša (Cariappa i sur., 2009). Gen *Siae*, stajalo je u njihovoj izvornoj publikaciji iz 2009., sudionik je procesa razvoja B-stanica i

signaliziranja. Miševi nositelji mutacije *Siae* su potom spareni sa specifičnim JL C57BL/6J podsojem kako bi se mutacija prebacila na potonji soj kroz najmanje 20 generacija parenja u visokom srodstvu. Uslijedilo je neugodno iznenađenje kada se sa pokusima na miševima C57BL/6J osnove nije uspjelo ponoviti prijašnje rezultate (Mahajan i sur., 2016). Nakon više godina provođenja dodatnih analiza na nekoliko komercijalno dostupnih C57BL/6 podsojeva utvrđeno je da je u C57BL/6NHsd miševa došlo do pojave i fiksiranja spontane mutacije *Dock2* koja je potvrđena kao stvarni uzrok promjena u funkcijama B-stanica. Ovaj primjer trebao bi poslužiti kao pouka da je u *in vivo* istraživanjima poželjno detaljno praćenje i razumijevanje genetskog porijekla miševa koji se koriste.

Zbog postojanja genetskog odstupanja i razlika u genotipu, visoko srođeni miševi se ne bi smjeli naizmjenično koristiti. Kod provođenja ciljanih *in vivo* istraživanja korisno je znati da utjecaj spontanih mutacija s posljedičnim genetskim odstupanjem i promjenom fenotipa soja može ovisiti o te biti potaknuto nekolicinom eksperimentalnih čimbenika. Tako je utvrđeno da je mutacija *Nnt* u soju C57BL/6J u *in vitro* uvjetima zaslužna za smanjenje inzulinske sekrecije, dok taj efekt izostaje *in vivo*, u C57BL/6J miševa, nositelja mutacije *Nnt* (Freeman i sur., 2006). U drugoj studiji nisu utvrđene značajne razlike u sekreciji inzulina *in vitro* ili *in vivo* u

C57BL/6J i C57BL/6N^{Tac} podsojeva (Wong i sur., 2010). Nadalje, status mutacije *Nnt* te njena uloga u razvoju hranom izazvane pretilosti te u procesima inzulinskog odaziva nije jasan i možda ovisi o sadržaju masti u prehrani (Nicholson i sur., 2010). U skladu s time, dva J podsoja (J, JWehi) i četiri N podsoja (N^{Tac}, N^{Hsd}, N^{Crl}, N^J) na prehrani formulom siromašnoj mastima razvila su slične profile inzulinske sekrecije nakon izazova glukozom. Međutim, kada je C57BL/6N^J podsoj primao hranu bogatu mastima, na izazov glukozom demonstrirao je reducirani inzulinski odaziv koji se nije mogao objasniti razlikama u statusu gena *Nnt*, tjelesne težine, udjela tjelesnih masti, razlikama u prehrani ili statusu beta stanica gušterače (Hull i sur., 2017).

Postoje još neke razlike među C57BL/6 podsojevima koje su obrađene u publikacijama. Bryant i suradnici saželi su u svom radu iz 2008. godine razlike u ponašanju među podsojevima a koje se tiču anksioznosti, boli i reakcije na amfetamine. Šire gledano, razlike među podsojevima C57BL/6J i C57BL/6N^{Tac} uspoređene su u iscrpnim unificiranim istraživanjima fenotipova koji su uključivali 413 parametara (EMPreSS) a istraživanja su provedena u 4 neovisna centra „European Mouse Disease Clinic (EUMODIC)_Europski konzorcij klinika za mišje bolesti (Simon i sur., 2013). U sva četiri centra, rezultati dobiveni na J i N^{Tac} miševima razlikovali su se u nekoliko istraženih

područja, uključivši i reakciju na podražaj, lokomotornu aktivnost, jačinu hvata, kardiovaskularne karakteristike, metaboličke parametre i kliničku kemiju.

Uzimajući sve u obzir, genetska osnova je tek jedna komponenta eksperimentalnog dizajna koja može utjecati na reproducibilnost i koju treba imati na umu kad se generalizira sa zaključcima o biološkim procesima. Zabrinjava činjenica da u preko 37000 publiciranih radova koji u PubMed bazi opisuju istraživanja na „C57BL/6” većina autora ne navodi korišteni podsoj.

Prakse gospodarenja mišjom kolonijom koje ograničavaju genetski pomak

Sve su uzgojne kolonije podložne mutacijama i posljedičnom genetskom odstupanju. Ipak, poznate su strategije gospodarenja mišjom kolonijom koje ograničavaju genetsko odstupanje pa tako i nepoželjne posljedice po eksperimentalnu reproducibilnost. Navedene strategije podrazumijevaju upotrebu pravilne nomenklature, promišljene prakse parenja i krioprezervaciju mišjih embrija. U nastavku slijede neke od najboljih praksi koje valja primijeniti kod gospodarenja mišjom kolonijom.

Nomenklatura i pravilno izvještavanje

- Pravilno izvještavanje nomenklature mišjeg soja nužno je kako

bi se osigurao nedvojbeni identitet soja na kojem se provode istraživanja.

- U svakodnevnim rutinskim poslovima gospodarenja kolonijom, preporuča se koristiti unaprijed računalno tiskane kavezne kartice u različitim bojama s navodom pravilne nomenklature soja i njegovog porijekla (podatci uzgajivača) kao i osiguranje sljedivosti podataka njihovim zapisom u laboratorijske dnevnik. Prethodno računalno tiskanje kaveznih kartica smanjuje mogućnost greški kod ručnog unosa podataka u kartice te poboljšava usklađenost nomenklature relevantne za kvalitetno provođenje *in vivo* istraživanja. Primjena različitih boja kaveznih kartica za različite sojeve naročito je korisna u prostorima u kojima se istovremeno drži više različitih mišjih sojeva sličnog izgleda i slične nomenklature.

- Preporučuje se primjena pravilne nomenklature i prilikom odjelnih prezentacija u ležernoj, „neformalnoj” komunikaciji. Neformalna komunikacija postaje „formalna” kada se podatke konačno obradi za potrebe poster prezentacija, govornih prezentacija, publikacija i prijava projekata za financijsku potporu.

- U publikacijama i prijavama projekata za financijsku potporu, preporuča se primjena kompletne i pravilne nomenklature te porijeklo podsoja kod prvog navoda mišjeg soja u tekstu. potrebno je definirati koja kratica nomenklature

soja će se koristiti kasnije u tekstu i u podacima. U poglavlju koje opisuje metodologiju, navesti kompletnu nomenklaturu i porijeklo korištenih podsojeva. Nadalje, identificirati porijeklo soja, ime laboratorija, instituta i/ili dobavljača te u tom slučaju evidentirati kataloški broj soja. Također, izvijestiti o broju rasplodnih generacija i pri tom korištene sheme parenja (vidi niže). Za dodatne preporuke, konzultirati se sa ARRIVE preporukama (www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines)

Parenje u visokom srodstvu, rodoslovlje i broj rasplodnih generacija

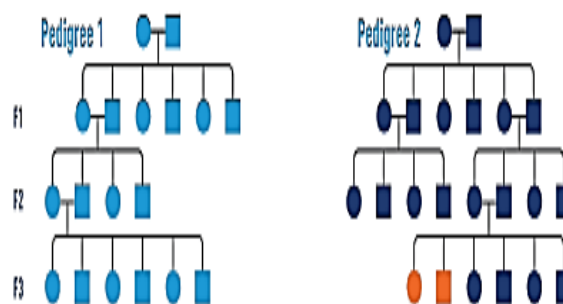
Parenje u visokom srodstvu dopušta bržu identifikaciju devijantnih fenotipova u mišjoj koloniji. Evidencija o rodoslovlju omogućava da se nepoželjnom mutacijom potencijalno afektirani i potvrđeno afektirani visoko srođeni miševi na vrijeme uklone iz kolonije (Slika 4). Broj rasplodnih generacija omogućava brzu identifikaciju potencijalne opasnosti od razvoja genetskog odstupanja u koloniji.

- Parenje u visokom srodstvu (engl. inbreeding) – pariti samo braću i sestre
- Rodoslovlje – Bilježiti podatke rasplodne ženke i mužjaka koji se koriste u svakom postupku parenja. Preporuča se uspostava i vođenje evidencije dva i više rodoslovlja unutar kolonije te pritom nikad ne križati

rasplodne životinje jednog rodoslovlja sa životinjama drugog rodoslovlja.

- Broj rasplodnih generacija
N = broj rasplodnih generacija sa ciljem prebacivanja poznate mutacije odnosno fenotipa na željeni soj (engl. backcrossing)
- F = parenje u visokom srodstvu, brat x sestra
- p = krioprezervacija
- + = razdvaja informacije o rasplodnim generacijama životinja
- ? = nepoznati brojevi rasplodnih generacija

Na primjer, „N6F12+F8” se odnosi na cikluse parenja soja koji se križao 6 puta sa ciljem prebacivanja poznate mutacije. Zatim se pario 12 puta u visokom srodstvu, a potom se prebacio u drugi laboratorij gdje se pario u visokom srodstvu još 8 puta. Uzimajući u obzir da se novi podsoj, kao posljedica genetskog odstupanja, javlja nakon 20 uzastopnih parenja u visokom srodstvu, bilo bi poželjno osvježiti genotipsku osnovu kolonije iz gornjeg primjera.



Slika 4: Održavanje kolonije poznatog rodoslovlja

Prema Slici 4, potrebno je pariti samo sestru x brata (krug x kvadrat), u paru (mužjak x ženka) ili haremski (jedan mužjak x dvije ženke), vodeći evidenciju za 2 ili više rodoslovlja po koloniji (svjetlo plava vs. tamno plava), nikada ne miješajući rasplodne životinje jednog rodoslovlja sa drugim. Ako se nepoželjni fenotipovi (narančasto) pojave unutar kolonije jednog rodoslovlja, afektirani pojedinci se lakše identificiraju i uklone iz kolonije. Neafektirane životinje (Rodoslovlje 1, svjetlo plavo) mogu se onda podijeliti u dva nova rodoslovlja, bez gubljenja vremena na uspostavu nove kolonije.

Prikupljanje podataka i osiguranje kvalitete u koloniji

Osim što treba paziti na sheme parenja u praksi, sojeve valja redovito promatrati kako bi se uočile bilo kakve promjene u fenotipu kolonije. Kada se radi o praćenju dokaza genetskog odstupanja, promjene u fenotipu mogu se pratiti kroz vidljive razlike ili izmjerene razlike: na primjer, razlike u izgledu, ponašanju, rasplodnim rezultatima ili razlike u eksperimentalnim očitanjima. Voditelj uzgojne nastambe i istraživači su obučeni i u poziciji da prvi identificiraju nastale fenotipske promjene, i da, shodno tome, poduzmu mjere sprečavanja genetskog odstupanja.

Za neke suvremene sojeve, usporedba sa karakteristikama ishodišnog soja (transgeničnih

predaka) može pomoći u sprečavanju daljnjeg genetskog odstupanja. „Mouse Phenome Database“ (baza mišjih fenotipova) je baza koja sadrži informacije o karakteristikama sojeva i može se pretraživati koristeći ime soja ili fenotip a sadrži i sve protokole prikupljanja podataka (<http://phenome.jax.org>) (Tablica 2).

Ako se unutar kolonije fenotip promijenio, genetsko odstupanje jedno je od mnogih varijabli koje su potencijalni krivci za utvrđenu varijabilnost i vrijedi ga istražiti.

Pitanja koja pri tom treba uzeti u obzir:

- Koliko miševa je afektirano i može li se promjena u fenotipu retrogradno slijediti do određenog kaveza ili kolonije poznatog rodoslovlja?
- Koliko godina i kroz koji broj rasplodnih generacija je kolonija prisutna u dotičnoj uzgojnoj nastambi?
- Kada je bio posljednji postupak osvježavanja (obnove) kolonije (vidi slijedeće poglavlje) i koje je bilo porijeklo miševa koji su se pri tom koristili?

Bez pažljivo vođenih bilježaka i referentnih podataka o uspostavi i održavanju kolonije, nemoguće je utvrditi kada je došlo do promjene fenotipa.

Postupci osvježavanja genetske osnove kolonije

Nakon uspostave kolonije s potomstvom dobivenim uzastopnim

visoko srodnim (engl. inbreeding) parenjem kroz 5-10 rasplodnih generacija, mišje kolonije bi trebalo osvježiti, kako bi se spriječilo akumuliranje genetskog odstupanja u koloniji. Metode osvježavanja genetskog osnova kolonije mogu uključivati slijedeće postupke:

Prebacivanje željenog fenotipa na određeni soj miševa (engl. backcrossing)

- „Genetically Engineered Mutant Mouse (GEMM)” (hrv. miševi mutanti dobiveni transgeničnom tehnologijom) su sojevi genetski modificiranih miševa koji se mogu križati s odgovarajućim visokosrođenim ili hibridnim sojem dostupnim kod renomiranih komercijalnih uzgajivača koji u svojoj uzgojnoj praksi primjenjuju metode ograničavanja pojave genetskog odstupanja. Križanje sa svrhom prebacivanja željenog fenotipa odnosno poznate mutacije (engl. backcrossing) na ciljani soj treba provesti koristeći muške i ženske rasplodne životinje kako bi se osiguralo da se oba spolna kromosoma osvježe. Ako se soj (heterozigotni ili homozigotni) križa do statusa divljeg tipa, tada visokosrođeni mišji soj kojeg isporuči komercijalni proizvođač kolonije miševa u divljem tipu služi kako bi se osvježila genetska osnova kolonije miševa krajnjeg korisnika. Kod evidentiranja rasplodne generacije, svako križanje ili osvježavanje označi se sa dodatnim „N” (vidi prijašnje poglavlje).

- Nabava novih rasplodnih (roditeljskih) parova. Kolonija visokosrođenih miševa kod krajnjeg korisnika se može obnoviti nabavom i uvođenjem novog rasplodnog para miševa direktno od komercijalnog uzgajivača ili iz pouzdanog repozitorija koji u uzgojnoj praksi provode mjere osiguranja genetske kvalitete životinja odnosno mjere sprečavanja genetskog odstupanja.

- Obnova kolonije biološkim materijalima iz kriorepозitorija. Genetsko odstupanje može se pouzdano spriječiti samo prestankom parenja životinja. Krioprezervacija sperme ili embrija mišjih sojeva jedinstvenog genotipa te onih koji se rijetko koriste u istraživanjima, pouzdana je mjera sprečavanja genetskog odstupanja i mjera je prevencije gubitka vrijednog soja transgeničnih miševa kao i mjera smanjenja troškova održavanja kolonije. Krioskladišteni biološki materijal služi da se obnovi kolonija miševa koja je doživjela greške u rasplodnoj praksi, genetsko odstupanje ili je pak izumrla zbog pojave zarazne bolesti ili prirodne katastrofe.

Potvrda genetske osnove (genotipa) kolonije

- Provesti analitički pregled i probir (skeniranje) genoma sa ciljem da se procijeni rizik od kontaminacije. Skeniranje genoma ili SNP (polimorfizam jednog nukleotida) niza pomaže razlikovanju dva podsoja u

bliskom srodstvu, kao što su to C57BL/6J i C57BL/6N.

- Sekvencirati genom. Sekvenciranje SNP niza (polimorfizam jednog nukleotida) neće identificirati genetsko odstupanje u koloniji. Jedini pouzdani način da se utvrdi genetsko odstupanje unutar soja jest provesti potpuni analitički pregled i probir genoma te njegovu usporedbu sa referentnim tj. ishodišnim genomom njihovih predaka.

Napredne metode limitiranja genetskog odstupanja

Koliki je rizik da laboratorij (krajnji korisnik) koji je utvrdio genetsko odstupanje u svojoj aktivnoj rasplodnoj koloniji nabavkom rasplodnog para iz repozitorija uzgajivača u svoju rasplodnu koloniju uvede nepoželjnu genetsku kontaminaciju, nastalu kod uzgajivača?

Mišji repozitoriji i uzgajivači, u pravilu, održavaju puno veće kolonije u kojima rjeđe dolazi do genetskog odstupanja (Slika 1A). Dodatno, brojni repozitoriji i uzgajivači profesionalno primjenjuju gore spomenute strategije gospodarenja kolonijom, kao što su primjena potpune nomenklature, parenje u visokom srodstvu, krioprezervaciju, ali i druge, naprednije metode.

Kako bi se procijenio stupanj genetskog odstupanja u velikim rasplodnim populacijama JL, analitički se pregledalo visoko srođene C57BL/6J miševe razdvojene sa 69 rasplodnih

generacija i 19 godina neprekinutog parenja. Između ove dvije populacije, identificirano je 669 jedinstvenih SNP (polimorfizam jednog nukleotida). Od njih, sedam je promijenilo slijed amino kiselina ili mjesto izrezivanja RNK. Prema procjenama i analizama, svakih 10 generacija pojavi se potentna mutacija (7 SNP/69 rasplodnih generacija) sposobna mijenjati funkciju proteina, pri tom ne računajući veće promjene kao što su delecije, inverzije, duplikacije koje imaju štetne fenotipske posljedice. Ako uzmemo u obzir da u prosjeku obuka dodiplomskog ili poslijediplomskog studenta u laboratoriju traje 5, a potom njegova karijera voditelja *in vivo* studija 20 i više godina, u mišjoj zajednici na kojoj je svo to vrijeme provodio istraživanja vrlo vjerojatno je nastupilo značajnije genetsko odstupanje. JL dulji niz godina distribuira miševe u sve zemlje svijeta i krajnjim korisnicima garantira sojeve miševa sa stabilnim i reproducibilnim genomom a što je izazov koji od JL uzgajivača zahtjeva provođenje ekstremnih mjera sa svrhom ograničavanja genetskog odstupanja.

JL sojevi su zaštićeni od akumuliranja genetskog odstupanja zahvaljujući primjeni kombinacije slijedećih praksi. Svi sojevi koji nose „J“ kod održavaju se kroz jedan i/ili oba programa osmišljena da ograniče i detektiraju genetsko odstupanje, a to su program genetske stabilnosti (GSP) i program genetske kontrole kvalitete. Sojevi označeni „J“ kodom uključuju

sve sojeve koji su uzgojeni i distribuirani u JL diljem SAD-a kao i one koji su uzgojeni i distribuirani iz CR uzgojnih nastambi diljem Europe i Japana. Kako bi se osigurala kontinuirana kvaliteta na svim uzgojnim lokacijama, JL redovito revidira i iznova odobrava prakse gospodarenja kolonijama. To podrazumijeva i primjenu identičnih krioskladištenih bioloških materijala koji se redovito uvode u postojeće žive kolonije (GSP, slijedeće poglavlje) ili se koriste u svrhu provedbe redovite obnove rasplodne kolonije. Zajedno, ove aktivnosti efikasno preveniraju genetsko odstupanje podsojeva.

Program genetske stabilnosti (GSP) za najčešće korištene visoko srodene (engl. inbred) „J” sojeve

Najčešće korišteni visoko srodni „J” sojevi održavaju se primjenom jedinstvenih strategija koje preveniraju akumulaciju genetskog odstupanja unutar mišje rasplodne kolonije. Američki ured za patente i robne marke izdao je 2009. i 2012. JL-u patente za GSP program (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/patented-genetic-stability-program>). Sojevi uzgojeni po principima GSP-a krioskladište se kao dvostanični embriji koji se iznova uvode (mikorinjiciranje embrija u jajovod – embriotransfer) u matičnu rasplodnu populaciju kako bi se u njoj

izbjegla akumulacija genetskog odstupanja.

Bez ovakve prakse, matična rasplodna kolonija održavala bi se isključivo parenjem u visokom srodstvu, između braće i sestara. Prije primjene patentiranih programa osiguranja kvalitete, redovita obnova matične rasplodne kolonije provodila se dva do četiri puta godišnje odabirom optimalnog brat-sestra rasplodnog para za uspostavu transgeničnog potomstva poznatog genetskog statusa (engl. founder colony). Korištenjem ovakvog pristupa, današnja matična rasplodna kolonija bi se genetski razlikovala od ishodišnih transgeničnih predaka, zahvaljujući nastalom genetskom odstupanju.

GSP praksa nalaže da se zamjena rasploda provodi pomoću zaliha krioskladištenih embrija visokosrođenih sojeva koji svi vuku porijeklo do svojih transgeničnih predaka. Zaliha zamrznutih embrija se koristi za obnovu rasplodne kolonije svakih pet (5) generacija. Periodična obnova rasplodne kolonije uvođenjem zamrznutih embrija (embriotransfer) smanjuje broj rasplodnih generacija nakon kojih se provodi nova obnova rasplodne kolonije. Prema tome, „J” sojevi kojima se gospodari prema GSP principima, zaštićeni su od genetskog odstupanja bez obzira na lokaciju uzgojne nastambe u kojoj se nalaze i bez obzira na „starost” to jest broj rasplodnih generacija mišje kolonije (Tablica 3).

Program kontrole genetske kvalitete

Osim primjene GSP principa u rasplodnoj praksi, „J” sojevi se još održavaju i po principima kontrole genetske kvalitete (GQC) (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>). Ovaj program integrira visoki stupanj odgovornosti kod provedbe brojnih principa koji se rutinski provode i u uzgojnim nastambama brojnih drugih krajnjih korisnika.

Profesionalno osoblje koje gospodari rasplodnom kolonijom obučeno je da uspješno identificira fenotipske varijante koje se očituju razlikama u boji krzna, za specifični soj netipičnoj veličini tijela, težini, skeletnoj strukturi, promjenama u ponašanju i reproduktivnim performansama, povećanoj incidenciji tumorskih oboljenja i smanjenu životnog vijeka. Svaki miš kod kojeg se utvrdio odmak od očekivanih, za soj specifičnih karakteristika, postaje predmet dodatnih analiza porijekla rodoslovlja i po potrebi se uklanja iz rasplodne kolonije.

Poželjno je željeno rodoslovlje mišjih kolonija održavati tako da se njima gospodari na lokacijama koje su odvojene od brojčano nadmoćnih rasplodnih i distribucijskih kolonija. Visokosrođeni sojevi se redovito analitički pregledaju i probiru ciljajući genetske anomalije ili dokaze genetske kontaminacije koristeći SNP

(polimorfizam jednog nukleotida) panel analiza, kako su u publikaciji objavili Petkov i sur., 2004.

JAX™ miševi uzgojeni u Charles River (CR u tekstu) uzgojnim nastambama diljem Europe i Japana

JL i CR posjeduju ugovor o suradnji kojim se osigurava redovita opskrba regionalnih uzgajivača diljem Europe, Japana, Koreje i Tajvana JAX™ miševima iz Amerike kao i istraživača koji provode biomedicinska istraživanja u istim regijama. Slijedeći stroge uzgojne protokole te protokole kontrole kvalitete, europski i japanski CR uzgajivači proizvode JAX™ sojeve miševa koji su mikrobiološkom i genetskom kvalitetom ekvivalentni sojevima koji se uzgajaju u JL uzgojnim nastambama diljem SAD. Za sve dodatne informacije pogledati link www.criver.com/jaxmice.

Zaključak

Genetsko odstupanje je neizbježna posljedica aktivnog rasploda mišje kolonije i pojava je koja može negativno utjecati na zaključke i reproducibilnost znanstvenog istraživanja koje se provodi na životinjama. Iako se genetsko odstupanje ne može u cijelosti eliminirati iz uzgoja, principi gospodarenja kolonijom miševa mogu se uspješno implementirati u individualnim uzgojnim nastambama krajnjih korisnika kao i u velikim

mišjim repozitorijima te kod komercijalnih uzgajivača, čime se garantira genetska stabilnost proizvedenih mišjih kolonija. Reproducibilnost i znanstvena otkrića ovise o pažljivom izvještavanju potpune nomenklature korištenih mišjih sojeva, kao i uzgojnih principa koji su doveli do uspostave kolonije određenog mišjeg podsoja.

Literatura

- Adams, D.J., Doran, A.G., Lilue, J., and Keane, T.M. (2015). The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 26, 403–412.
- Asuni, A.A., Hilton, K., Siskova, Z., Lunnon, K., Reynolds, R., Perry, V.H., and O'Connor, V. (2010). Alpha-synuclein deficiency in the C57BL/6J^{OlaHsd} strain does not modify disease progression in the ME7-model of prion disease. *Neuroscience* 165, 662–674.
- Boleij, H., Salomons, A.R., van Sprundel, M., Arndt, S.S., and Ohl, F. (2012). Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. *PloS One* 7, e42544.
- Bryant, C.D. (2011). The blessings and curses of C57BL r 129 mouse substrains. *PloS One* 7, e42544. /6 substrains in mouse genetic studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1245, 31.
- Bryant, C.D., Zhang, N.N., Sokoloff, G., Fanselow, M.S., Ennes, H.S., Palmer, A.A., and McRoberts, J.A. (2008). Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J. Neurogenet.* 22, 315–331.
- Cariappa A., Takematsu H., Liu H., Diaz S., Haider K., Boboila C., Kalloo G., Connole M., Shi H.N., Varki N., Varki A., Pillai S. (2008). B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):125-38.
- Chamary, J.-V., and Hurst, L.D. (2004). Similar Rates but Different Modes of Sequence Evolution in Introns and at Exonic Silent Sites in Rodents: Evidence for Selectively Driven Codon Usage. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1014–1023.
- Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D., i sur. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 148, 1667–1686.
- Frazer, K.A., Eskin, E., Kang, H .M., Bogue, M.A., Hinds, D.A., Beilharz, E.J., Gupta, R.V., Montgomery, J., Morenzoni, M.M., Nilsen, G.B., i sur. (2007). A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448, 1050–1053.
- Freeman, H.C., Hugill, A., Dear, N.T., Ashcroft, F.M., and Cox, R.D.

(2006). Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 55, 2153–2156.

Hull, R.L., Willard, J.R., Struck, M.D., Barrow, B.M., Brar, G.S., Andrikopoulos, S., and Zraika, S. (2017). High fat feeding unmasks variable insulin responses in male C57BL/6 mouse substrains. *J. Endocrinol.* 233, 53–64.

Liron, T., Raphael, B., Hiram-Bab, S., Bab, I.A., and Gabet, Y. (2017). Bone Loss in C57BL/6J-OlaHsd Mice, a Substrain of C57BL/6J Carrying Mutated Alpha-Synuclein and Multimerin-1 Genes. *J. Cell. Physiol.*

Mahajan, V.S., Demissie, E., Mattoo, H., Viswanadham, V., Varki, A., Morris, R., and Pillai, S. (2016). Striking Immune Phenotypes in Gene-Targeted Mice Are Driven by a Copy-Number Variant Originating from a Commercially Available C57BL/6 Strain. *Cell Rep.* 15, 1901–1909.

Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.-C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). 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.* 53, 2921–2927.

Mulligan, M.K., Ponomarev, I., Boehm, S.L., Owen, J.A., Levin, P.S., Berman, A.E., Blednov, Y.A., Crabbe, J.C., Williams, R.W., Miles, M.F., i sur. (2008). Alcohol trait and transcriptional

genomic analysis of C57BL/6 substrains. *Genes Brain Behav.* 7, 677–689.

Nicholson, A., Reifsnyder, P.C., Malcolm, R.D., Lucas, C.A., MacGregor, G.R., Zhang, W., and Leiter, E.H. (2010). Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) gene. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1902–1905.

Pelkonen, A., and Yavich, L. (2011). Neuromuscular pathology in mice lacking alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 487, 350–353.

Peña-Oliver, Y., Buchman, V.L., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Schumann, G., Ripley, T.L., King, S.L., and Stephens, D.N. (2012). Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice. *Genes Brain Behav.* 11, 137–146.

Petkov, P.M., Cassell, M.A., Sargent, E.E., Donnelly, C.J., Robinson, P., Crew, V., Asquith, S., Haar, R.V., and Wiles, M.V. (2004). Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 83, 902–911.

Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., i sur. (1998a). Genetic and Physical Mapping of the *Lps* Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells. Mol. Dis.* 24, 340–355.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X.,

Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., i sur. (1998b). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088.

Russell, L.B., and Russell, W.L. (1996). Spontaneous mutations recovered as mosaics in the mouse specific-locus test. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13072–13077.

Silver, L. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications* (Oxford, New York: Oxford University Press)

Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E.J., i sur. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* 14, R82.

Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2, 11.

Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2004). Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics* 83, 1176–1178.

Watson, J., Kelly, K., Largen, M., and Taylor, B.A. (1978). The Genetic Mapping of a Defective Lps Response Gene in C3H/HeJ Mice. *J. Immunol.* 120, 422–424.

Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2009). Methods for maintaining genetic stability of inbred animal strains.

Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2012). Methods for maintaining

genetic stability of inbred animal strains.

Wong, N., Blair, A.R., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2010). The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151, 96

Principi održavanja osposobljenosti (bodovanje trajnog stručnog usavršavanja) u području znanosti o laboratorijskim životinjama (engl. Laboratory Animal Science-LAS u tekstu)

**Pripremila: Daša Ševeljević-Jaran
(radna verzija, 17. Studenog 2021)**

**Evaluirali i odobrili članovi CroLASA
radne skupine (imenovanje radne
skupine na redovnoj skupštini
CroLASA, Travanj 2021): Vesna
Benković, Krešimir Sever, Ilija Brzić**

Europska komisija je 2014. objavila najnovije smjernice (minimalne zahtjeve za osposobljavanje) o razvoju zajedničkog okvira za obrazovanje i osposobljavanje u skladu sa zahtjevima članaka 23. i 24. Direktive 2010/63/EU (Direktiva u tekstu) o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

Smjernice su se razvile kao odgovor na potrebu za usklađenošću i zajedničkim EU okvirom za osiguranje osposobljenosti te mobilnosti i zapošljavanja profesionalnog osoblja diljem EU. Svakoj se državi članici prepušta tumačenje treba li provesti ove općenite smjernice te na koji način.

U predloženom okviru za obrazovanje i osposobljavanje i povezanih ishoda učenja prepoznaje se da bi osposobljavanje trebalo biti povezano s potrebama.

Nastavno na objavu komisije, FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations - Savez europskih udruženja za znanost o laboratorijskim životinjama) je 2018. u svom službenom časopisu Laboratory Animals objavila detaljnije obrazovne smjernice za tzv. modularno obrazovanje po funkcijama (autor Marcel Gyger i suradnici) svih osoba uključenih u korištenje životinja i skrb o njima za potrebe provedbe znanstvenih eksperimenata (vidi tabularni prikaz predloženog okvira modularnog osposobljavanja, niže).

U Hrvatskoj, Ministarstvo poljoprivrede (Nadležno Ministarstvo - NM u tekstu) vodi registar pravnih ili fizičkih osoba koji provode osposobljavanje u skladu sa minimalnim zahtjevima Direktive u području zaštite životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Također, NM vodi evidenciju radnog iskustva pojedinca na odgovarajućem području te njen/njegov specifični broj (identifikator) potvrde o osposobljavanju.

Pravne ili fizičke osobe koje provode osposobljavanje mogu biti fleksibilne u pogledu odabira sadržaja tečaja, materijala za osposobljavanje i metoda rada kojima će se zajedno postići ishodi učenja na način kojim se ispunjavaju njihovi

nacionalni/lokalni/institucijski i/ili pojedinačni/skupni zahtjevi. Isti mogu ostvariti svoje diskrecijsko pravo pri uključivanju dodatnih informacija u provođenje osposobljavanja usmjerenog na pojedine potrebe.

Kako bi ispunile obveze na temelju članka 23, države članice obvezne su osigurati da je osoblje odgovarajuće osposobljeno, bez obzira da li je osposobljavanje stečeno lokalno, regionalno, nacionalno ili međunarodno. Pouzdanost u standarde osposobljavanja i ishode nužna je i zahtjeva uspostavu povjerenja i poboljšane komunikacije kako bi se među državama članicama ostvarilo uzajamno priznavanje. Svi tečajevi trebaju uključivati neki oblik neovisnog nadzora /odobrenja, a to se treba primjenjivati i na lokalne tj. interne tečajeve osposobljavanja.

Sustav za promicanje uzajamnog priznavanja i kvalitete osposobljavanja na razini EU-a treba biti isplativ uz minimalno administrativno opterećenje. S obzirom na to da za ove potrebe nema dostupnih posebnih financijskih sredstava, moguće koristi trebale bi biti dovoljno privlačne zajednici korisnika i zainteresiranim sudionicima procesa stručnog usavršavanja.

Terminologija

Osposobljenost - kombinacija znanja, vještina i ponašanja koja se upotrebljava za povećanje uspješnosti

(širi koncept kojim su obuhvaćeni vještine, znanje i iskustvo).

Kompetencija - sposobnost osobe da uspješno izvrši zadatak (mnogo uži pojam, naglasak na aktivnosti ili zadatku).

Minimalni zahtjevi za obrazovanje u LAS području, tzv. modularno obrazovanje, po funkcijama - funkcije A-D predviđene člankom 23 Direktive, stavkom 2.5 (u Hrvatskoj su pri NM-u registrirane 4 pravne osobe za osposobljavanje).

Trajno stručno usavršavanje (TSU) - cjeloživotno sustavno usavršavanje osoba koje su uključene u istraživačke postupke na laboratorijskim životinjama. Hrvatska udruga CroLASA uz podršku Nadležnog Ministarstva osigurava neophodni broj (virtualnih) TSU tečajeva godišnje za različite funkcije (A-D), čime se osigurava ciljani broj godišnjih TSU bodova, predviđen ovim pravilnikom.

TSU shema bodovanja - opisuje proces stjecanja cjeloživotnog osposobljavanja (održavanje osposobljenosti) osoba koje sudjeluju u znanstvenim istraživanjima na životinjama bodovanjem provedenog stručnog osposobljavanja.

Zadatak - zadaci utvrđeni npr. u člancima 24 (povjerenik za zaštitu dobrobiti životinja itd.), 25 (imenovani veterinar) i 38 (etička procjena projekta) itd.

Kongres/simpozij - skup većeg broja znanstvenika i stručnjaka koji sveobuhvatno obrađuje jedno ili više područja iz biomedicine u skladu s minimalnim zahtjevima Direktive za osposobljavanje osoba. Znanstveni i organizacijski odbor radna su tijela kongresa/simpozija.

Stručno znanstveni skup - skup koji se bavi užom temom iz područja biomedicine. Organizacijski odbor radno je tijelo stručnog znanstvenog skupa.

Tečaj/webinar - obrazovni program koji sadrži jedan modul ili više njih, osmišljen za ispunjavanje potreba za osposobljavanjem osoba utvrđenih u Direktivi (minimalni zahtjevi za osposobljavanjem).

Tečajevi stručnog usavršavanja obuhvaćaju teoretske i praktične postupke temeljene na novim stručnim i znanstvenim spoznajama koji se primjenjuju u biomedicini.

1) Minimalni zahtjevi za obrazovanje iz LAS područja: pravna podloga Direktive 2010/63/EU - članak 23, stavka 1: osposobljavanje provode pravne i fizičke osobe registrirane kod NM-a

Države članice osiguravaju da svaki uzgajivač, dobavljač i korisnik ima dovoljno osposobljenog osoblja na lokaciji.

Osoblje mora biti odgovarajuće obrazovano i osposobljeno prije

obnašanja bilo kojeg od sljedećih poslova (funkcija):

A = osoba koja izvodi zahvate na životinjama: tehničar

B = osoba koja osmišljava postupke i projekte: voditelj projekta (engl. Principal Investigator), direktor studije (engl. Study Director)

C = osoba koja skrbi za životinje: timaritelj

D = osoba koja usmrćuje životinje

Osobe koje obnašaju poslove iz točke B obično bi trebale imati sveučilišnu diplomu ili ekvivalent tome u odgovarajućoj znanstvenoj disciplini. To je važan preduvjet koji osigurava da takve osobe mogu učinkovito primijeniti načela zamjene, smanjenja i poboljšanja (3R u tekstu) te specifična komparativna znanja o raznim životinjskim vrstama pri osmišljavanju postupaka i projekata te donijeti odgovarajuće etičke i znanstvene prosudbe.

Za funkcije iz točke A, C ili D ne bi se trebale zahtijevati nikakve posebne obrazovne kvalifikacije, a osobe na tim poslovima će se nadzirati u provođenju svojih zadataka dok ne postignu potrebnu stručnu osposobljenost.

Vrijeme potrebno pojedincima za postizanje ishoda učenja i dovršavanje modularnog osposobljavanja znatno će se razlikovati ovisno o pojedincu, metodi podučavanja i procjeni. Trajanje razdoblja nadzora i vrijeme utrošeno na postizanje osposobljenosti jednako će se

tako razlikovati, na primjer zbog učestalosti/dostupnosti zadatka koji se izvršava, tehničke složenosti i sposobnosti pojedinca.

Cilj je minimalnog osposobljavanja postizanje temeljnog znanja i/ili razumijevanja uz ideju da bi se temeljitije razumijevanje te stručnost u vještinama trebali najbolje razviti putem primjene teorije u praksi do trenutka procjene osposobljenosti. Osposobljavanje bi se trebalo smatrati kontinuiranim procesom, od početnoga modularnog osposobljavanja kroz razdoblje rada pod nadzorom do postizanja osposobljenosti.

Pojedinci održavaju osposobljenost procesom trajnog obrazovanja (trajno stručno usavršavanje).

Ako za vrijeme obnašanja nekog od poslova na životinjama postoji vjerojatnost da im se uzrokuje bol, patnja, stres ili trajno oštećenje, prije rada pod nadzorom rukovatelj životinje treba optimalno završiti odgovarajući modul za osposobljavanje. U suprotnome, polaznik osposobljavanja može započeti s radom pod nadzorom.

Modularna struktura obrazovanja, po funkcijama

Ovdje predstavljeni moduli proizašli su iz objavljenih FELASA smjernica (dostupne u Prilogu II ovog dokumenta) autora Gyger M i

suradnika (FELASA accreditation of education and training courses in laboratory animal science according to the Directive 2010/63/EU. Laboratory Animals journal 2018.) te uključuju module koji se smatraju minimalnim osposobljavanjem potrebnim prije nego što se osobama dopusti obnašanje funkcija (A-D) i neki dodatni moduli potrebni za izvršavanje specifičnih zadataka.

Opširnije informacije o sadržaju modula i povezanih ishoda učenja dostupne su u: Radni dokument EU Komisije o razvoju zajedničkog okvira za obrazovanje i osposobljavanje, Bruxelles, 2014.

(http://www.crolasa.com/wp-content/uploads/2021/06/Obrazovanje_osposobljavanje_okvir_2010_63_EU-HR.pdf).

U niže navedenoj Tablici 1 prikazana je modularna struktura obrazovanja po funkcijama.

Tablica 1: Modularna struktura obrazovanja po funkcijama

EU ID	Opis modula	EU funkcija			
		A	B	C	D
1	Nacionalno zakonodavstvo	T	T	T	T
2	Etika, dobrobit životinja i 3R načela	T	T	T	T
3.1	Komparativna biologija - za specifične vrste (teorija)	T	T	T	T
3.2.	Komparativna biologija - za specifične vrste (praksa)	U	U	U	U
4	Skrb, zdravstvena zaštita i gospodarenje životinjama	T	T	T	T
5	Prepoznavanje boli, patnje i stresa - za specifične vrste	T	T	T	T
6.1	Humane metode usmrćivanja (teorija)	T	T	T	T
6.2	Humane metode usmrćivanja (vještine)	SV	SV	SV	U
7	Minimalno invazivni zahvati bez anestezije - za specifične vrste (teorija)	U	U		
8	Minimalno invazivni zahvati bez anestezije - za specifične vrste (praksa)	U			
9	Etika, dobrobit životinja i 3R načela (druga razina)		U		
10	Osmišljavanje postupaka i projekata (prva razina)	SV	U		
6.2	Osmišljavanje postupaka i projekata (druga razina)		U		
20	Anestezija za manje kirurške zahvate	T	T		
21	Napredna anestezija za kirurške i dugotrajne zahvate	T	T		
22	Kirurška dobra praksa	SV	SV		
23	Napredni uzgoj životinja, skrb i prakse obogaćivanja kaveza			SV	
24	Imenovani veterinar		D		
25	Etička evaluacija projekata		D		...

T: temeljni moduli (engl. core modules); moduli su koji su neophodni/obavezni za obnašanje svih funkcija A-D; **U:** (uvjetni) moduli, nužni za specifične funkcije (engl. function-specific (prerequisite) modules); **SV:** dodatni moduli i moduli za učenje specijaliziranih vještina te cjeloživotnog učenja (engl. task-specific modules); **D:** drugi dodatni modul (engl. other modules)

2) Trajno stručno usavršavanje (TSU) i održavanje osposobljenosti (princip/shema bodovanja): u nadležnosti CroLASA-e, uz podršku NM-a koje, na zajednički zahtjev CroLASA-e i osobe koja produljuje LAS licencu, istu odobrava i registrira promjenu u statusu licence.

Člankom 23, stavkom 3 Direktive zahtijeva se da osoblje trajno održava osposobljenost shemom trajnog (cjeloživotnog) stručnog usavršavanja - TSU u tekstu (engl. Continuing Professional Development - CPD).

TSU shema bodovanja

Temelji se na dodjeljivanju bodova za sudjelovanje u stručnim obrazovnim aktivnostima kroz period od 5 godina, od kojih se 50 % mora postići pohađanjem modularnog obrazovanja koje podliježe temeljitim revizijama stručnog tijela, a u skladu su sa FELASA smjernicama.

Ostalih 50 % može se ostvariti aktivnostima (domaćim i međunarodnim) koje, prema potrebama i specifičnostima posla, prepoznaje i priznaje poslodavac ili ih organizira za svoje zaposlenike na radnom mjestu (lokalni ili interni tečajevi se razlikuju ovisno u specifičnosti poslovnih zadatka i njihovoj tehničkoj složenosti).

Potvrda o sudjelovanju na TSU tečaju treba sadržavati ime sudionika (vidi primjere evidencija obrazovanja niže u dokumentu), naziv pravne osobe/pravnih osoba koje provode obrazovanje te naslov aktivnosti kao i predviđeni broj TSU bodova

dodijeljenih svakoj aktivnosti na rasporedu.

Potvrde se izdaju svakodnevno, završetkom pojedinačnih aktivnosti ili nakon završetka svih aktivnosti najdalje unutar 15 dana, a izdaju se na izričit zahtjev sudionika ako nije drugačije unaprijed dogovoreno.

Godišnji plan trajnog stručnog usavršavanja - TSU u Hrvatskoj

Shema TSU bodovanja slijedi jednostavni princip po kojem jedan sat obrazovanja vrijedi 1 TSU bod (iznimke su izlistane niže u Bodovnoj listi):

- osoba koja obnaša poslove D i C treba godišnje ostvariti 3 TSU boda (tj. minimalno 15 kroz 5 godina)
- osoba koja obnaša funkcije C i A treba godišnje ostvariti 3 TSU boda godišnje (tj. minimalno 15 kroz 5 godina)
- osoba koja obnaša funkciju B treba godišnje ostvariti 5 TSU boda godišnje (minimalno 25 kroz 5 godina)
- osobe koje obnašaju specifične funkcije kao što su imenovani veterinar, povjerenik za zaštitu dobrobiti životinja i slične funkcije, trebaju godišnje ostvariti 7 TSU boda (minimalno 35 TSU boda kroz 5 godina).

Obaveza stručnog usavršavanja

Osoba koja obnaša poslove funkcije A-D, u cilju ostvarivanja uvjeta za produljenje odobrenja za samostalan rad (licence) obvezna je u razdoblju važenja licence (pet godina) steći najmanje 15-35 bodova prema godišnjem planu TSU (gore) i Bodovnoj listi (dolje).

Ako osoba koja obnaša funkcije A-D u petogodišnjem vremenskom razdoblju ne ostvari propisani broj bodova po osnovi stručnog usavršavanja za produljenje odobrenja za rad (licence), ista je obvezna najkasnije u roku 6 mjeseci predložiti CroLASA-i dokaze o sakupljenim propisanim bodovima, što je uvjet obnavljanja licence.

Osoba koja produljuje odobrenje za rad dužna je CroLASA-i predati zahtjev za produljenje licence, u kojoj se navodi datum isteka licence te ostvareni broj bodova uz potvrdu poslodavca (tj. odjela za ljudske resurse ili odjela osiguranja kvalitete) da je TSU bodovanje prošlo predviđene nezavisne interne kontrole.

CroLASA će u dogovoru s Nadležnim Ministarstvom izdati obnovljenu licencu (na temelju postojeće evidencije u posjedu Nadležnog Ministarstva o kategoriji osposobljenosti i broju potvrde o osposobljavanju).

Okvir za uzajamno prihvaćanje stručnog osposobljavanja

Načela za okvir za uzajamno odobravanje (iznimno akreditaciju, npr. FELASA E&T akreditacija) potrebna su kao temelj za uzajamno prihvaćanje osposobljavanja provedenog na drugom mjestu.

Trenutačno ne postoji jedinstveni ili zajednički sustav za dobivanje „odobrenja“ među državama članicama.

Na nivou EU dostupni su forum za razmjenu informacija i središnji arhiv o dostupnosti/sadržaju tečajeva (ETPLAS - Education and Training Platform for Laboratory Animal Science, <https://etplas.eu/courses/>) a mehanizmi/resursi dostupni za osiguravanje informacija i dalje se ažuriraju na različitim LAS relevantnim portalima (npr. popis aktualnih LAS tečajeva na portalu NORECOPA - Norway's National Consensus Platform for the advancement of "the 3 Rs", <https://norecopa.no/education-training/courses>).

BODOVNA LISTA

1. Poslijediplomski studij/ specijalizacija

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
<i>Poslijediplomski studij /specijalizacija</i>	<i>Sveučilišni poslijediplomski studij za stjecanje akademskog stupnja iz područja biomedicine i zdravstva</i>	
	<i>Polaznik (BSc, MSc ili PhD)</i>	1 TSU bod/h
	<i>Predavač</i>	
	<i>Dodiplomski ili poslijediplomski studij</i>	1 TSU bod/h
	<i>Ispiti s pisanim testom</i>	2 TSU boda/h

2. Domaći i međunarodni LAS skupovi: virtualni, hibridni ili in-vivo (kongresi, simpoziji, stručno znanstveni skupovi, modularni tečajevi (2010/63/EU), TSU tečajevi, radionice etc)

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
<i>In vivo, hibridni i virtualni LAS znanstveni skupovi</i>	<i>aktivno sudjelovanje (član organizacijskog i/ili znanstvenog povjerenstva)</i>	5 TSU boda/kongresu
	<i>aktivno sudjelovanje, pozvani predavač, plenarno predavanje</i>	4 TSU boda/h
	<i>aktivno sudjelovanje, pozvani predavač</i>	3TSU boda/h
	<i>aktivno sudjelovanje, poster prezentacija</i>	2 TSU boda/h
	<i>pasivno sudjelovanje</i>	1 TSU bod/h

3. Publikacije

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
<i>Publikacije</i>	<i>Objavljivanje radova</i>	
	<i>Proi autor, stručni radovi citirani u "CURRENT CONTENTS" ili "SCIENCE CITATION INDEX" časopisu na temu 3R i zaštite dobrobiti životinja</i>	5 TSU boda/publikaciji
	<i>Ko-autor stručni radovi i/ili znanstveni radovi citirani u "CURRENT CONTENTS" ili "SCIENCE CITATION INDEX" časopisu na temu 3R i zaštite dobrobiti životinja</i>	2 TSU boda/publikaciji
	<i>Autorstva u znanstvenoj i stručnoj literaturi</i>	
	<i>knjiga/udžbenik/priručnik</i>	15 TSU boda/publikaciji
	<i>poglavlje u knjizi/udžbeniku</i>	10 TSU boda/publikaciji
	<i>Uredništvo i revizija</i>	
	<i>urednik knjiga</i>	5 TSU boda/reviziji
<i>revizija znanstvenog rada (znanstvenog projekta)</i>	5 TSU boda/reviziji	

4. Mentorstva

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
<i>Mentorstva</i>	<i>mentorstvo magistarski, doktorski studij, specijalistički studij</i>	5 TSU boda/studentu/godini
	<i>Mentorstvo (stručni nadzor i treniranje novozaposlenih u znanstvenim istraživanjima na životinjama, na radnom mjestu)</i>	3 TSU boda/zaposleniku/godini

5. Studijski boravci

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
Studijski boravci	Studijski boravci u zemlji i inozemstvu	
	od 5 dana do mjesec dana	3 TSU boda/ po promjeni sredine
	više od mjesec dana	5 TSU boda/po promjeni sredine

6. *Ostali načini usavršavanja*

	<i>Sustav vrednovanja (bodovanja) LAS stručnog usavršavanja</i>	<i>Ukupan broj bodova</i>
<i>Ostali načini usavršavanja</i>	<i>član institucijskog etičkog povjerenstva</i>	3 TSU boda/godini
	<i>član nacionalnog etičkog povjerenstva</i>	4 TSU boda/godini
	<i>član stručnog povjerenstva nominiranog od strane nadležnog ministarstva</i>	4 TSU boda/godini
	<i>član ekspertne radne skupine (na pr. FELASA, COST akcije i sl.)</i>	5 TSU boda/godini
	<i>„e-learning“ LAS tečajevi</i>	1 TSU bod/h
	<i>privatna pretplata na stručne i znanstvene časopise</i>	1 TSU bod/godišnjoj pretplati

Vođenje evidencije obrazovanja i osposobljavanja (primjeri obrazaca)

Ime i prezime: _____ Datum početka: _____ Potpis _____ Inicijali ____/____/____

1. Evidencija osposobljavanja za modul

Modul	Temeljni / Za specifični posao / Dodatni	Vrsta	Pružatelj osposobljavanja	Datum osposobljavanja (Početak)	Datum osposobljavanja (završetak)	Potvrdio (Ime i prezime / funkcija / potpis)

Broj obrasca:

Datum izdavanja:

2. Postupci/Vještine

Postupak	Vrsta	Polaznik pod nadzorom				Postignuta osposobljenost			Postignut status voditelja osposobljavanja		
		Datum	Razina nadzora	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)

4 – Nadzornik je prisutan tijekom provođenja postupka te pruža izravan nadzor i savjete

3 – Nadzornik je svjestan provođenja postupaka i dostupan za hitnu intervenciju bude li potrebna (npr. nalazi se u blizini postupka)

2 – Nadzornik je svjestan provođenja postupaka i dostupan za pružanje savjeta prema potrebi (npr. nalazi se u blizini objekta)

1 – Nadzornik je svjestan provođenja postupaka i dostupan za razgovor kako bi pružio savjete prema potrebi (npr. telefonom)

0 – Nije potreban nadzor

Broj obrasca:

Datum izdavanja:

3. Trajno stručno usavršavanje i vanjsko osposobljavanje

Osposobljavanje	Unutarnja revizija		
	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)
Opis i datum(i) tečaja i postignuti ishod / potvrda			

Broj obrasca:

Datum izdavanja:

4. Opći moduli za osposobljavanje (npr. zdravlje i sigurnost; zaštita)

Zahtjev za osposobljavanje (unutarnji)	Polaznik pod nadzorom			Postignuta osposobljenost			Postignut status voditelja osposobljavanja		
	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)	Datum	Polaznik osposobljavanja (inicijali)	Voditelj osposobljavanja (inicijali)

Broj obrasca:

Datum izdavanja:

**Kontrolna Lista
PREPARE Smjernica
Planning Research and
Experimental Procedures
on Animals:
Recommendations for
Excellence
(Pripreme za provedbu
istraživanja na
laboratorijskim
životinjama u
znanstvene svrhe:
preporuke za izvrsnost)**

Autori: Adrian J. Smith^a, R. Eddie Clutton^b,
Elliot Lilley^c, Kristine E. Aa. Hansen^d &
Trond Brattelid^e

^aNorecopa, c/o Norwegian Veterinary
Institute, Oslo, Norway; ^bRoyal (Dick) School of
Veterinary Studies, Midlothian, U.K.; ^cResearch
Animals Department, Science Group, RSPCA,
West Sussex, U.K.; ^dSection of Experimental
Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine,
Norwegian University of Life Sciences, Oslo,
Norway; ^eDivision for Research Management
and External Funding, Western Norway
University of Applied Sciences, 5020 Bergen,
Norway.

PREPARE se sastoji od smjernica za
pripremu i provedbu istraživanja na
životinjama koje su komplementarne sa
ARRIVE smjernicama za izvještavanje
rezultata istraživanja na životinjama.

PREPARE kontrolna lista pokriva
tri šira područja koja osiguravaju
kvalitetu pripreme i provedbe
istraživanja na laboratorijskim
životinjama (*in-vivo*
istraživanje/projekt dalje u tekstu):

1. Opis (svrha i sadržaj) znanstvene
studije
2. Komunikacija između znanstvenika
(voditelja projekta, korisnika nastambe)
i osoblja koje upravlja nastambom za
laboratorijske životinje
3. Kontrola kvalitete svih komponenti
in-vivo istraživanja

Kod priprema studije ne treba se
striktno držati navedenog redosljeda
budući se područja preklapaju.

PREPARE kontrolna lista može se
po potrebi prilagoditi i specijalnim
oblicima istraživanja kao na primjer
onima u okviru terenskih studija.
PREPARE sadrži i smjernice
upravljanja nastambom za
laboratorijske životinje budući dobre
prakse gospodarenja životinjama utječu
na kvalitetu in-vivo istraživanja koja se
u nastambi provode. Cjelovita verzija
smjernica te brojne poveznice na srodne
globalne sadržaje dostupne su na
Norecopa mrežnoj stranici
<https://norecopa.no/PREPARE>.

PREPARE kontrolna lista
dinamični je dokument koji će se
nadopunjavati budućim smjernicama
koje generalno proizlaze iz najnovijih
znanstvenih spoznaja u području
znanosti o laboratorijskim životinjama.

Područje	Preporuke
A) Opis studije	
1. Pregled literature	<ul style="list-style-type: none"> • Iznesite jasnu hipotezu sa primarnim i sekundarnim ishodima studije. • Razmislite o provedbi sistematičnog pregleda literature. • Napravite izbor ključnih stručnjaka i baza podataka koje će te u postupku priprema konzultirati te ključne riječi za pretraživanje "on-line" literature. • Ocijenite prikladnost odabrane životinjske vrste i njenih bioloških svojstava ciljevima istraživanja, planirajući mjere zaštite dobrobiti životinja i smanjenje boli i nelagode kad i gdje je to moguće. • Ocijenite reproducibilnost projekta i njegov translacijski potencijal.
2. Usklađenost projekta sa zakonskim odredbama	<ul style="list-style-type: none"> • Ocijenite usklađenost projekta sa zakonima za korištenje životinja u znanstvene svrhe i sa zakonima koji uređuju druga područja kao na primjer transport životinja, zaštita radnika na radnom mjestu i slično. • Proučite europske zakonske odredbe i relevantne smjernice dobrih praksi i s tim u vezi pravovremeno zatražite projektnu autorizaciju te etičku evaluaciju projekta.
3. Etičke stavke, analiza šteta i koristi i definiranje humanih ishoda studije (engl. HEP)	<ul style="list-style-type: none"> • Napišite netehnički sažetak studije. • U komunikaciji sa institucijskim etičkim povjerenstvom provjerite da li je slični istraživački projekt u prošlosti bio predmet etičke procjene. • Sa životinjama postupajte u skladu sa 3R načelima (načela zamjene, smanjenja i poboljšanja) te 3S načelima ("good science, good sense, good sensibilities" - načela dobre znanstvene prakse, zdravog razuma i suosjećanja sa životinjama). • Razmislite o predbilježbi <i>in-vivo</i> istraživanja te objavi negativnih rezultata. • Provedite detaljnu analizu šteta i koristi te obrazložite moguće štete. • Diskutirajte o ishodima učenja ako se životinje koriste u svrhu educiranja novih stručnjaka. • Procijenite težinu (kumulativnu bolnost) <i>in-vivo</i> postupaka u projektu. • Definirajte objektivne, jednostavno mjerljive, humane i nedvosmislene krajnje točke kao i ranije ishode projekta (engl. Humane End Points_ HEP). • Opravdajte smrtni ishod ako je on očekivani ishod projekta.
4. Dizajn pokusa i statističke analize	<ul style="list-style-type: none"> • Provedite pilot studije, izračun ciljane snage studije i stupnja statističke značajnosti. • Definirajte eksperimentalnu jedinicu i broj životinja sudionica pokusa. • Izaberite metodu randomizacije, spriječite pristranost promatrača i jasno definirajte klinički relevantne kriterije uključivanja i isključivanja sudionica pokusa.
B) Komunikacija između znanstvenika (korisnika nastambe) i osoblja nastambe	
5. Ciljevi, trajanje i financiranje studije; raspodjela radnih zaduženja (vođenje projekta)	<ul style="list-style-type: none"> • Organizirajte sastanke sa svim sudionicima istraživačkog projekta na samom početku izrade projekta. • Definirajte okvirno trajanje projekta te potrebne resurse za provedbu priprema, skrbi o životinjama, provedbu <i>in-vivo</i> procedura te procedura zbrinjavanja otpada i provođenja dekontaminacije. • Definirajte i transparentno priopćite svim sudionicima očekivane troškove provedbe projekta. • Razradite detaljni plan raspodjele radnih zaduženja za sve faze projekta.

<p>6. Evaluacija nastambe za laboratorijske životinje</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Procijenite prikladnost raspoložive opreme i standardnih operativnih procedura u nastambi za laboratorijske životinje potrebama i ciljevima projekta te definirajte potrebe za dodatnom opremom i novim procedurama. • Definirajte najrizičnije faze projekta za čiju će uspješnu provedbu trebati osigurati dodatno znanstveno i tehničko osoblje.
<p>7. Edukacija i osposobljavanje osoblja</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Procijenite trenutačni nivo kompetencija osoblja i identificirajte one koje treba dodatno educirati u specifičnom području i osposobiti prije provođenja studije.
<p>8. Zdravstveni rizici, postupci zbrinjavanja otpada i dekontaminacije</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Izvršite procjenu rizika u suradnji sa osobljem nastambe, za sve direktne i indirektne sudionike projekta i laboratorijske životinje. • Utvrdite postojanje relevantnih smjernica dobrih praksi i po potrebi izradite specifične smjernice za svaku fazu projekta. • Definirajte načine dekontaminacije odnosno neškodljivog zbrinjavanja svih kategorija otpada koji se generira u vrijeme provedbe projekta.
<p>C) Kontrola kvalitete svih komponenti <i>in-vivo</i> istraživanja</p>	
<p>9. Testne tvari i procedure</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Osigurajte maksimalnu količinu informacija o testnim tvarima i rizicima prilikom njihovog rukovanja i primjene <i>in-vivo</i>. • Razmislite o izvedivosti i valjanosti pokusnih procedura te potrebnim kompetencijama (na pr. sigurno rukovanje opasnim kemikalijama) projektnog osoblja.
<p>10. Pokusne životinje</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Definirajte osnovne karakteristike životinja koje udovoljavaju ciljevima istraživanja i standarde izvještavanja rezultata <i>in-vivo</i> istraživanja. • Koristite najmanji mogući broj životinja koji neće ugroziti statističku snagu studije.
<p>11. Karantena i zdravstveni nadzor</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Definirajte željeni zdravstveni (mikrobiološki i genetski) status životinja, eventualne potrebe za njihovim prijevozom i provedbom bio-sigurnosnih mjera nakon njihove dostave u nastambu te za vrijeme provedbe pokusa kao i načine zdravstvenog nadzora životinja i potencijalnih zdravstvenih rizika za osoblje.
<p>12. Uvjeti držanja i gospodarenje životinjama</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uzmite u obzir za životinjsku vrstu specifična instinktivna i svrsishodna ponašanja i u suradnji sa stručnim osobljem definirajte optimalne uvjete držanja i dodatke kavezu. • Odredite trajanje aklimatizacije ili karantene, optimalne uvjete skrbi, mikroklimatske uvjete te sve limitirajuće okolnosti određene <i>in-vivo</i> protokolom (npr. trajanje i frekvenciju prisilnog gladovanja životinja, pojedinačni smještaj životinja i slično).
<p>13. Eksperimentalne procedure</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Razradite opcije poboljšanja stresnih procedura označavanja, rukovanja, obuzdavanja, i nakon završetka pokusa, prilikom eventualnog vraćanja životinja na slobodu ili njihovog smještaja kod udomitelja. • Razradite opcije poboljšanja bolnih procedura prilikom primjene testnih tvari, uzorkovanja tkiva, analgezije i anestezije, kirurških zahvata i drugih sličnih praksi.

14. Eutanazija, ponovno korištenje životinja u projektima, vraćanje životinja na slobodu i udomljavanje	<ul style="list-style-type: none">• Konzultirajte relevantne zakonske odredbe i važeće smjernice dobrih praksi na vrijeme, prije provedbe projekta.• Definirajte glavne i zamjenske metode humane eutanazije.• Procijenite kompetencije osoblja zaduženog za eutanaziju životinja iz projekta.
15. Razudba (<i>post mortem procedure</i>)	<ul style="list-style-type: none">• Izradite detaljni protokol sa svim fazama razudbe, osigurajte sljedivost svih preuzetih uzoraka odnosno identifikatore svih životinja, životinjskih uzoraka i podataka proizišlih iz <i>in-vivo</i> istraživanja te definirajte njihove lokacije i prikladne uvjete skladištenja i eventualnog transporta.

Literatura

Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA & Brattelid T. PREPARE: Guidelines for Planning Animal Research and Testing. *Laboratory Animals*, 2017, DOI: 10.1177/0023677217724823.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PloS Biology*, 2010; DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.

Dodatne informacije: <https://norecopa.no/PREPARE> | post@norecopa.no |

