

Znanstvena istraživanja u 21. stoljeću - etički aspekti uporabe laboratorijskih životinja i alternativni modeli

Ivana Kmetić, Monika Roller, Marina Miletić i Teuta Murati*

Sažetak

U toksikološkim istraživanjima uz uporabu klasičnih (*in vivo*) istraživanja, primjenjuju se alternativni test sustavi. Korištenje laboratorijskih životinja, embrija, humanog i animalnog tkiva, kultura stanica i fetalnog seruma u istraživanjima smatra se etički problematičnim te se ograničava zakonima, pravilnicima i praksom. Razmatranjem načina kojima bi se neetičnost mogla izbjegći, došlo je do razvoja "3R" načela (akronim za tri pristupa koja bi se trebala provoditi pri istraživanjima na laboratorijskim životinjama), a to su: smanjenje/racionalizacija uporabe laboratorijskih životinja (engl. *Reduction*), načelo njihove zamjene (engl. *Replacement*) i poboljšanje uvjeta uzgoja, smještaja i skrbi za životinje (engl. *Refinement*). Većina je alternativnih testova toksičnosti još uvijek u postupku validacije. Pojedini *in vitro*

testovi za istraživanja embriotoksičnosti (etički posebno osjetljivo područje) koja su priznala nadležna regulatorna tijela, su EST (engl. *Embryonic Stem cell Test*), WEC (engl. *Whole-Embryo Culture*) i MM (engl. *MicroMass*) test. Standardizacija protokola i uvođenje novih *in vitro* modela predstavlja važan segment napretka u toksikološkim istraživanjima. Znanstvena budućnost tu vidi mogućnost razvoja i implementacije načela etičnosti u istraživanja primjenjujući sustave koji će promišljeno i bez korištenja živih organizama dijelom nadomjestiti metode u biomedicini, veterinarskoj medicini, biotehnologiji i užem smislu - toksikologiji i farmakologiji.

Ključne riječi: etika, znanstvena istraživanja, testovi toksičnosti, laboratorijske životinje, 3R načelo

Uvod

Unazad nekoliko desetaka godina, korištenje laboratorijskih životinja u znanstvenim istraživanjima jedno je od najčešće problematiziranih etičkih

pitanja, kako u znanstvenim krugovima tako i u javnosti. Izraz etika dolazi od grčke riječi ἡθικός (moralan, čudoredan) i koristi se za opis tri pojma: skup načela

Dr. sc. Ivana KMETIĆ, dipl. ing. biotehnol., izvanredna profesorica, Monika ROLLER, studentica, Marina MILETIĆ, mag. nutr., mag. ing. techn. aliment., asistentica, dr. sc. Teuta MURATI*, dipl. ing. biotehnol., docentica (dopisni autor, e-mail: teuta.murati@pbf.unizg.hr), Prehrabeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Zagreb, Hrvatska

moralnog ponašanja, znanost o moralu i disciplina unutar filozofije (Hrvatska enciklopedija, 2021.). U prirodnim je znanostima nužno obratiti pozornost na etičnost istraživanja, odnosno pripaziti da postupci u obavljanju znanstvenih djelatnosti budu u skladu s etičkim načelima istraživanog razdoblja. To se najviše odnosi na istraživanja za čije je provođenje potrebno uključiti druga živa bića ili kada tijek istraživanja na njih ima utjecaj. Druga živa bića mogu biti uključena izravno kao testni subjekti. Uključenje u procese znanstvenih istraživanja može biti i neizravno, npr. kao subjekti pokazatelji zagadenja okoliša uslijed neke ekološke katastrofe, kao i korištenje ljudi i životinja za dobivanje biološkog materijala (tkiva, stanica, seruma) za znanstvena istraživanja. Znanstveno se istraživanje na ljudima provodi nakon dobivanja informiranog pristanka, a tijekom kliničkih istraživanja subjekti se tretiraju određenim dozama lijeka ili cjepiva. Serum, tkiva, stanice i embriji humanog podrijetla dobivaju se i od dragovoljnih darivatelja, odnosno embrija preostalih nakon *in vitro* oplodnje informiranim pristankom oba donora (Sills i sur., 2005., Mehta, 2014., Cheluvappa i sur., 2017.).

Pitanja etičnosti znanstvenih istraživanja na modelima laboratorijskih životinja

Povijesni nas zapisi informiraju o korištenju životinja kao pokusnih modela u vremenu kada su ih Grci poput Aristotela i Erasistrata u 3. i 4. st. pr. Kr. koristili sa svrhom boljeg razumijevanja građe i funkcije organizma (Singh i sur., 2018., Gregurić Gračner i sur., 2019.). Drevni sanskrtski tekstovi (*Sushruta Samhita*) od velike su povijesne važnosti jer uključuju poglavlja koja opisuju neke instrumente i postupke koje još uvijek koristi i slijedi moderna kirurgija. Uporaba životinja

u studijama toksičnosti započela je 1920-ih, kad je J. W. Trevan predložio uporabu LD50 (engl. *lethal dose*) testa za određivanje smrtonosne doze pojedinih kemikalija (Parasuraman, 2011.). Smrt u toksikološkim istraživanjima može biti krajnja točka eksperimenta, primjer je određivanje LD50 vrijednosti ili kad životinja može uginuti nakon ili tijekom eksperimenta kojem smrt nije krajnja točka mjerenja. Kako ne bi došlo do naknadne patnje i osjećaja boli u životinje eutanazija se nekada provodi nakon istraživanja na životnjama koja nemaju smrtni ishod. Osim toga, kada se za istraživanje koristi samo neki organ ili tkivo iz životinje, one bivaju eutanazirane nakon izdvajanja tog tkiva ili organa. U ovim se slučajevima broj uginulih životinja može smanjiti korištenjem humanijih krajnjih točaka (engl. *endpoints*) istraživanja i korištenjem LD50 testova koji koriste manji broj životinja (Stokes, 2011., Doke i Dhawale, 2015.). Do nepotrebne smrti životinja dolazi i eutanazijom životinja koje su dobivene uzgojem laboratorijskih životinja, a završile su kao višak. Smanjenjem takvog viška životinja smanjila bi se i količina ukupno korištenih životinja. Da bi se to postiglo, potrebno je usklađivanje broja uzgojenih životinja s brojem koji je potreban za istraživanja (Doke i Dhawale, 2015.).

Tijekom znanstvenih istraživanja na modelima laboratorijskih životinja može doći do njihova ozljeditvivanja, pojave i razvoja bolesti uz moguće prisuće boli i, u konačnici, patnje. Osnovni argument koji se navodi protiv korištenja laboratorijskih životinja u znanstvenim istraživanjima je činjenica da su životinje živa bića s razvijenim živčanim sustavom koja osjećaju i bol i patnju. Bol se može selektivno ukloniti farmakološki lokalnom ili sistemskom anestezijom. Bol u životinja odmah ima za efekt nagli rast otkucaja srca, a reakcije nestaju pod dubokom anestezijom, ali

se ona prilikom buđenja vraća prije ostalih osjećaja. Ustanovljeno je da je refleks boli u srcu (ubrzanje pulsa 9-14 %) bolji pokazatelj prisutnosti svjesnog stanja nego bilo koja somatska motorička reakcija (Croft, 1952.). Drugi je pokazatelj samovoljno ponašanje životinje i reakcije te endokrini odgovor. Osjet boli se u životinja prenosi nocireceptorima, odnosno osjetilnim neuronima za prijenos signala boli. Teško ga je mjeriti i kategorizirati jer je osjet subjektivan pa se pokušava pratiti promatranjem promjena same životinje. U laboratorijskih životinja bol se procjenjuje praćenjem refleksa, izraza lica, urođenih obrazaca ponašanja i dr. Razvijaju se nove tehnike procjene boli životinja na modelima manjih životinja, poput zebastih ribica i vinskih mušica, a koje bi mogле biti primjenjive i na sisavcima. Ponašanje (kretnje) životinja prate se računalno te se iz velike količine podataka dobivenih praćenjem nekoliko stotina životinja analiziraju i rekonstruiraju kretnje životinja. Takvi bi se modeli mogli primijeniti i na veće životinje, na primjer miševa (Graham i Hampshire, 2016.). Znanja o ponašanju životinja pripadajućoj vrsti moraju se inkorporirati u procjenu iz razloga što se tako može suziti spektar okolnosti u kojima se smatra da životinja pati (Apfelbeck i Raess, 2008., Begni i sur., 2021.).

„3R“ načelo u zaštiti dobrobiti laboratorijskih životinja

Razmatranjem načina kojima bi se neetičnost mogla izbjegći te postići etički prihvatljiviji odnos prema laboratorijskim životnjama, došlo je do razvoja načela koja bi mogla biti vodilja pri pokušaju smanjenja patnje i brojnosti korištenih laboratorijskih životinja. Jedno od prvih općeprihvaćenih načela, koje se do danas široko primjenjuje, je „3R“ načelo. Razvijeno je iz Koncepta zamjene kojeg su predložili Charles Hume i

William Russell 1957. godine, a predlaže zamjenu korištenja životinja metodama istraživanja koje ne koriste životinje. Koncept zamjene proširili su 1959. godine u svojoj vrijednoj knjizi *The Principles of Humane Experimental Technique* W. M. S. Russell i R. L. Burch, kako bi istraživanja bila još humanija (Doke i Dhawale, 2015.). Proširenjem i implementacijom toga načela, koje je kasnije nazvano „3R“, uz zamjenu *in vivo* testova na životnjama alternativnim testovima gdje god za to postoji mogućnost, nastoji se postići i smanjenje broja životinja potrebnih za istraživanje te minimalizirati uzinemirenost, bol i patnju životinji tijekom izvođenja istraživanja (Zurlo i sur., 1996., Murati i sur., 2013., Stephens i Mak, 2013., Kmetić i sur., 2017.).

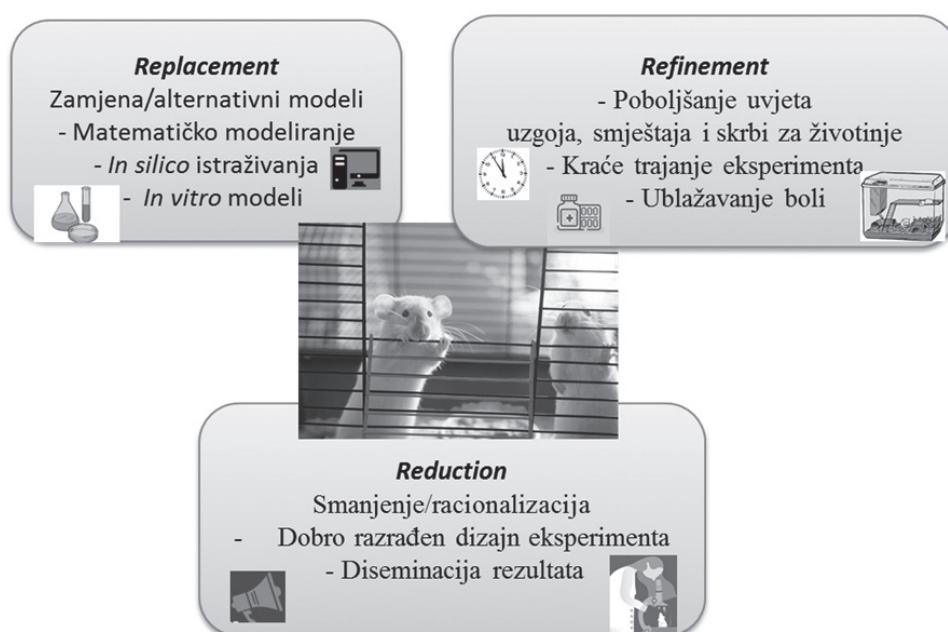
„3R“ (Slika 1) je akronim za tri strategije koje bi se trebale provoditi po ovom načelu pri istraživanjima na laboratorijskim životnjama, a to su: smanjenje/racionalizacija uporaba broja laboratorijskih životinja (engl. *Reduction*) što se može postići temeljitim pregledom literature da bi se izbjeglo nepotrebno duplicitiranje studija, poboljšanim eksperimentalnim dizajnom i statističkom analizom; poboljšanje uvjeta uzgoja, smještaja i skrbi za životinje uz ublažavanje potencijalne boli, patnje ili stresa (engl. *Refinement*) te načelo zamjene životinja alternativnim modelima (engl. *Replacement*) kad god je to moguće (Murati i sur., 2013., Krishna i sur., 2014., Dellambra i sur., 2019., Gregurić Gračner i sur., 2019.). Alternativni modeli uključuju razne fizikalno-kemijske tehnike; *in vitro* sustave, QSAR (engl. *Quantitative Structure Activity Relationships*) - računalno modeliranje na temelju strukturno sličnih spojeva; *omics* tehnologije - tehnologije koje proučavaju karakteristike staničnih molekula, poput gena, proteina ili malih metabolita; metaboličko i kinetičko modeliranje; *microarray* tehnologiju (Kniewald i sur., 2005., Murati i sur., 2013.). *In vitro*

istraživanja podrazumijevaju uporabu dijelova tkiva, izoliranih organa, primarnih staničnih linija, staničnih kultura pa čak i unutarstaničnih frakcija poput mitohondrija, mikrosoma, membrana i dr. (Kmetić i sur., 2017., Singh i sur., 2018.). Budući da se danas često koriste kao predtestovi *in vivo* testovima, njihovom uporabom znatno se doprinjelo smanjenju troškova i vremena potrebnog za istraživanja, kao i razumijevanju molekularnih mehanizama toksičnosti. Ipak, postoje i nedostatci njihove uporabe poput nemogućnosti proučavanja metabolizma na takvim modelima kao i posljedica dugotrajne izloženosti nekoj tvari, problem ekstrapolacije doze (*in vivo vs. in vitro*) i dr. (Ghallab, 2013.).

Odbor za kontrolu i nadzor pokusa na životinjama (engl. *The Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals*, CPCSEA) iz Indije akronimu „3R“ dodao je još jedan

R (engl. *Rehabilitation*) koji se odnosi na na njegu i / ili rehabilitaciju životinja nakon istraživanja. Svi istraživači bi trebali nakon provedenih istraživanja koji koriste laboratorijske životinje imati moralnu odgovornost prema njima te predvidjeti i troškove rehabilitacije i naknadne njegu takvih životinja (Mandal i Parija, 2013., Singh i sur., 2018.). Profesorica C. Newton 1970-ih godina predložila je načelo „3S“ (engl. *Good Science, Good Sense and Good Sensibilities*) koje upotpunjuje „3R“ načelo (Smith i Hawkins, 2016.), s namjerom da se unaprijedi znanost, ali i koordinira dobrobit životinja.

U Tabeli 1 navedeni su neki od najznačajnijih organizacija i centara, znanstvenih časopisa, web-stranica i baza podataka koji promiču „3R“ načela i / ili korištenje alternativnih pristupa u ispitivanju toksičnosti i time doprinose provedbi i pridržavanju načela etičnosti u znanstvenim istraživanjima.



Slika 1. „3R“ (engl. *Reduction Replacement Refinement*) načelo

Tabela 1. Organizacije, znanstveni časopisi, web-stranice i baze podataka koji promiču „3R“ načela i/ili korištenje alternativnih pristupa u ispitivanju toksičnosti

Naziv	Poveznica
ORGANIZACIJE	
CAAT (<i>Center for Alternative to Animal Testing</i>) i CAAT-Europe	https://caat.jhsph.edu/ https://www.biologie.uni-konstanz.de/leist/caat-europe/
ECOPA (<i>European consensus-platform for alternatives</i>)	https://www.ecopa.eu/
EPAA (<i>European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing</i>)	https://ec.europa.eu/growth/sectors/chemicals/epaa_en
EURL ECVAM (<i>European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing</i>)	https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam
EUTOXRISK (<i>An Integrated European ‘Flagship’ Programme Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st century</i>)	http://www.eu-toxrisk.eu/
ESTIV (<i>European Society of Toxicology in Vitro</i>)	https://www.estiv.org/
FRAME (<i>Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments</i>)	https://frame.org.uk/
ICVAM (<i>The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>)	https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/iccvam/index.html
IIVS (<i>Institute for In Vitro Sciences</i>)	https://iivs.org/
NC3Rs (<i>National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research</i>)	https://www.nc3rs.org.uk/
OECD (<i>The Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)	https://www.oecd.org/
Transatlantic Think Tank for Toxicology (T ⁴)	https://caat.jhsph.edu/about/t4.html
ZNANSTVENI ČASOPISI	
ALTEX (<i>Alternatives to Animal Experimentation</i>)	https://www.altex.org/index.php/altex
ATLA (<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>)	https://journals.sagepub.com/home/atla
Journal of Applied Animal Welfare Science	https://www.tandfonline.com/toc/haaw20/current
Toxicology in vitro	https://www.sciencedirect.com/journal/toxicology-in-vitro
web-stranice i baze podataka	
AltTox.org	http://alttox.org/
DB-ALM (<i>EURL ECVAM Database on Alternative Methods to Animal Experimentation</i>)	https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/database-alternative-methods-animal-experimentation
RE-Place database	https://www.re-place.be/

Norecopa, norveška nacionalna platforma za unapređenje „3R“ načela, izdala je opsežne smjernice za planiranje studija na životinjama, tzv. PREPARE (*Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence*). *The PREPARE Guidelines Checklist* (Slika 2) razvijen je kako bi znanstvenicima pomogao da budu svjesniji svih problema koji mogu utjecati na njihova istraživanja te sadrži popis koji služi kao podsjetnik na stavke koje treba razmotriti prije i tijekom istraživanja koja uključuju životinje (Smith, 2020.). Kako bi se poboljšalo izvješće o istraživanjima na životinjama, objavljene su tzv. ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) smjernice 2010. godine (novija verzija 2019. godine). Smjernice se sastoje od kontrolnog popisa (*checklist*) podataka koji trebaju

biti uključeni u bilo koju publikaciju koja izvještava o istraživanjima koja uključuju uporabu životinja, kako bi se osigurao sveobuhvatan i transparentan opis te drugim znanstvenicima omogućilo da ih prouče, procijene metodološku slijedivost te reproducibilnost metoda i rezultata (Lee i sur., 2020., Percie du Sert i sur., 2020., Smith, 2020.).

United States National Academy of Sciences (NAS) je 2007. godine objavilo izvješće pod nazivom „*Toxicity testing in the 21st century: a Vision and a Strategy*“ kojim se predlaže novi pristup u istraživanjima koje koriste životinje (Leist i sur., 2008., Wilcox i Goldberg, 2011., Stephens i Mak, 2013.). Tradicionalno su temelj za ispitivanje toksičnosti tvari činila ispitivanja na laboratorijskim životinjama, dok bi se prema novoj viziji kao primarni alati koristili *in vitro*

PREPARE	
The PREPARE Guidelines Checklist	
Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence	
<small>Adrian J. Smith Jr., Eddie Clutton, Eliot Litsey, Kristine E. As, Hansen & Trond Brattstrøm <i>*Correspondence to: Norwegian Veterinary Institute, P.O. Box 250, Sognsvann, NO-0106 Oslo, Norway; †Reiji Clark School of Veterinary Studies, Foster Bush Midstream, FHSU 7850 U.S.A.; ‡Research Animal Department, Science Group, RSPCA Wetherby HQ, Wetherby, North Yorkshire, LS23 9RS, U.K.; §Section of Experimental Biomedicine, Department of Production Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, PO Box 81 1330 Ås, Norway; ¶Division for Research Management and External Funding, Western Norway University of Applied Sciences, 5020 Bergen, Norway</i></small>	
Topic	Recommendation
(B) Dialogue between scientists and the animal facility	
5. Objectives and terminology, funding and division of labour	<input type="checkbox"/> Organize meetings with all relevant staff when early plans for the project exist. <input type="checkbox"/> Conduct an approximate timescale for the project, indicating the need for assistance with preparation, animal care, procedures and waste disposal/decontamination. <input type="checkbox"/> Discuss and discuss all expected and potential costs. <input type="checkbox"/> Construct a detailed plan for division of labour and expenses at all stages of the study.
6. Facility evaluation	<input type="checkbox"/> Conduct a physical inspection of the facilities, to evaluate building and equipment standards and needs. <input type="checkbox"/> Discuss staffing levels at times of extra risk.
7. Education and training	<input type="checkbox"/> Assess the current competence of staff members and the need for further education or training prior to the study.
8. Health risks, waste disposal and decontamination	<input type="checkbox"/> Perform a risk assessment, in collaboration with the animal facility, for all persons and animals affected directly or indirectly by the study. <input type="checkbox"/> Assess, and if necessary produce, specific guidance for all stages of the project. <input type="checkbox"/> Discuss means for containment, decontamination, and disposal of all items in the study.
(C) Quality control of the components in the study	
9. Test substances and procedures	<input type="checkbox"/> Provide as much information as possible about test substances. <input type="checkbox"/> Consider the feasibility and validity of test procedures and the skills needed to perform them.
10. Experimental animals	<input type="checkbox"/> Decide upon the characteristics of the animals that are essential for the study and for reporting. <input type="checkbox"/> Avoid generation of surplus animals.
11. Quarantine and health monitoring	<input type="checkbox"/> Discuss the animal's likely health status, any needs for transport, quarantine and isolation, health monitoring and consequences for the personnel.
12. Housing and husbandry	<input type="checkbox"/> Attend to the animal's specific individual needs, in collaboration with expert staff. <input type="checkbox"/> Discuss accommodation, optimal housing conditions and procedures, environmental factors and any experimental limitations on these (e.g. food deprivation, solitary housing).
13. Experimental procedures	<input type="checkbox"/> Develop refined procedures for capture, immobilisation, marking and release or rehoming. <input type="checkbox"/> Develop refined procedures for substance administration, sampling, sedation and anaesthesia, surgery and other techniques.
14. Humane killing, release, reuse or rehoming	<input type="checkbox"/> Consult relevant legislation and guidelines well in advance of the study. <input type="checkbox"/> Define primary and emergency methods for humane killing. <input type="checkbox"/> Assess the competence of those who may have to perform these tasks.
15. Necropsy	<input type="checkbox"/> Construct a systematic plan for all stages of necropsy, including location, and identification of all animals and tissues.
References	
1. Smith AJ, Clutton RE, Litsey E, Hansen KEA & Brattstrøm T. PREPARE Guidelines for Planning Animal Research and Testing Laboratory Animals, 2017. DOI: 10.1177/0028677217724823.	
2. Wilcock C, Brown RE, Clutton RE, et al. Improving Biassure Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. <i>PLoS Biology</i> , 2010. DOI: 10.1371/journal.pbio.100012.	
Further information https://norecopa.no/PREPARE/ / post@norecopa.no / https://www.facebook.com/norecopa	

Slika 2. PREPARE Guidelines Checklist - smjernice za planiranje studija na životinjama (dostupno na https://norecopa.no/media/7893/prepare_checklist_english.pdf)

i *in silico* pristupi (3D *in vitro* stanične kulture, matične stanice, tzv. *high-throughput screening* (HTS), biomarkeri, bioinformatika, farmakokinetičko modeliranje i simulacija - PBMK (engl. *physiological based pharmacokinetic modeling and simulation*) i dr.) (Leist i sur., 2008., Andersen i Krewski, 2009., Murati i sur., 2013.). Ipak, proučavanje metabolizma i biokinetike uporabom takvih metoda nije u potpunosti moguće. Stoga bi znanstvenici na temelju detaljnijeg znanja o slijedu događaja na staničnoj i molekularnoj razini provodili naknadna ciljna istraživanja na laboratorijskim životinjama te takvim pristupom smanjili vrijeme, cijenu i broj potrebnih životinja (Murati i sur., 2013.). Nužna je daljnja optimizacija alternativnih metoda da bi rezultati dobiveni njihovom provedbom bili što bolji prediktori *in vivo* učinaka, zbog čega znanstvena zajednica i industrija ulažu veliki napor, resurse i materijalna sredstva.

Korištenje ljudi i ljudskog materijala u znanstvenim istraživanjima

Da bi se broj potencijalno neetičnih istraživanja na ljudima smanjio, odnosno kako bi se takva istraživanja u potpunosti onemogućila, uvedena su načela medicinske etike, kao što je, između ostalih i Nirnberški kodeks. Prema tom Kodeksu istraživanje na ljudima moguće je isključivo na temelju informiranog pristanka osobe i kada su oni pravilno informirani o postupku (Štojs, 2014., Ackerknecht i Haushofer, 2016.). U današnje se vrijeme u razvijenim zemljama ne provode istraživanja na ljudima koja nisu temeljena na informiranom pristanku osobe. U kliničkim je istraživanjima potrebno procijeniti učinkovitost i moguću škodljivost novih lijekova i cjepiva na ljudima. U fazi I kliničkih

pokusava koriste se male, subterapijske doze lijeka kako bi se istražila farmakokinetika, bioraspoloživost i poluživot lijekova te njihova sigurnost na manjem broju (20 do 80) zdravih dragovoljaca. U fazama II, III i IV se istražuju terapijske doze lijeka na većem broju (iznad 100) zdravih ili pacijenata s određenim bolestima, da bi se istražila učinkovitost, djelotvornost i sigurnost lijekova te nadzor nakon stavljanja u uporabu (EFPIA, 2020.).

Od ljudskog biološkog materijala, u znanstvenim istraživanjima i ispitivanjima toksičnosti, koriste se stanice i tkiva ljudskog podrijetla te ljudske matične stanice (Eskes i sur., 2017.). Stanice i tkiva za potrebe *in vitro* istraživanja moraju se svježe izolirati iz ljudi ili životinja ukoliko se radi o primarnoj kulturi ili propagirati iz komercijalno dostupnih staničnih linija. Kod toga je potrebno paziti na fenotipske i genotipske karakteristike stanica. Ukoliko se koriste kontinuirane stanične linije, preporuča se dobivanje stanica iz provjerjenih izvora, kao što su DSMZ (njem. *Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) ili ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) banke stanica (Hartung i sur., 2002.). Prije uspostavljanja staničnih linija iz bilo kojih stanica ljudskog podrijetla, potrebno je dobiti odobrenje nadležnog etičkog povjerenstva. Sva odobrenja i dozvole etičkih povjerenstava o uporabi ljudskih tkiva i stanica potrebno je trajno čuvati. Zbog osiguranja sljedivosti i kontrole potrebno je voditi svu evidenciju glede nabave, opskrbe i korištenja biološkog materijala ljudskog podrijetla. Humane stanice dobavljaju se iz banaka tkiva ili bolnica te je takvo dobivanje stanica neprofitno (Bal-Price i Coecke, 2011.). Embrionalne matične stanice su etički problematične jer ih je potrebno dobiti iz unutarnje stanične mase blastociste, prije implantacije embrija. Blastociste

za dobivanje embrionalnih matičnih stanica se dobivaju od neimplantiranih embrija namijenjenih umjetnoj oplodnji, kao i embrija za ostala medicinska i genetička istraživanja. Matične se stanice mogu dobiti iz tkiva odraslih ljudi, kao i iz krvi pupčane vrpce, što se smatra etički prihvatljivijim jer ne uključuje uništavanje embrija. U oba slučaja etička opravданost dobivanja tih stanica ne razlikuje se od one za dobivanje bilo kojeg drugog tkiva ljudskog podrijetla (Bal-Price i Coecke, 2011.).

Korištenje životinjskih i ljudskih embrija za znanstvena istraživanja

Za sve lijekove i kemikalije, ali i tvari kojima smo izloženi iz okoliša potrebno je procijeniti kemijski induciranu razvojnu i reproduktivnu toksičnost. Metode kojima se procjenjuje takva toksičnost često zahtijevaju veliki broj laboratorijskih životinja kao što su štakori i zečevi, su dugotrajne i skupe. *In vitro* metode koje koriste stanične kulture mogu zamijeniti trenutne modele. Za procjenu štetnog učinka tvari na embrij (embriotoksičnost) mogu se koristiti embrionalne matične stanice (npr. miša). Neki *in vitro* testovi koje su priznala nadležna regulatorna tijela su EST (engl. *Embryonic Stem cell Test*), WEC (engl. *Whole-Embryo Culture*) i MM (engl. *MicroMass*) test (Lilienblum i sur., 2008.). EST je *in vitro* test koji koristi embrionalne matične stanice miša te se koristi za procjenu embriotoksičnosti neke tvari. EST test se zasniva na činjenici da spoj koji ima potencijalni embriotoksičan učinak blokira spontani razvoj embrionalne matične stanice u srčani mišić s otkucajima, tijekom prvih 10 dana embrionalnog razvoja. Koristi se kao test probira u razvoju novih farmaceutika, za identifikaciju rizika te kao alat pri donošenju internih odluka u proizvodnji farmaceutika i biocida (Marx-Stoelting i sur., 2009.). WEC test

koristi cijeli embrij štakora, tako da predstavlja složeniji sustav u odnosu na EST test. Na uzgojenim embrijima se, 48 sati nakon implantacije, proučava pojava malformacija ili kašnjenje u razvoju određenih organskih sustava. MM test se zasniva na događajima tijekom diferencijacije stanica udova u hondrocite koje proizvode hrskavicu (Lilienblum i sur., 2008., Seiler i Spielmann, 2011.). Nedostatak ovih testova je što ovise o detekciji krajnjih točaka, čije poznavanje zahtijeva opsežno iskustvo u istraživanjima što može dovesti do pogrešnih prosudbi, a teži se i smanjenju broja korištenih embrija (Seiler i Spielmann, 2011., Doke i Dhawale, 2015.).

Da bi se mogle razviti stanične linije embrionalnih matičnih stanica, često se uništava embrij. Može se uspostaviti kulturu embrionalnih matičnih stanica bez da se uništi embrij tako da se uspostavi iz pojedinačne blastomere koja se biopsijom izdvaja iz embrija. Ovom je tehnikom moguće izdvojiti samo jednu blastomeru (ili nekada dvije) iz embrija u stadiju od 8 stanica. Nakon izdvajanja iz embrija uzgajaju se zajedno s parentalnim embrijem u istoj epruveti 12 do 24 sata, nakon čega se embrij izdvaja i nastavlja rast u mediju sljedećih 48 sati. Većina embrija nastavlja rast do faze blastociste. Ljudske matične stanice se uzgajaju na sloju embrionalnih fibroblasta miša (MEF, engl. *Mouse Embryonic Fibroblasts*) i zahtijevaju prisutnost fibroblastnog faktora rasta (bFGF ili FGF-2, engl. *Fibroblast Growth Factor*). Medij se suplementira lamininom i fibronektinom (Chung i sur., 2006., Chung i sur., 2008.). Kada se embrionalne matične stanice kultiviraju bez antidiferencijacijskih faktora, one spontano diferenciraju i formiraju trodimenzionalne višestanične agregate koji se nazivaju embrioidna tjelesa (EB, engl. *Embryoid Bodies*). Kao zamjena za embrionalne matične stanice, mogu

se koristiti pluripotentne stanice. Korištenje pluripotentnih stanica je etički opravданije od korištenja embrionalnih matičnih stanica zato što se mogu dobiti iz tkiva odrasle osobe, odnosno dragovoljnog donora. Pluripotentne stanice mogu diferencirati u različite tipove stanica te se mogu koristiti, između ostalog, i u toksikološkim istraživanjima (Thélu i sur., 2020.).

Zaključak

Alternativni testovi toksičnosti koji ne uključuju uporabu laboratorijskih životinja predstavljaju važan alat u predviđanju učinaka različitih tvari na ljudsko zdravlje. Ipak, iako je takvim testovima često omogućen uvid u specifične učinke tvari na staničnoj pa čak i molekularnoj razini, još uvijek nailazimo na njihova ograničenja i nedostatke. Zbog toga je za procjenu toksičnosti određene tvari, važno kombinirati nekoliko *in vitro* i *in silico* test sustava koji za ishod imaju različite krajnje točke mjerjenja (*endpoints*), kako bi takvi testovi bili dobar predtest testovima koji se provode na laboratorijskim životinjama i na taj način doveli u još većoj mjeri, uz učinkovitu provedbu i pridržavanje „3R“ i „3S“ načela, do implementacije načela etičnosti u istraživanjima.

Zahvala

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Bolničke zaštitne tekstilije“ (UIP-2017-05-8780) Hrvatske zaklade za znanost i potpore Sveučilišta u Zagrebu „Selekcija biološki aktivnih tvari s protektivnim učincima na toksičnost induciranoj perzistentnim organoklorinim spojevima“ (000070002425).

Literatura

- ACKERKNECHT, E. H. and L. HAUSHOFER (2016): A short history of medicine, 9th ed., Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- APFELBECK, B. and M. RAESS (2008): Behavioural and hormonal effects of social isolation and neophobia in a gregarious bird species, the European starling (*Sturnus vulgaris*). Horm. Behav. 54, 435-441. 10.1016/j.yhbeh.2008.04.003
- ANDERSEN, M. E. and D. KREWSKI (2009): Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. Toxicol. Sci. 107, 324-330. 10.1093/toxsci/kfn255
- BAL-PRICE, A. and S. COECKE (2011): Guidance on Good Cell Culture Practice (G CCP). In: Aschner, M., Suñol, C. Bal-Price, A.: Cell Culture Techniques. Totowa, NJ: Humana Press (1-25).
- BEGNI, V., A. SANSON, N. PFEIFFER, C. BRANDWEIN, D. INTA, S. R. TALBOT, M. A. RIVA, P. GASS and A. S. MALLIEN (2021): Correction: Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. Plos One 16, e0248070. 10.1371/journal.pone.0248070
- CHELUVAPPA, R., P. SCOWEN and R. ERI (2017): Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching, and alternatives to animal experimentation. Pharmacol. Res. Perspect 5, e00332. 10.1002/prp2.332
- CHUNG, Y., I. KLIMANSKAYA, S. BECKER, J. MARCH, S.-J. LU, J. JOHNSON, L. MEISNER and R. LANZA (2006): Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. Nature 439, 216-219. 10.1038/nature04277
- CHUNG, Y., I. KLIMANSKAYA, S. BECKER, T. LI, M. MASERATI, S.-J. LU, T. ZDRAVKOVIC, D. ILIC, O. GENBACEV, S. FISHER, A. KRTOLICA and R. LANZA (2008): Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. Cell Stem Cell 2, 113-117. 10.1016/j.stem.2007.12.013
- CROFT, P. G. (1952): The assessment of pain perception. J. Ment. Sci. 98, 427-432. 10.1192/bj.98.412.427
- DELLAMBRA, E., T. ODORISIO, D. D'ARCANGELO, C. M. FAILLA and A. FACCHIANO (2019): Non-animal models in dermatological research. ALTEX-altern. Anim. Ex. 36, 177-202. 10.14573/altex.1808022
- DOKE, S. K. and S. C. DHAWALE (2015): Alternatives to animal testing: a review. Saudi Pharm. J. 23, 223-229. 10.1016/j.jsps.2013.11.002
- EFPIA (2020): Clinical Trials. EFPIA - European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. Available on: <http://www.efpia.eu/about-medicines/development-of-medicines/regulations-safety-supply/clinical-trials> [02.12.2020.]
- GHALLAB, A. (2013): In vitro test systems and their limitations. EXCLI J. 12, 1024-1026.
- Hrvatska enciklopedija (2021): Etika. Available on: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18496> [25.06.2021.]
- ESKES, C., A.-C. BOSTRÖM, G. BOWE, S. COECKE, T. HARTUNG, G. HENDRIKS, D. PAMIES, A. PITON and C. ROVIDA (2017): Good cell culture practices & *in vitro* toxicology. Toxicol. In Vitro 45, 272-277. 10.1016/j.tiv.2017.04.022

16. GRAHAM, D. and V. HAMPSHIRE (2016): Methods for measuring pain in laboratory animals. *Lab. Anim.* 45, 99-101. 10.1038/lab.an.962
17. GREGURIĆ GRAČNER, G., N. LONČARIĆ, J. BUBIĆ ŠPOLJAR, A. DOVČ, K. FUŠ, D. GRAČNER and Ž. PAVIČIĆ (2019): 3R Principle for the welfare protection of animals used for scientific purposes - yesterday, today, tomorrow. *Vet. strn.* 50, 63-73. (In Croatian).
18. HARTUNG, T., M. BALLS, C. BARDOUILLE, O. BLANCK, S. COECKE, G. GSTRAUNTHALER and D. LEWIS (2002): ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. ALTEX-Altern. Lab. Anim. 30, 407-414. 10.1177/026119290203000404
19. KMETIĆ, I., T. MURATI and M. MILETIĆ (2017): Primjena kultura stanica u toksikološkim ispitivanjima. In: Kregar Velikonja, N. (ed.), Holistic Approach to the Patient (pp. 220-228). Novo mesto: Fakulteta za zdravstvene vede.
20. KNIEWALD, J., I. KMETIĆ, V. GAURINA-SRČEK and Z. KNIEWALD (2005): Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 56, 195-204.
21. KRISHNA, G., S. GOEL and K. A. KRISHNA (2014): Alternative animal toxicity testing and biomarkers. In: Biomarkers in Toxicology (Gupta, R. C., ed.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 129-147.
22. LEE, K. H., W. D. LEE and B. C. KANG (2020): The 'R'principles in laboratory animal experiments. *Lab. Anim. Res.* 36, 45. 10.1186/s42826-020-00078-6
23. LEIST, M., T. HARTUNG and P. NICOTERA (2008): The dawning of a new age of toxicology. *ALTEX* 25, 103-114. 10.14573/altex.2008.2.103
24. LILIENBLUM, W., W. DEKANT, H. FOTH, T. GEBEL, J. G. HENGSTLER, R. KAHL, P.-J. KRAMER, H. SCHWEINFURTH and K.-M. WOLLIN (2008): Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch. Toxicol.* 82, 211-236. 10.1007/s00204-008-0279-9
25. MANDAL, J. and S. C. PARIJA (2013): Ethics of involving animals in research. *Trop. Parasitol.* 3, 4-6. 10.4103/2229-5070.113884
26. MARX-STOELTING, P., E. ADRIAENS, H.-J. AHR, S. BREMER, B. GARTHOFF, H.-P. GELBKE, A. PIERSMA, C. PELLIZZER, U. REUTER, V. ROGIERS, B. SCHENK et al. (2009): A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST): the report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Altern. Lab. Anim.* 37, 313-328. 10.1177/026119290903700314
27. MEHTA, R. H. (2014): Sourcing human embryos for embryonic stem cell lines: Problems & perspectives. *Indian J. Med. Res.* 140, S106-111.
28. MURATI, T., I. KMETIĆ, J. KNIEWALD and B. ŠIMIĆ (2013): Endocrine disruptors and animal-free toxicology. In: Kniewald, Z. (ed.), Annual 2013 of the Croatian Academy of Engineering (pp. 103-116). Zagreb: Hrvatska akademija tehničkih znanosti.
29. PARASURAMAN, S. (2011): Toxicological screening. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2, 74-79. 10.4103/0976-500X.81895
30. PERCIE DU SERT, N., V. HURST, A. AHLUWALIA, S. ALAM, M. T. AVEY, M. T. M. BAKER et al. (2020): The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, e3000410. 10.1371/journal.pbio.3000410
31. SEILER, A. E. M. and H. SPIELMANN (2011): The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro*. *Nat. Protoc.* 6, 961-978. 10.1038/nprot.2011.348
32. SINGH, S., V. K. KHANNA and A. B. PANT (2018): Development of *in vitro* toxicology - a historic story. In: *In vitro Toxicology* (Dhawan, A., Kwon, S., eds.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 1-19.
33. SILLS, E., T. TAKEUCHI, N. TANAKA, Q. V. NERI and G. D. PALERMO (2005): Identification and isolation of embryonic stem cells in reproductive endocrinology: theoretical protocols for conservation of human embryos derived from *in vitro* fertilization. *Theor. Biol. Med. Model.* 2, 25. 10.1186/1742-4682-2-25
34. SMITH, A. J. (2020): Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals. *Lab. Anim. Res.* 36, 21. 10.1186/s42826-020-00054-0
35. SMITH, A. J. and P. HAWKINS (2016): Good Science, Good Sense and Good Sensibilities: The Three Ss of Carol Newton. *Animals* 6, 70. 10.3390/ani6110070
36. STEPHENS, M. L. and N. S. MAK (2013): History of the 3Rs in toxicity testing: from Russell and Burch to 21st century toxicology. Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing, 19, 1.
37. STOKES, W. S. (2011): Best practices for the use of animals in toxicological research and testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1245, 17-20. 10.1111/j.1749-6632.2011.06334.x
38. ŠTOJS, T. (2014): Istraživanja na ljudskim subjektima - povijesni razvoj, načela i primjeri neetičnih postupanja. Nova prisutnost: časopis za intelektualna i duhovna pitanja 12, 91-111.
39. THÉLU, A., S. CATOIRE and S. KERDINE-RÖMER (2020): Immune-competent *in vitro* co-culture models as an approach for skin sensitisation assessment. *Toxicol. In Vitro* 62, 104691. 10.1016/j.tiv.2019.104691
40. WILCOX, N. and A. GOLDBERG (2011): Food for thought ... on validation. A puzzle or a mystery: an approach founded on new science. *ALTEX*, 28, 3-8. 10.14573/altex.2011.1.003
41. ZURLA, J., D. RUDICILLE and A. M. GOLDBERG (1996): The three R's: The way forward. *Environ. Health Persp.* 104, 878-880. 10.1289/ehp.96104878

Scientific research in the 21st century: ethical aspects for the use of laboratory animals and alternative models

Ivana KMETIĆ, BSc, Associate Professor, Monika ROLLER, student, Marina MILETIĆ, MSc, Assistant, dr. sc. Teuta MURATI, BSc, Assistant Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Beside the application of classical (*in vivo*) tests in toxicological studies, the alternative test systems are widely used. The use of experimental animals, embryos, human and animal tissues, cell cultures, and foetal serum is considered ethically questionable and is limited by laws, regulations, and practices. Considering how inhumanity could be avoided, the "3R" principle was developed. It is an acronym for the three approaches that should be carried out according to this principle in research on experimental animals, namely: reduction/rationalization in the number of experimental animals (*Reduction*), models for their replacement (*Replacement*) and improvement of conditions for breeding, accommodation and care for animals (*Refinement*). Most of the alternative

toxicity tests are still in the process of validation. Some of the *in vitro* embryotoxicity tests (ethically particularly sensitive area), recognized by regulatory authorities are EST (*Embryonic Stem cell Test*), WEC (*Whole-Embryo Culture*) and MM (*MicroMass*) test. Protocol standardization and introduction of new *in vitro* tests represent an important section in toxicological research progress. This is where the science sees the possibility of incorporating ethics into future research by applying systems that will clever and without the use of living organisms partly replace the methods in biomedicine, veterinary medicine, biotechnology, toxicology and pharmacology.

Key words: ethics; scientific research; toxicity tests; laboratory animals; 3R principle