

PROFESSIONAL PAPER

ULOGA I PRIMJENA 3R PRINCIPA U DOBROBITI ŽIVOTINJA TOKOM EKSPERIMENTALNIH ISTRAŽIVANJA

Nadža Kapo-Dolan^{1*}, Aida Kustura²

¹Katedra za kliničke nauke veterinarske medicine, Univerzitet u Sarajevu - Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

²Katedra za animalnu proizvodnju i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu - Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

***Autor odgovoran za korespondenciju:**

Nadža Kapo-Dolan, DVM

Adresa: Veterinarski fakultet, Zmaja od Bosne 90, 71000 Sarajevo/Bosna i Hercegovina

ORCID: 0000-0002-9922-8034

Telefon: +38762151699

E-mail: nadzakapo@gmail.com

SAŽETAK

Korištenje životinja u eksperimentima datira od najranijih historijskih razdoblja, a otkriće anestetika omogućilo je ublažavanje njihove patnje. Pojam dobrobit životinja podrazumijeva osiguravanje odgovarajućih uvjeta za smještaj, njegu, ishranu, zdravlje i ponašanje životinja, uz sprečavanje nanošenja nepotrebne boli, patnje i straha te zaštitu od bolesti i povreda. Cilj rada je predstaviti značaj primjene 3R principa, kao i njihove benefite koji doprinose dobrobiti životinja tokom eksperimentalnih studija. Bioetičari, Russell i Burch su sredinom 20. vijeka razvili 3R princip (zamjena, redukcija, poboljšanje), koji je postao temelj etički prihvatljivih istraživanja. S vremenom je nastao prošireni skup principa poznat kao 11R ili 12R, koji uključuju dodatne faktore koji predstavljaju sveobuhvatan pristup istraživanjima, usmjerenim na osiguravanje reproduktivnosti rezultata, relevantnosti istraživanja i prenosivosti podataka, uz poštivanje etičkih standarda. Neosporno je da je korištenje eksperimentalnih životinja danas, nažalost, još uvijek neizbježno, stoga primjena svih dostupnih mehanizama u cilju zaštite njihove dobrobiti pruža, između ostalog, i mogućnost razvoja pozitivnog dijaloga u smjeru šireg društvenog prihvaćanja još uvijek nužne primjene eksperimentalnih životinja, posebno u biomedicinskim istraživanjima.

Ključne riječi: 3R principi, dobrobit, eksperimentalne životinje

UVOD

Posmatrano kroz historijski kontekst, istraživanja na životinjama kao eksperimentalnim modelima potječu još iz vremena Aristotela (384.-322. g. p.n.e.), Erasistratusa (304.-250. g. p.n.e.), Galena (129.-209. g. p.n.e.) pa sve do danas. Osnivač savremene eksperimentalne fiziologije Claude Bernard (1813.-1878.), jedan je od naučnika koji je zagovarao istraživanja na životinjama, smatrajući ih opravdanim, a djelovanje određenih komponenti na životinjski i ljudski organizam vrlo sličnim (Hajar, 2011; Franco, 2013). Životinje su korištene u cilju razumijevanja građe i funkcije organizma kako životinjskog, tako i ljudskog te su se na njima ispitivale učinkovitosti određenih preparata i zahvata kako bi se rezultati, odnosno iskustva, mogli primijeniti na ljudima u svrhu liječenja (Hajar, 2011; Gregurić Gračner i sar, 2019). Upotreba laboratorijskih životinja postaje s vremenom veoma značajna u biomedicinskim istraživanjima.

Posljednjih desetak godina, korištenje laboratorijskih životinja u naučnim istraživanjima jedno je od najčešće problematiziranih etičkih pitanja, kako u naučnim krugovima, tako i u javnosti. U današnje vrijeme, dosta se raspravlja o zabrani korištenja životinja kao modela u eksperimentima, iako su takva istraživanja neminovno doprinijela razvoju medicine (Franco, 2013; McLeod i Hartley, 2018).

U radovima na temu istraživanja i provođenja eksperimenata na životinjama uvijek se problematizira dobrobit. Ne postoji jedinstvena definicija dobrobiti koja bi bila primjenjiva na sve životinjske vrste. Dobrobit životinja je kompleksno pitanje koje ima svoju naučnu, etičku, ekonomsku, kulturnu, socijalnu, religijsku i političku dimenziju. S druge strane, pojam „dobrobit životinja“ se još definira kao stanje fizičkog i psihičkog zdravlja, koje omogućava uspješno prilagođavanje okolini. Za životinje jedan od najznačajnijih spoljašnjih (ekto) faktora je čovjek (Brown, 2013). Za laboratorijske životinje, dobrobit se definira kroz analizu njihovih bihevioralnih odgovora na eksperimentalne uvjete,

gdje se pozitivna i negativna iskustva modeliraju i posmatraju unutar kontrolisanih laboratorijskih okvira, s ciljem razumijevanja prirode ponašanja u ovim specifičnim okolnostima (Baumans, 2005; Gregurić Gračner i sar, 2019).

3R principi: zamjena, smanjenje i poboljšanje (engl. *replacement, reduction and refinement*) međunarodno je priznat pristup smanjenju upotrebe životinja u istraživanjima u okviru kojeg se, kad god je to moguće, zahtijeva primjenu alternativnih metoda i/ili unapređenje metoda, kako bi se smanjila nelagoda životinja korištenih u eksperimentima.

Cilj rada je predstaviti značaj primjene 3R principa, kao i njihove benefite koji doprinose dobrobiti životinja tokom eksperimentalnih studija.

Početak korištenja 3R principa

Korištenje životinja u eksperimentima datira iz najranijih historijskih perioda, a otkrićem anestetika stvorili su se uvjeti za ublažavanje njihove patnje. Prvi zakon koji je ograničio okrutnost prema životinjama u naučnim istraživanjima je usvojen 1876. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu. Bioetičari, William Russell i Rex Burch su sredinom 20. vijeka objavili revolucionarno djelo u kojem su utemeljili pristup prema humanijem korištenju laboratorijskih životinja, što je rezultiralo formiranjem tzv. 3R principa (zamjena, redukcija i poboljšanje), koji je postao ključni okvir za etička opravdana istraživanja (Gregurić Gračner i sar, 2019; Katica i Delibegović, 2019).

Razvojem društva i nauke, koncept je globaliziran i danas se koristi i širi skup principa poznat kao 11R ili 12R, koji uključuje dodatne faktore poput pouzdanosti (engl. *reliability*), relevantnosti (engl. *relevance*), ponovljivosti (eng. *reproducibility*), oporavka (engl. *rehabilitation*), odgovornosti (engl. *responsibility*), poštovanja (engl. *respect*), izbjegavanja nepotrebnih ponavljanja (engl. *redundancy avoidance*) i zakonitost postupaka (engl. *regulation*). Unutar Evropske unije, navedena načela su formalizirana Direktivom 2010/63/EU, koja je omogućila usklađivanje naučnih praksi s etičkim standardima. Baselska deklaracija iz 2010.

godine je dodatno ojačala napore u promovisanju ovih principa unutar naučne zajednice, sa ciljem uspostavljanja konstruktivnog dijaloga između istraživača i šire javnosti (Gregurić i sar, 2019).

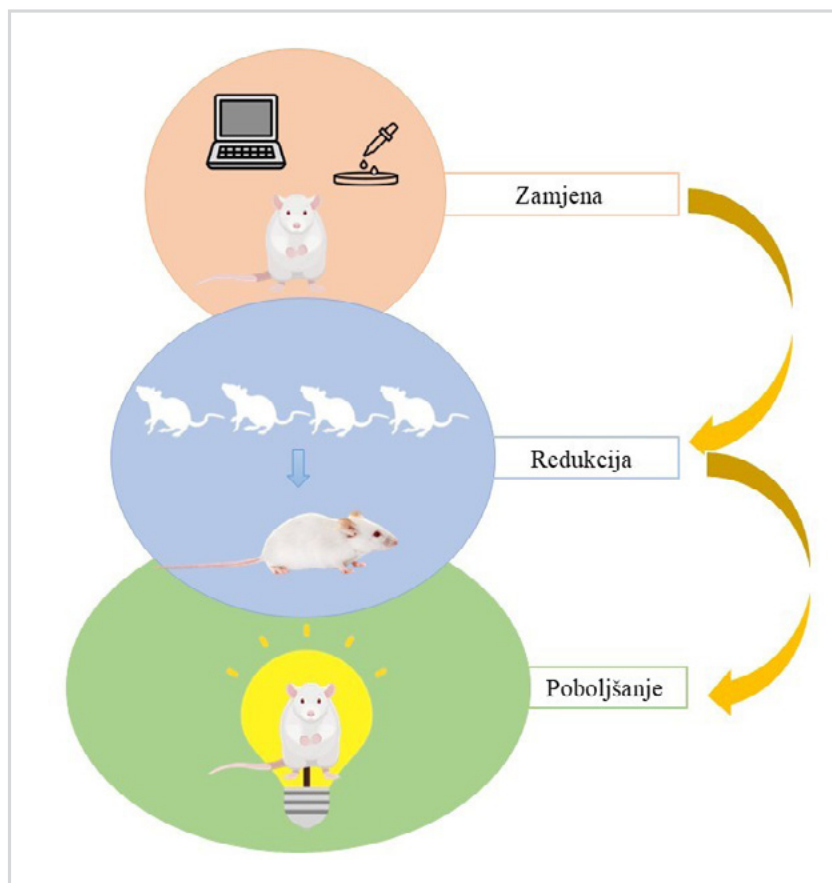
Prvi akt na svijetu koji se odnosio na postupke sa laboratorijskim životinjama je donesen 1878. godine u Britanskom parlamentu pod nazivom „Akt o okrutnosti prema životinjama“, kojim se zabranjuje neadekvatan tretman i okrutnost prema životinjama, kao što je to slučaj pri obavljanju bolnih eksperimenata, disekcije živih, svjesnih životinja i vivisekcije. Također, ovim aktom je naloženo posjedovanje relevantne licence za izvođenje eksperimenata od strane ministra unutrašnjih poslova. Uvjeti koji su bili neophodni za posjedovanje licence su bili iznimno strogi i kao takvi su se zadržali do danas (Uvarov, 1985).

Drugi akt, 1986. godine je regulirao korištenje laboratorijskih životinja i izvorno bio usklađen sa Direktivom EU 86/609/EEC koja je 2010. godine

nadopunjena i zamijenjena Direktivom 2010/63/EU (Anonymous, 1986; Anonymous, 2010). U Sjedinjenim Američkim Državama akt sličan britanskom je donesen 1966. godine, pod nazivom „Akt o dobrobiti laboratorijskih životinja“, ali ovim aktom nisu bile obuhvaćene ptice, stahori i miševi (Gregurić Gračner i sar, 2019).

3R principi u eksperimentima na životinjama bazirani su na tri koncepta: zamjena, smanjenje i poboljšanje. Tokom faze planiranja i izvođenja *in vivo* eksperimenata, istraživač bi trebao slijediti ove principe, nastojeći zamijeniti, gdje je moguće, životinjski model alternativnim modelom, smanjiti što je više moguće broj životinja u eksperimentu te unaprijediti eksperimentalne uvjete (Slika 1), (Russel i Burch, 1959).

Nakon primjene osnovnih 3R principa u *in vivo* eksperimentima, važno je proširiti etički okvir kroz dodatne smjernice koje osiguravaju potpuno naučnu i društvenu odgovornost, pri čemu se aktuelizira

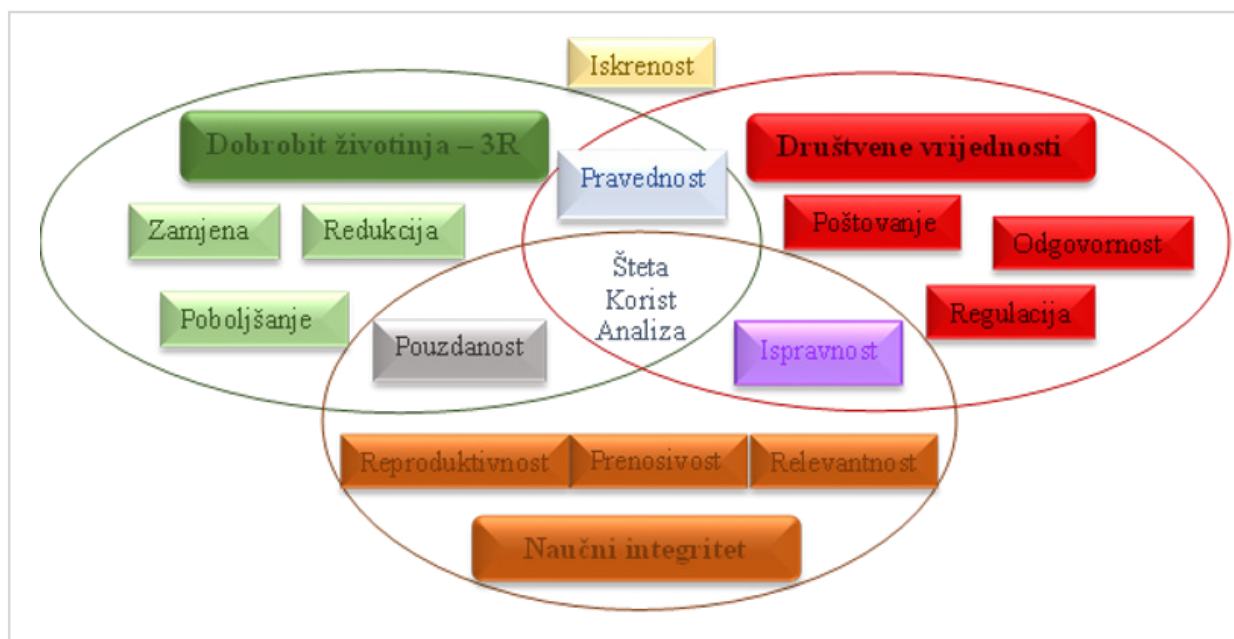


Slika 1

3R principi eksperimenata na životinjama

Figure 1

3R Principles of Animal Experimentation



Slika 2 Modificirani shematski prikaz 12R principa (Brink i Lewis, 2023)

Figure 2 Modified scheme of 12R Principles (Brink and Lewis, 2023)

12R princip, koji obuhvata mnogo više ključnih elemenata esencijalnih za korektno provođenje i realizaciju naučno-istraživačkog rada. Ovi principi predstavljaju sveobuhvatan pristup istraživanjima, usmjerenim na osiguravanje reproduktivnosti rezultata, relevantnosti istraživanja i prenosivosti podataka, uz poštivanje etičkih standarda (Slika 2) (Brink i Lewis, 2023).

Naučni integritet uključuje primjenu principa reproduktivnosti (engl. *reproducibility*), relevantnosti (engl. *relevance*) i prenosivosti (engl. *transferability*) u cilju dobivanja adekvatnih rezultata istraživanja. Istraživački dizajn, adekvatne veličine uzorka i precizne statističke analize su ključni za postizanje pouzdanih rezultata, dok transparentno izvještavanje i distribucija podataka povećavaju reproduktivnost, smanjujući nepotrebnu potrošnju resursa. Dobrobit životinja fokusirana je na već spomenute 3R principe – zamjena, redukcija i poboljšanje, dok se društvene vrijednosti odnose na odgovornost istraživača prema zajednici, poštivanje zakona, te svijest o kulturnim i etičkim aspektima eksperimenata,

uključujući moralnu i zakonsku obavezu zaštite životinja i društvene odgovornosti u naučnom procesu. Preklapanjem ovih domena stvaraju se dodatni principi: ispravnost (engl. *righteousness* - etičko postupanje prema životinjama i društvu), pouzdanost (engl. *reliability* - generiranje tačnih podataka kroz integraciju naučnog integriteta i dobrobit životinja) i odgovornost (engl. *reckoning* - odgovorno planiranje i izvođenje studija uz poštivanje etičkih i zakonskim smjernica). 12R principi pružaju balans između naučnih potreba, etičkih obaveza i društvene odgovornosti, omogućavajući održiv i odgovoran pristup istraživanju na životinjama (Brink i Lewis, 2023).

Dobrobit životinja

Pojam "dobrobit životinja" se sve češće koristi, ali njegovo značenje varira zavisno od konteksta i tumačenja. Dobrobit životinja podrazumijeva osiguravanje odgovarajućih uvjeta za smještaj, njegu, ishranu, zdravlje i ponašanje životinja, uz sprečavanje nanošenja nepotrebne boli, patnje i straha, te zaštitu od bolesti i povreda

(Sl. glasnik BiH, 25/09). Veterinari i farmeri su se fokusirali na fizičko stanje i okoliš (smještaj) životinja, smatrajući da je zdravlje znak njihove dobrobiti, dok su naučnici koristili fiziološke parametre (nivoi hormona stresa i srčanog ritma) kako bi procijenili koliko se životinje uspješno prilagođavaju na njihovo okruženje. Međutim, ovaj pristup je ograničen jer ne obuhvata mentalno stanje životinja. Savremeni pristupi dobrobiti uključuju i emocionalna stanja životinja, budući da većina smatra da životinje osjećaju strah i frustraciju. Postoje teorije koje sugeriraju da je dobrobit životinja praktično direktno povezana sa njihovim osjećanjima. Najprihvaćenija definicija danas uključuje kombinaciju fizičkog zdravlja, emocionalnog stanja i mogućnosti zadovoljavanja prirodnih potreba, jer su svi ovi aspekti međusobno povezani i utječu na cjelokupnu dobrobit životinje (Hewson, 2003). Postoji pet (5) osnovnih prava koja čine temelje dobrobiti životinja, a svaki od njih je usmjeren na osiguranje zdravlja i blagostanja životinja:

Prva je sloboda od gladi i žeđi, što podrazumijeva osiguravanje pristupa adekvatnoj hrani i vodi, kako bi se zadovoljile osnovne nutritivne potrebe životinje.

Druga je sloboda od nelagode, koja se odnosi na pružanje odgovarajućih uvjeta života (sklonište, prostrano okruženje).

Treća je sloboda od boli, povreda i bolesti, što uključuje veterinarsku njegu kako bi se spriječila i liječila svaka patnja, povreda ili bolest.

Četvrta, sloboda izražavanja normalnog ponašanja, koja podrazumijeva omogućavanje prostora i samim time prirodno ponašanje i interakciju sa drugim životinjama.

Peta, sloboda od straha i stresa, koja se odnosi na zaštitu životinja od uznemirujućih situacija koje mogu izazvati strah, stres ili anksioznost, čime se osigurava mentalno blagostanje (Mellor, 2016).

Navedenih pet (5) sloboda može se nazvati i pet (5) prava svih životinja, što bi moglo biti poveznica i zajednički stav, između dva gotovo sukobljena tabora:

1. Dobrobit životinja,
2. Životinjska prava.

U Bosni i Hercegovini postoji nekoliko pravnih akata koji definiraju postupanje sa životinjama, njihovu dobrobit, kao i korištenje eksperimentalnih životinja u istraživanjima. Krovni zakon u ovoj oblasti je Zakon o zaštiti i dobrobiti životinja iz 2009. godine (Sl. glasnik BiH, 25/09). GLAVA X – Zaštita životinja za eksperimente i druga naučna istraživanja član 31-34, kojom se uređuje zaštita životinja od mučenja, zanemarivanja i neprimjerenog postupanja, a nadležna tijela za provedbu zakona su Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa i Ured za veterinarstvo BiH. Uz ovaj zakon postoje i brojni pravilnici koji detaljnije uređuju specifične oblasti, npr. Pravilnik o načinu vođenja evidencije o eksperimentalnim životinjama (Sl. glasnik BiH, 19/10). Ovi propisi pružaju pravni okvir za osiguravanje dobrobiti životinja.

Zamjena (engl. *replacement*)

Većina naučnih i medicinskih istraživanja uključuje eksperimentalno korištenje životinja, koje itekako predstavlja važan aspekt u određenim oblastima, iako bi u idealnom svijetu trebale postojati alternative (Robinson, 2005). Iako još uvijek ne postoje sredstva za zamjenu svih oblika upotrebe životinja bez usporavanja naučnog napretka, zamjena je posebno relevantna za fundamentalna i primijenjena biomedicinska istraživanja, regulatorno testiranje i upotrebu životinja u edukaciji i obuci (Russel i Burch, 1959).

Koncept principa je baziran na mogućnosti zamjene životinjskog modela alternativnim (Russel i Burch, 1959). Zamjenske metode se uobičajeno predstavljaju kao adekvatna alternativa korištenju modela (eksperimenata) sa životinjama te nude niz prednosti, omogućavajući brži napredak, i u nekim slučajevima pružajući naučne uvide koji „nisu bili mogući korištenjem životinjskih modela“ (Russel i Burch, 1959). Russel i Burch su opisali niz alternativnih metoda, kao što su biljke, mikroorganizmi, biohemijski sistemi i neživi fizički modeli, te su napravili razliku

između relativnih i apsolutnih tehnika zamjene, koji su kasnije evoluirali u djelomičnu (relativnu) i potpunu zamjenu (apsolutnu) (Russel, 1957).

Djelimična zamjena podrazumijeva upotrebu druge vrste organizama sa relativno manje složenim nervnim sistemom, a za koje se smatra da nisu sposobne za doživljavanje patnje (NC3RS, n.d.), primjer su beskičmenjaci i nezreli oblici kičmenjaka, kao i primarne ćelije (i tkiva) uzeti od životinja koje su ubijene isključivo u tu svrhu.

Kod potpune zamjene, Buchanan-Smith je 2005. godine izjavio da „3R i dalje predstavljaju najbolji pristup alternativama“ i definirao koncept zamjene kao „skup procedura koje u potpunosti eliminiraju upotrebu nekih vrsta životinja“.

Zbog kontinuiranog istraživanja u različitim naučnim oblastima postoje brojne alternativne metode i korištenje zamjenskih modela čiji je prikaz dat u produžetku (Tabela 1).

Tabela 1 Alternativne zamjene za životinjske modele

Table 1 Alternative replacements for animal models

Zamjena	Opis	Referenca
Fizičko-hemijska svojstva	Korištenje pH i kapaciteta pufera za predviđanje potencijalnih ozbiljnih iritacija oka ili korozije; testovi reaktivnosti peptida za screening hemikalije koje potencijalno izazivaju senzibilizaciju kože; korištenje računarskih i matematičkih modela koji povezuju molekularnu strukturu sa specifičnim biološkim aktivnostima.	Lalko i sar., 2012; OECD, 2017
Neosjetilni organizmi	Korištenje bakterija, glista i voćnih mušica kao alternativnih organizama za testiranje bioloških efekata, uključujući <i>Caenorhabditis elegans</i> za testiranje toksičnosti i istraživanje procesa ćelijske smrti i razvoja nervnog sistema, <i>Drosophila melanogaster</i> za razumijevanje određenih aspekata složenih poremećaja, poput Parkinsonove bolesti.	Ames sar., 1973; Robinson, 2005; Leung i sar., 2008; Perrimon i sar., 2016
Nezreli oblici osjetilnih vrsta	Korištenje nezrelih oblika osjetilnih vrsta koje nisu sposobne osjetiti bol, patnju ili stres, poput riblje larve za procjenu akvatične toksičnosti.	Lilicrap i sar., 2016
Jednoćelijski organizmi	Korištenje jednoćelijskog kvasca za proučavanje poremećaja ćelijske diobe kod ćelija raka.	Robinson, 2005
<i>Ex vivo</i> i <i>in vivo</i> sistemi	Korištenje sistema, životinjskog ili ljudskog porijekla, na nivou organa, presjeka tkiva, kulture/suspenzije ćelija ili subćelijske komponente. Ovi sistemi mogu predstavljati apsolutne ili relativne zamjene. Napredni bioinženjerski sistemi poput organoida, 3D skela i mikrofluidnih sistema za simulaciju ljudske fiziologije.	Marx i sar., 2016; Vulto i Joore, 2021; Taebnia i sar., 2023
Prikupljanje životinjskog materijala	Prikupljanje izmeta, dlake, sline i urina od životinja iz kojeg se može izdvojiti DNK, kao alternativa invazivnim metodama hvatanja i uzorkovanja.	Bischof i sar., 2020
Istraživanja na ljudima	Uz odgovarajuće etičke mjere zaštite (prikupljanje podataka tokom volonterskih studija, kliničkih ispitivanja, epidemioloških studija i sl.)	Smith i Richmond, 2024

Redukcija (engl. *reduction*)

Princip redukcije brojnosti životinja, kao dio 3R principa je izuzetno važan, a odnosi se na smanjenje broja eksperimentalnih jedinica korištenih u dizajnom eskperimenta kreiranom protokolu, a da pri tome redukcija nema utjecaja na kvalitet rezultata koji moraju ostati relevantni i vjerodostojni (Robinson, 2005; Smith i Richmond, 2024). Međutim, bitno je razmisliti o načinu smanjenja eksperimentalnih životinja, jer ovaj princip ne smije u startu utjecati na statističke pokazatelje. Ponekad se javlja dilema između smanjenja broja životinja i poboljšanja uvjeta (engl. *refinement*), npr. kako bi reducirali broj ženki u proizvodnji genetski modificiranih

miševa uobičajena praksa je davanje hormona u cilju povećanja proizvodnje jajnih stanica ili tzv. superovulacija. Ali, superovulacija zahtijeva da svaka životinja primi intraperitonealnu injekciju u abdomen, što može izazvati bol, a konsekventno i stres. Zbog toga se redukcija ponekad smatra neadekvatnim ili nepodesnim principom (Robinson, 2005).

Redukcija se može postići korištenjem rezultata iz prethodnih provedenih sličnih studija ili pilot-studija, usvajanjem najučinkovitijeg eksperimentalnog dizajna i veličine uzorka prilagođene cilju, te metodologija i iskustavima koje koriste različite laboratorije ili istraživačke institucije. Postoje tri načina za realizaciju principa redukcije (Tabela 2) (de Boo i Hendriksen, 2005).

Tabela 2 Tri načina realizacije redukcije (de Boo i Hendriksen, 2005)

Table 2 Three types of reduction (de Boo i Hendriksen, 2005)

Načini redukcije	Opis
Intra-eksperimentalna	Smanjenje broja životinja unutar svakog pojedinačnog eksperimenta ili protokola. Poboljšanje statističkog dizajna, izvođenje pilot-studija i retrospektivna analiza podataka omogućavaju optimizaciju minimalnog broja životinja.
Supra-eksperimentalna	Širenje koncepta redukcije između istraživača kroz organizovane kurseve i sastanke o eksperimentalnim dizajnima i statističkim metodama kako bi se smanjila upotreba životinja u istraživačkim eksperimentima.
Ekstra-eksperimentalna	Redukcija na međunarodnom nivou kroz usklađivanje pravila o eksperimentisanju i razvoj novih strategija za istraživanje i testiranje, čime se smanjuje broj životinja potrebnih za naučne svrhe.

Korištenje prevelikog broja eksperimentalnih jedinica, osim što je neetično, dovodi do rasipanja resursa u finansijskom i vremenskom smislu. Istovremeno, korištenje nedovoljnog broja životinja može utjecati na rezultate statističke obrade podataka, što ponovo predstavlja rasipanje resursa (de Boo i Hendriksen, 2005; Verderio i sar., 2023).

Poboljšanje (engl. *refinement*)

Poboljšanje, kao dio 3R principa, ne podrazumijeva samo brigu o dobrobiti eksperimentalnih životinja, već i poboljšanje kvaliteta njihovog života, tokom svih procedura kojima su izložene u zatočeništvu (Russel i Burch, 1959). Buchanan-Smith (2005) je predložio novu definiciju poboljšanja, koja glasi: „bilo koji pristup koji izbjegava ili minimizira stvarnu ili potencijalnu bol, stres i druge nepovoljne efekte koje životinje doživljavaju u bilo kojem trenutku svog života i koji poboljšava njihovo

blagostanje“. Poboljšanje nije samo smanjenje broja nepovoljnih efekata ili broja korištenih životinja, već smanjenje ukupne kumulativne boli, patnje, stresa i trajne štete koja može biti nanosena životinjama koje se uzgajaju, drže i koriste u naučno-istraživačke svrhe (Smith i Richmond, 2024). Stres se najčešće manifestuje kroz poremećaje u ponašanju, kao što je očigledni bijeg, preference - povlačenje i izbjegavanje pristupa ili pak suprotno kroz pojavu agresivnosti. Pokazatelj poremećaja mogu biti promjene u kretanju, vokalizaciji, promjeni srčanog ritma, disfunkciji simpatičkog nervnog sistema i sl. (Meyer, 2015). U novoj Evropskoj direktivi 2010/63, kao faktor poboljšanja navodi se obogaćivanje i unapređenje faktora okoline (mikroambijenta), te je dokazan način da se životinjama omogući veća kontrola nad okruženjem i podstakne ispoljavanje ponašanja svojstvenih ekologiji i etologiji korištenih vrsta (Tabela 3) (Olsson i Dahlborn, 2002; Verderio i sar., 2023). Bitno je napomenuti da različite životinje imaju specifične modele ponašanja, npr. miševi vole praviti gnijezda i držati drvene grančice, također, stahori koji su nekada radi lakšeg održavanja držani na rešetkastim podovima,

danas se drže u kavezima sa čvrstim podovima koji sadrže mjesta za skrivanje, naime u naučnim eksperimentima su vršili pritisak tijelom na vrata da bi dobili pristup kavezima sa čvrstim podom ili dodatnim prostorom. Samim time, nevjerovatno je da stahori podignu 83% svoje tjelesne težine kako bi dobili pristup takvom kavezu, što upućuje koliko su im takvi resursi važni (Robinson, 2005). Obezbeđivanje olakšanja bola, iako spada u jedan od bitnijih elemenata poboljšanja, također je teško identificirati i zahtjevno za prepoznati kod određenih vrsta eksperimentalnih životinja. Glodari su u prirodnim uvjetima najčešće plijen, te patnju i bol često instiktivno prikrivaju. Naučnici na Univerzitetu u Newcastle-u su posmatrali i snimali stahore nakon provedenih operativnih zahvata kako bi identificirali specifično ponašanje boli, komparirajući ih s onima koji nisu prošli operativni zahvat.

Korištenjem ovakvog principa, identificirali su nekoliko prepoznatljivih znakova, kao što su pokreti istežanja slični mačjem istežanju leđa. Takvi znakovi kod stahora su nestajali nakon aplikacije analgetika (Robinson, 2005).

Tabela 3 Vrste poboljšanja (Verderio i sar., 2023)

Table 3 Types of improvement (Verderio et al., 2023)

Vrsta poboljšanja	Opis
Higijena	Okruženje treba biti slobodno od insekata i parazita, te lako za čišćenje i dezinfekciju. Osigurati prostor za odmor koji je opremljen prostirkom ili drugim mekanim, suhim i čistim materijalom. Površina po kojoj se životinje kreću trebaju biti suhe i čiste, kako ne bi došlo do klizanja i mogućih povreda nogu.
Okruženje	Temperature u prostorijama za smještaj trebaju biti prilagođene vrsti, starosti životinja i njihovoj gustoći naseljenosti, kako bi se izbjegle situacije toplotnog ili hladnog stresa. Potrebna je ventilacija prostora, redovno mjerenje kvaliteta zraka, kao i prisustvo kisika i nivoa ugljen-dioksida. Previsoka vlažnost može pogodovati razvoju amonijaka u prostorijama i kavezima, a preniska vlažnost uzrokuje patološka stanja kod glodara, kao što je "ringtail" i gubitak toplote.
Smještaj	Životinja treba biti u mogućnosti da organizira prostor prema svojim etološkim potrebama, zbog toga potrebna je opremljenost sa materijalom za izgradnju gnijezda, adekvatna prostirka, prečke i platforme. Pri neadekvatnim uvjetima smještaja javlja se ugroženost dobrobiti životinje, što posljedično može dovesti do psihofizičke nelagode, npr. razvoj atipičnog ponašanja, stereotipija ili prekomjerna agresija.

Vrsta poboljšanja	Opis
Senzorne stimulacije	Ukoliko eksperimentalni protokol ne dozvoljava interakciju sa pripadnicima iste vrste, neophodno je omogućiti indirektni socijalni kontakt (vizuelni, slušni i olfaktorni). Na ovaj način smanjuje se stres tokom eksperimentalnih postupaka i osigurava bolja interakcije između životinja i osoblja/istraživača.
Socijalizacija	Životinjama je potrebna socijalna interakcija sa pripadnicima iste vrste, usljed čega ih je potrebno držati u parovima ili grupama koje su stabilnije i harmoničnije, iako s druge strane to može uključivati negativne i stresne aspekte poput agresije dominantnih jedinki nad podređenim.

ZAKLJUČAK

3R načela, koja se svakodnevno i bez iznimke spominju kada se naglasak želi staviti na napore naučne zajednice koji se ulažu u osiguranje dobrobiti životinja u eksperimentu, razvojem nauke, tehnologije, ali i evolucijom svijesti kako naučnika, tako i šire društvene zajednice, svakodnevno se unapređuju, tako da danas već možemo govoriti i o 12R načelima. Međutim, upravo se naziv “3R načelo” koristi uvijek kada se u raspravi žele istaknuti aktivnosti u vezi s osiguranjem dobrobiti životinja u eksperimentu, gotovo kao priznanje naučnicima koji su postavili temelje nove primijenjene naučne discipline koja je trebala poboljšati postupke u radu s laboratorijskim životinjama, a ujedno i pridonijeti kvaliteti naučnog rada u kojem se te životinje koriste. Neosporno je da je korištenje eksperimentalnih životinja danas, nažalost, još uvijek neizbježno, stoga primjena svih dostupnih mehanizama u cilju zaštite njihove dobrobiti pruža, između ostalog i mogućnost razvoja pozitivnog dijaloga u smjeru šireg društvenog prihvaćanja još uvijek nužne primjene eksperimentalnih životinja, posebno u biomedicinskim istraživanjima.

Potreba za ispitivanjem na životinjama se kontinuirano povećava s razvojem humane i veterinarske medicine, te farmaceutske industrije pa je neophodno razvijati testove koji mogu pratiti i potrebe industrije i osiguranje od hazarda. Alternativni testovi često omogućuju preliminarno, brže i jeftinije ispitivanje u odnosu na *in vivo* testove koji su dugotrajniji i skuplji.

Korištenje životinja u testiranjima se smanjuje u svim naučnim poljima zbog razvoja alternativnih metoda i veće svijesti istraživača i naučnika, ali i poštivanja pravila (poput 3R principa), legislative i zakona.

Apsolutna zamjena svih testova na životinjama alternativnim testovima je nemoguća zbog složenosti organskih sistema koji učestvuju u odgovoru na unešeni inzult, zbog potrebe za tačnim i pouzdanim rezultatima i zbog nemogućnosti primjene nekih alternativnih metoda. Ispitivanje na životinjama se smatra etički opravdanim ukoliko je procijenjena potencijalna korist rezultata istraživanja za ljude i životinje veća od procijenjene štete koja im se nanosi. Zakonska regulativa koja ograničava korištenje životinja za naučna istraživanja ima ulogu u regulaciji, ali i poticanju razvoja alternativnih metoda. Tako je na primjer zabrana testiranja kozmetičkih proizvoda na životinjama u Evropskoj uniji iz 2013. godine imala za rezultat nagli porast razvoja alternativnih testova za ispitivanje dermalne toksičnosti.

Postojeće zakonodavstvo je, zbog vrlo velike zabrinutosti javnosti o opravdanosti korištenja životinja u naučne svrhe, usmjereno na potpunu zamjenu životinja u eksperimentima drugim metodama koje ne uključuju žive životinje, kad to postane naučno izvodivo. Međutim, korištenje živih životinja i dalje je neophodno radi zaštite zdravlja ljudi, životinja i zaštite okoliša. U tom smislu primjenom aktuelnih propisa potiče se i omogućava razvoj alternativnih pristupa i primjene načela 3R, te nastoji osigurati visoka razina zaštite životinja koji se još uvijek moraju koristiti u eksperimentima.

LITERATURA

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(3), 782-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.782>
- Anonymous. 1986. Direktiva vijeća od 24. studenoga 1986. o usklađivanju zakona i drugih propisa država članica s obzirom na zaštitu životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe (86/609/EEZ). *Službeni list Europske unije* 15/Sv. 26. *Službeni list europske zajednice* L 358/1.
- Anonymous. 2010. Direktiva 2010/63/eu Europskog parlamenta i vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Službeni list Europske unije* 15/Sv. 28. *Službeni list Europske unije* L 276/33.
- Baumans V. 2005. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech*, 24(2), 503-13.
- Bischof R, Milleret C, Dupont P, Chipperfield J, Tourani M, Ordiz A, et al. 2020. Estimating and forecasting spatial population dynamics of apex predators using transnational genetic monitoring. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(48), 30531-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011383117>
- Brink CB, Lewis DI. 2023. The 12 Rs Framework as a Comprehensive, Unifying Construct for Principles Guiding Animal Research Ethics. *Animals (Basel)*, 13(7), 1128. <https://doi.org/10.3390/ani13071128>
- Brown JM. 2013. Ethics and Animal Welfare. In: Bayne K, and Turner PV (Eds). *Laboratory Animal Welfare*. Academic Press. Elsevier, 7-15.
- Buchanan-Smith H, Rennie A, Vitale A, Pollo S, Prescott M, Morton D. 2005. Harmonising the definition of refinement. *Animal Welfare*, 14(4), 379-84. <https://doi.org/10.1017/S0962728600029717>
- de Boo J, Hendriksen C. 2005. Reduction strategies in animal research: a review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. *Altern Lab Anim*, 33(4), 369-77. <https://doi.org/10.1177/026119290503300404>
- Franco NH. 2013. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*, 3(1), 238-73. <https://doi.org/10.3390/ani3010238>
- Gregurić Gračner G, Lončarić N, Bubić Špoljar J, Dovč A, Fuš K, Gračner D. i sar. 2019. 3R načelo u zaštiti dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe - jučer, danas, sutra. *Veterinarska stanica*, 50 (1), 63-73.
- Hajar R. 2011. Animal testing and medicine. *Heart views*, 12(1), 42. <https://doi.org/10.4103/1995-705X.81548>
- Hewson CJ. 2003. What is animal welfare? Common definitions and their practical consequences. *Can Vet J*, 44(6), 496-99.
- Katica M, Delibegović S. 2019. *Laboratorijske životinje-Osnovne tehnike eksperimentalnog rada*. Sarajevo: Dobra knjiga.
- Lalko JF, Kimber I, Gerberick GF, Foertsch LM, Api AM, Dearman RJ. 2012. The direct peptide reactivity assay: selectivity of chemical respiratory allergens. *Toxicol Sci*, 129(2), 421-31. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs205>
- Leung MC, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, et al. 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci*, 106(1), 5-28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121>
- Lillicrap A, Belanger S, Burden N, Pasquier DD, Embry MR, Halder M, et al. 2016. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2 decades and current status. *Environ Toxicol Chem*, 35(11), 2637-46. <https://doi.org/10.1002/etc.3603>
- Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, et al. 2016. Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. *ALTEX*, 33(3), 272-321. <https://doi.org/10.14573/altex.1603161>
- McLeod C, Hartley S. 2018. Responsibility and Laboratory Animal Research Governance. *Sci Technol Human Values*, 43(4), 723-41. <https://doi.org/10.1177/0162243917727866>
- Mellor DJ. 2016. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living”. *Animals (Basel)*, 6(3), 21. <https://doi.org/10.3390/ani6030021>
- Meyer RE. 2015. Physiologic Measures of Animal Stress during Transitional States of Consciousness. *Animals (Basel)*, 5(3), 702-16. <https://doi.org/10.3390/ani5030380>
- National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animal Research (NC3RS). <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs> (Pristupljeno: 16.10.2024.).
- Olsson IA, Dahlborn K. 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of “environmental enrichment”. *Lab Anim*, 36(3), 243-70. <https://doi.org/10.1258/002367702320162379>
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2017. Guideline for the testing of Chemicals: Acute Eye Irritation/ Corrosion (TG405). <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185333-en.pdf> (Pristupljeno: 16.10.2024.).
- Perrimon N, Bonini NM, Dhillon P. 2016. Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Dis Model Mech*, 9(3), 229-31. <https://doi.org/10.1242/dmm.024810>
- Pravilnik o načinu vođenja evidencije o eksperimentalnim životinjama i vrstama eksperimenata (Službeni glasnik, 19/10). <https://vfs.unsa.ba/portal/wp-content/uploads/2023/12/Pravilnik-o-vođenju-evidencije-o-ekspserimentalnim-zivotinjama>

- jama-i-vrstama-eksperimenta.pdf (Pristupljeno: 16.10.2024.).
- Robinson V. 2005. Finding alternatives: an overview of the 3Rs and the use of animals in research. *The School science review*, 87, 111-14.
- Russell WMS, Burch RL. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen & Co, Ltd.: London, UK.
- Russell WMS. 1957. The increase of humanity in experimentation: Replacement, reduction and refinement. *Lab Anim Bur Collect Pap.* 6, 23-5.
- Smith A, Richmond J. 2024. The Three Rs. In: Golledge H, Richardson C (Eds). *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals* (9th Ed., pp. 5-22), Wiley-Blackwell.
- Taebnia N, Römling U, Lauschke VM. 2023. *In vitro* and *ex vivo* modeling of enteric bacterial infections. *Gut Microbes*, 15(1), 2158034. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2158034>
- Uvarov O. 1985. Research with animals: requirement, responsibility, welfare. *Lab Anim*, 19(1), 51-75. <https://doi.org/10.1258/002367785780890640>
- Verderio P, Lecchi M, Cisinelli CM, Shishmani B, Apolone G, Manenti G. 2023. 3Rs Principle and Legislative Decrees to Achieve High Standard of Animal Research. *Animals (Basel)*, 13(2), 277. <https://doi.org/10.3390/ani13020277>
- Vulto P, Joore J. 2021. Adoption of organ-on-chip platforms by the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov*, 20(12), 961-2. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00323-0>
- Zakon o zaštiti i dobrobiti životinja (Službeni glasnik BiH 25/09). https://propisi.ks.gov.ba/sites/propisi.ks.gov.ba/files/Zakon_o_zastiti_i_dobrobiti_zivotinja_0.pdf (Pristupljeno: 16.10.2024.).

ROLE AND IMPLEMENTATION OF 3R PRINCIPLES IN ANIMAL WELFARE IN EXPERIMENTAL RESEARCH

ABSTRACT

Use of animals in experimentation dates back to the ancient era, and the discovery of anesthetics have enabled alleviation of their suffering. Animal welfare implies the creation of appropriate conditions of housing, caring, nutrition and animal behavior in order to prevent unnecessary pain, suffering and fear, and also protection from diseases and injuries. Aim of our research is to evaluate the importance of the application of 3R principles and their benefits to animal welfare in experimentation. In the mid-20th century, bioethicists Russel and Burch developed a 3R principle (replacement, reduction, refinement) to have become a foundation for the ethically acceptable research. Over time, the principle have expanded into a set of principles known as 11R or 12R to include some extra factors referring to a comprehensive approach to research with the aim to improve reproducibility of results, relevance of research and transfer of data, all abiding by ethical standards. Unfortunately, indisputable is the necessity to still use the experimental animals, however, the implemetation of all mechanisms at hand to protect animal welfare is supportive of strenghtening of an affirmative dialogue toward a wider societal acceptance of experimentation on animals, which is still indispensable in biomedical research

Keywords: 3R principles, experimental animals, welfare