

3R načelo u zaštiti dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe - jučer, danas, sutra



G. Gregurić Gračner*, N. Lončarić, J. Bubić Špoljar, A. Dovč, K. Fuš, D. Gračner i Ž. Pavičić

Sažetak

Prvi pisani dokazi korištenja životinja u pokusima potječu još iz Staroga vijeka. Sve do otkrića anestetika životinje su u pokusima proživljavale nezamislive patnje. Prvi akt koji je zabranjivao okrutnost prema životinjama u pokusu donesen je u Britanskom parlamentu 1876. godine. Sredinom dvadesetog stoljeća znanstvenici Russell i Burch u svome su djelu "Načela humanih pokusnih tehnika" postavili temelje nove primijenjene znanstvene discipline koja je trebala poboljšati postupke u radu s laboratorijskim životinjama, a ujedno i pridonijeti kvaliteti znanstvenog rada u kojem se te životinje koriste. Raščlamba metoda kojima bi se mogli isključiti neljudski postupci prema životinjama u pokusu rezultirala je stvaranjem koncepta 3R načela: *Replacement* (zamjena), *Reduction* (smanjenje) i *Refinement* (poboljšanje) s ultimativnim ciljem sadržanim u tek jednoj riječi – čovječnost. Razvojem znanosti, tehnologije, ali i evolucijom svijesti kako znanstvenika, tako i šire društvene zajednice, 3R načela svakodnevno se razvijaju, tako da možemo govoriti i o 11R načelima jer se uz tri prethodno navedena danas još navode i *Reliability* (pouzdanost), *Relevance* (pogodnost–prikladnost), *Reproduci-*

bility (ponovljivost), *Rehabilitation* (oporavak), *Responsibility* (odgovornost), *Respect* (poštovanje), *Redundancy avoidance* (izbjegavanje nepotrebnih ponavljanja) i *Regulation* (zakonitost postupaka). 3R načelo razvijalo se tijekom proteklih pedeset godina osiguravajući okvir za izvođenje humanih pokusnih postupaka prema životinjama, a prvi se puta sam naziv „Načela zamjene, smanjenja i poboljšanja“ uvodi u zakonodavstvo Europske unije kroz Direktivu 2010/63/EU. Godine 2010. donesena je Baselska deklaracija kojoj je cilj ujediniti napore znanstvene zajednice u nastojanjima daljnjeg unaprjeđivanja primjene etičkih principa poput 3R načela u pokusima na životinjama sa svrhom postizanja pozitivnog dijaloga znanstvene zajednice sa zainteresiranom javnošću. Danas projekt "Odgovorno istraživanje i inovacije" (*Responsible Research and Innovation, RRI*) Europskog okvirnog programa Obzor 2020 potiče suradnju i dijalog među istraživačima, građanima, političarima, itd. tijekom cijelog procesa istraživanja kako bi se taj proces i njegovi ishodi bolje uskladili s vrijednostima, potrebama i očekivanjima društva.

Ključne riječi: 3R načelo; pokusne životinje; laboratorijske životinje; dobrobit

Dr. sc. Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Damjan GRAČNER, dr. med. vet., redoviti profesor, Klara FUŠ, studentica, dr. sc. Željko PAVIČIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska; Nataša LONČARIĆ, dr. med. vet., viša inspektorica, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Jadranka BUBIĆ ŠPOLJAR, dr. med. vet., viša stručna suradnica, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Alenka DOVČ, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Univerzitet u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Brojni su znanstvenici tijekom povijesti posezali za životinjama kao pokusnim modelima, posebice u biomedicinskim istraživanjima. Neki od prvih zapisa o korištenju životinja u pokusne svrhe potječu još iz Staroga vijeka.

Od Aristotela (384.-322. g. pr. Kr.), Erasistratusa (304.-250. g. pr. Kr.), Galena (129.-209.) pa sve do danas, brojne su životinje korištene i žrtvovane sa svrhom boljeg razumijevanja građe i funkcije organizma, kako životinjskog, tako posredno i ljudskog. Na njima je iskušavana učinkovitost određenih preparata i zahvata kako bi ih se potom moglo primijeniti i na ljudima u svrhu liječenja (Hajar, 2011.). Claude Bernard (1813.-1878.), utemeljitelj suvremene eksperimentalne fiziologije, bio je tek jedan u nizu znanstvenika koji je zagovarao pokuse na životinjama, smatrajući ih potpuno opravdanim, a djelovanje određenih tvari na životinjski i ljudski organizam vrlo sličnima (Hajar, 2011., Franco, 2013.). S druge strane, posebno u novije vrijeme, sve su snažnije društvene struje koje se bore za zabranu korištenja životinja kao modela u pokusima. Međutim, tijekom dvadesetog stoljeća nekoliko se puta dogodilo da je primjena određenog lijeka, čije djelovanje nije prethodno bilo istraživano na životinjama, rezultiralo masovnim stradanjima ljudi. Tako je, na primjer, godine 1937. uporaba dietilen glikola (DEG) kao otapala u pripravku jednog preparata sulfanilamida prouzročila smrtonosno trovanje stotina ljudi. Desetine tisuća djece je, sredinom dvadesetog stoljeća, rođeno s većim ili manjim tjelesnim oštećenjima nakon što su majke u trudnoći koristile lijek protiv mučnine Talidomid čiji učinci također nisu prethodno istraživani na životinjama (Hajar, 2011.). Iako je korištenje životinja kao modela u pokusima bez sumnje značajno pridonijelo razvoju medicine i spašavanju brojnih života, sve do

danas korištenje životinja kao modela u istraživanjima i pokusima predstavlja temu brojnih, ponekad i vrlo oštih, rasprava (Franco, 2013., McLoad i Hartley, 2018.).

Pojam koji se, bez iznimke, spominje u svakom literaturnom izvoru kao i u raspravama koje razmatraju stanovišta rada s pokusnim životinjama je „dobrobit“. Postavlja se pitanje kako, dakle, definirati pojam “dobrobit”? Kada možemo reći da je životinji zadovoljena “dobrobit”? U biti, nema jedinstvene definicije, primjenjive na sve životinjske vrste. Pojam „dobrobit životinja“ tako se najčešće koristi za opis znanstvene grane, ali i koncepta. Kao znanost, uključuje mjerljive pokazatelje u životinji i često se povezuje s njezinom sposobnošću svladavanja izazova u okolini i okolišu (Brown, 2013.). Dobrobit se, tako, uglavnom definira kao stanje u kojem životinja opstaje kao potpuno fizički i psihički zdrava jedinka koja se zbog toga uspješno nosi s okolišem. Međutim, upravo okolišni čimbenici (fizički okoliš, dostupni resursi i upravljačka praksa), utječu na fizički i psihički odgovor životinje nastao kao rezultat pokušaja da se ona tim čimbenicima prilagodi (Hughes, 1976., Broom, 1986.). S druge strane, razmatranje pojma „dobrobit životinje“ kao koncepta nužno uključuje i utjecaj djelovanja čovjeka s pozicije njegova posjednika (Brown, 2013.). Jedna od definicija dobrobiti koja se odnosi upravo na dobrobit laboratorijskih životinja odnosi se na mogućnost postizanja ravnoteže između njihovih pozitivnih i negativnih iskustava sličnih iskustvima istovrsnih životinja u divljini (Baumans, 2005.). Naime, suvremena istraživanja ne podupiru vjerovanja da su stotine naraštaja životinja iz laboratorijskog uzgoja rezultirale životinjama koje su dobro prilagođene tim uvjetima (Würbel, 2001.). Unatoč izvjesnim kvantitativnim promjenama u ponašanju (npr. laboratorijski su

sojevi podatniji za proučavanje), nisu ustanovljene kvalitativne promjene (Würbel i sur., 2009.).

Würbel (2001.) navodi da je odnos dobrobiti životinja i uspješnosti istraživanja daleko složeniji nego što se to često navodi. Naime, smatra da na ishode istraživanja može utjecati smještaj životinja i to kroz izražavanje njihovih fizioloških i ponašajnih karakteristika, bez obzira na to je li to povezano s narušavanjem dobrobiti, a s druge strane, narušena dobrobit životinja može i ne mora negativno utjecati na ishod istraživanja što će ovisiti o tome je li to povezano s određenim promjenama u ponašanju životinja ili fiziologiji njihova organizma.

Općenito i najkraće značenje pojma „dobrobit životinja“ je izostanak distresa, odnosno, prisustvo osjećaja zadovoljstva bez obzira na njegov intenzitet (Tannenbaum i Bennet, 2015.).

U Velikoj Britaniji je još početkom 19. stoljeća prepoznata i smatrana neprihvatljivom bilo kakva okrutnost prema životinjama. Godine 1824. osnovano je Kraljevsko društvo za sprječavanje okrutnosti prema životinjama (*The Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*, RSPCA). Međutim, prvi akt na svijetu koji se odnosio na postupke s laboratorijskim životinjama donesen je u Britanskom parlamentu godine 1876. pod nazivom „Akt o okrutnosti prema životinjama“ (*Cruelty to Animals Act*). Njime je zabranjena okrutnost prema životinjama u vidu obavljanja bolnih pokusa, disekcije živih, svjesnih životinja i vivisekcije. Taj je Akt zahtijevao od svakoga tko bi želio izvoditi pokuse na životinjama posjedovanje licence koju je dodjeljivao ministar (*Secretary of State*). Uvjeti pod kojima ju je znanstvenik mogao dobiti bili su vrlo strogi i kao takvi su se zadržali sve do danas (Uvarov, 1985.). Drugi je akt britanskog parlamenta koji je regulirao korištenje laboratorijskih životinja bio donesen 1986. godine (*The*

Animals (Scientific Procedures) Act 1986, ASPA). Izvorno je bio usklađen s Direktivom EU 86/609/EEC koja je godine 2010. nadopunjena i zamijenjena Direktivom 2010/63/EU (Anonymous, 1986., Anonymous 2010.). Zanimljivost koju u svome radu iznose Ferdowsian i Beck (2011.) je da je u Sjedinjenim Američkim Državama akt sličan britanskome iz godine 1876. donesen tek 1966. godine, dakle, gotovo 90 godina kasnije nego u Europi. Radilo se o „Aktu o dobrobiti laboratorijskih životinja“ (*Laboratory Animal Welfare Act*), ali njime nisu bile obuhvaćene ptice, štakori i miševi, odnosno više od 90% životinja koje se koriste u istraživanjima. S druge strane, određeni psi i mačke tim aktom uživaju posebnu zaštitu. Međutim, američke smjernice koje nadziru istraživanja provedena uz federalnu financijsku potporu ipak nalažu zaštitu svih kralježnjaka.

Sredinom dvadesetog stoljeća izniman porast broja kako temeljnih, tako i primijenjenih istraživanja u kojima su kao modeli korištene životinje, potaknula je Sveučilišni savez za dobrobit životinja Velike Britanije (*Universities Federation for Animal Welfare, UK*) da financijski potpomogne sustavno istraživanje primjene humanih tehnika u laboratorijima. U listopadu godine 1954. na projektu su počeli raditi znanstvenici William Moy Stratton Russell i Rex Leonard Burch. Godine 1956. podnijeli su Savezu izvješće koje je potom činilo okosnicu njihove knjige „Načela humanih pokusnih tehnika“ (*The Principles of Humane Experimental Technique*) objavljene godine 1959. Postupci s laboratorijskim životinjama do tada su se uglavnom dijelili na dvije skupine: one koji se odnose općenito na postupanje s laboratorijskim životinjama koje nisu u samom pokusu i koji su razmatrani u do tada dostupnim priručnicima (posebna se pozornost pridavala uzgoju) te na one koji se odnose na postupanje sa životinjama tijekom pokusa. Navedena se

knjiga prije svega odnosi na postupanje sa životinjama u pokusu. Time su Russell i Burch postavili temelje nove primijenjene znanstvene discipline koja je trebala poboljšati postupke u radu s laboratorijskim životinjama, a ujedno i pridonijeti kvaliteti znanstvenog rada u kojem se te životinje koriste. Raščlamba metoda kojima bi se mogli isključiti nečovječni postupci prema životinjama u pokusu rezultirala je stvaranjem koncepta 3R načela: *Replacement* (zamjena), *Reduction* (smanjenje) i *Refinement* (poboljšanje), s ultimativnim ciljem sadržanim u tek jednoj riječi – „čovječnost“. Russell i Burch razlikuju dva tipa nečovječnosti u pokusima: „izravna nečovječnost“ prisutna je kada je distress, mentalno stanje poput straha i stresa, neizbježna posljedica samog postupka bez obzira koliko bio učinkovit i lišen svakih nepotrebnih aktivnosti. Ona bi se mogla izbjeći korištenjem alternativnih modela. Znači, ne mora biti nužna. O „slučajnoj nečovječnosti“ pak govore kada se distress u životinje razvija zbog slučajnih i nehotičnih usputnih postupaka koji nisu nužni za uspješnost pokusa, čak mu uglavnom štete (Russell i Burch, 1959.).

Primjena 3R načela se u knjizi navedenih znanstvenika predstavlja kao način na koji se nečovječnost prema životinjama u pokusu smanjuje ili čak u potpunosti izostaje, čime se smanjuje distress životinje, a opis ciljeva koji se nastoje postići primjenom 3R načela uglavnom se svodi na promociju dobrobiti. Pritom se distress nalazi na jednom kraju skale, a dobrobit na suprotnom (Tannenbaum i Bennet, 2015.).

Ukratko, prema Russellu i Burchu (1959.), *Zamjena* podrazumijeva korištenje znanstvenih postupaka koji modelima koji „ne osjećaju“ zamjenjuju žive kralježnjake sposobne „osjećati“. *Smanjenje* podrazumijeva smanjenje broja životinja u pokusu, do broja neophodnog za postizanje preciznih

rezultata. Pojam *Poboljšanje* obuhvaća svako smanjenje pojavnosti ili ozbiljnosti nečovječnih postupaka primijenjenih na one životinje koje će se, nakon primjene prva dva navedena načela, ipak koristiti. Podrazumijeva se, pritom, da postoje područja u kojima se navedene kategorije preklapaju.

Zamjena (engl. *replacement*), dakle, podrazumijeva odgovarajuću zamjenu životinjskog modela, ponajprije kralježnjaka, s, primjerice, kulturama stanica ili tkiva, nižim životinjskim vrstama, biljkama ili čak, ukoliko je moguće, neživim materijalom, dakle, materijalom za kojeg se pretpostavlja, odnosno, zna se da „ne osjeća“. Životinje bi, dakle, prije svega kralježnjaci, odnosno sisavci, trebale biti korištene u pokusima samo onda kada nema prikladne zamjene i kada je to znanstveno i etički opravdano. Još jedan, prilično uvjerljiv razlog koji ide u prilog nastojanju da se životinjski modeli zamjene alternativnim, je taj da istraživanja na životinjama većinom zahtijevaju utrošak značajnih sredstava, ali i utrošak vremena uloženog u osiguravanje primjene svih postojećih propisa i smjernica (Russell i Burch, 1959.). Russell i Burch (1959.) su pod načelom *Zamjena* podrazumijevali relativnu i apsolutnu zamjenu. Kao relativnu zamjenu opisuju situaciju u kojoj su životinje još uvijek nužne, međutim, u trenutačnom pokusu vjerojatno ili gotovo sigurno nisu izložene nikakvom distressu. Apsolutnom zamjenom podrazumijevaju izostanak životinje kao modela u bilo kojem stadiju pokusa. Za Russell i Burch ona predstavlja krajnji cilj, međutim, i relativnu zamjenu u kombinaciji sa smanjenjem broja životinja smatraju zadovoljavajućom. Kao postupke relativne zamjene opisuju primjenu anestetika te bezbolno usmrćivanje životinja od kojih će se potom izraditi određeni preparati. Isto tako, u relativnu zamjenu uključuju rad sa staničnim izolatima, tkivima ili

organima kralježnjaka. Prema njima, upravo tkivni izolati predstavljaju most prema apsolutnoj zamjeni u kojoj kralježnjaci više uopće ne bi bili potrebni kao pokusni modeli. Potpodjela kao apsolutnu zamjenu uključuje: korištenje metazoičnih endoparazita izvan tijela životinje domaćina (nematode, cestode, trematode), viših biljaka, mikroorganizama (protozoe, bakterije, plijesni...) i nežive fizičke i kemijske sustave, a ti su znanstveni vizionari za budućnost predvidjeli i razvoj strojeva kao modela kojima bi se zamijenili živi organizmi u različitim stadijima razvoja.

Danas se, na primjer, koriste organizmi u ranim razvojnim stadijima. Prema dosadašnjim spoznajama, oni ne bi trebali osjećati bol, patnju i stres (oplođena kokošja jaja u ranom stadiju, ikra). Potom, koriste se mikroorganizmi ili životinje za koje se pretpostavlja da to, također, ne osjećaju, poput beskralježnjaka (nematodi, kukci poput vinske mušice). Pirogeni se testiraju na krvnim stanicama ljudi. Rezultati razvoja tehnologije i znanosti danas su primjenjivi i u razvoju alternativnih pokusnih modela poput računalnih simulacija. Međutim, za razvoj tih alata ipak je nužna primjena živih životinja. Računalni čipovi (*multi-organs chips*) dizajnirani su s namjerom da oponašaju interakciju između dva ili više organa. Iako oni mogu oponašati određene procese u organizmu, nisu još u mogućnosti zadovoljavajuće oponašati složene interakcije među stanicama, organima, hormonima i enzimima. Kao alternativni model koriste se i inducirane pluripotentne matične stanice (Anonymous, 2018.a). Alternativne su metode nezamjenjive u razvijanju specifičnih vještina ljudi koji se obrazuju za rad s pokusnim životinjama (korištenje umjetnih uški glodavaca i dojezubaca (npr. kunići) za razvijanje vještine vađenja krvi iz ušne vene). Računalne simulacije i kratki filmovi također mogu učinkovito pridonijeti usvajanju i

razvoju određenih vještina (Anonymous, 2018.a). Ipak, i korištenje sofisticiranih alternativnih metoda ima svoja ograničenja, posebice u istraživanjima složenih procesa u organizmima koji dovode do razvoja neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, psihičkih bolesti ili pak autoimunih bolesti poput multiple skleroze (Anonymous, 2018.a).

Zanimljivo je da riječ „alternativno“ nije bila niti jednom spomenuta u knjizi Russella i Burcha iz 1959. godine, već ju je, a u kontekstu 3R načela i prema Russelu, uveo fiziolog David Smyth u svome djelu *Alternatives to Animal Experimentation* (1978.), a popularizirao *Fund for the Replacement of Animals in Experiment* (FRAME) u Velikoj Britaniji. FRAME-i se pripisuju i zasluge oko ponovnog otkrića i promocije Russelovog i Burchovog djela, gotovo dvadeset godina nakon prvog izdanja (Tannenbaum i Benett, 2015.).

Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) je na radionici održanoj u općini Solna u Švedskoj godine 1996., kao ključne stadije u postupku ustvrđivanja valjanosti nekog testa kao alternativne metode ustvrdila sljedeće: učinkovitost metode, mogu li se njome postići ciljevi istraživanja, ističe se nužnost pouzdanosti metode (*Reliability*) te njena biološka prikladnost (*Relevance*). Pouzdanost metode (*Reliability*) se definira kao mogućnost ponovnog dobivanja istih rezultata jednoga testa korištenjem istih standardiziranih protokola (*Reproducibility*) u različitim laboratorijima tijekom nekog vremena. Nužnost pouzdanosti (*Relevance*) testne metode podrazumijeva odnos između testa i učinka u ciljnoj životinjskoj vrsti te je li testna metoda smisljena i korisna za određenu namjenu, s točno definiranim ograničenjima (OECD, 1996.).

Smanjenje/racionalizacija (engl. *reduction*), prema Russellu i Burchu (1959.) znači smanjenje broja životinja

korištenih u pokusu, pazeći pritom da on bude statistički validan u obradi rezultata proizašlih iz istraživanja. U primjeni ovoga načela nužna je precizna strategija u planiranju i izvođenju pokusa u svim stadijima. Problem je što organizmi, unatoč svim zajedničkim karakteristikama vrste ipak nisu identični, odnosno, varijacije određenih obilježja organizama su čimbenici koji znatno utječu na primjenu navedenog načela. Dugo vremena se utjecaj varijacija nastojao izbjeći korištenjem velikog broja životinja. Razvoj statističkih modela i analiza, kao i nadzor nad varijacijama među organizmima kontrolom čimbenika koji na njih utječu pomogli su, do neke mjere, u primjeni načela smanjenja broja životinja.

Suvremena tehnologija omogućila je razvoj i uporabu postupaka kojima životinje mogu biti pregledavane neinvazivnim putem pomoću kojih podatci mogu biti prikupljeni više puta na jednoj životinji. Takvi postupci su: korištenje magnetske rezonance (MRI), tomografija emisijom pozitrona (PET) i kompjutorska tomografija (CT). Tako je korištenje suvremenih dijagnostičkih i statističkih metoda omogućilo da bude eutanaziran manji broj životinja (Anonymous, 2018.a).

Unatoč svemu navedenome, procjene znanstvenika koji se bave pitanjima etike u biomedicinskim istraživanjima su da u posljednjih nekoliko desetljeća nije bilo značajnijeg smanjenja broja životinja korištenih u pokusu (Ferdowislan i Beck, 2011.). Prema podatcima iz 2005. godine procjenjuje se da se svake godine u svijetu u pokusima i dalje koristi više od 100 milijuna životinja (Taylor i sur., 2008.).

Prema Russelu i Burchu (1959.) primjena načela „Poboljšanje“ nastupa u trenutku kada je primjena suvremenih uređaja u praksi i teoriji omogućila smanjenje broja životinja na najmanju moguću mjeru. U tome trenutku primjena navedenog načela znači preostalim

životinjama u pokusu smanjiti distres. Poboljšanje/oplemenjivanje postupaka prema životinjama podrazumijeva korištenim životinjama osigurati dobre higijenske uvjete smještaja i neprestani zdravstveni nadzor čime se značajno smanjuje rizik od infekcija i bolesti. Isto tako, taj princip uključuje pažljivo promišljanje svakog postupka tijekom pokusa, primjenu analgezije i anestezije, kao i zapošljavanje osoba koje svojim obrazovanjem i stručnošću jamče kvalitetnu primjenu i nadzor mjera kojima se nastoji smanjiti, ublažiti ili potpuno isključiti osjet boli i neugode u životinja tijekom pokusa. Tako se, na primjer, peroralna aplikacija lijekova ne mora uvijek provoditi korištenjem brizgalice već se lijek može umiješati i u hranu. Obogaćivanje okoliša također je jedan od načina primjene navedenog načela, kao i nastojanje da se primijeni način vađenja krvi koji bi bio što manje stresan za životinju (Anonymous, 2018.a).

3R načelo na izvjestan je način bilo uključeno u europsku legislativu posljednjih tridesetak godina, točnije od 1986. godine. Naime, godine 1986. Vijeće Europe usvojilo je Direktivu 86/609/EEC koja propisuje zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, između ostaloga poboljšanjem nadzora nad korištenjem laboratorijskih životinja, propisivanjem minimalnih standarda za držanje i skrb, i naglašavanjem važnosti edukacije osoblja koje skrbi o životinjama. Isto tako, Direktiva je poticala korištenje alternativnih metoda (Passantino, 2008.).

Međutim, tek je Direktiva 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe prvi puta, u Članku 4. Direktive, upotrijebila izraz „Načela zamjene, smanjenja i poboljšanja“ naglašavajući time nužnost primjene tih načela (Anonymous, 2010.).

Godine 2015. je 1,17 milijuna građana Europske unije uputilo peticiju Europskoj komisiji kojom su zahtijevali potpunu zabranu izvođenja

pokusa na životinjama. Međutim, ona je odbila taj zahtjev. U obrazloženju se između ostalog, navodi da, iako je krajnji cilj nastojanja Europske komisije upravo potpuna zabrana pokusa na životinjama, smatra da bi takva odluka trenutačno bila preuranjena. Mišljenja je da bi udovoljavanje tom zahtjevu dovelo do situacije da se mnoga istraživanja počinju provoditi izvan granica EU, u manje razvijenim zemljama s puno nižim standardima dobrobiti životinja. U svom odgovoru Europska komisija potiče na postupanje prema Direktivi 2010/63/EU, ističe nužnost primjene 3R načela te napominje da je Direktiva 2010/63/EU katalizator razvoja i primjene alternativnih pristupa, što je, na neki način, i u skladu sa zahtjevom peticije. U odgovoru se napominje da će Komisija i aktivno nadgledati usklađenost aktivnosti vezanih uz pokusne životinje s Direktivom 2010/63/EU, posebice s načelom 3R (Europska komisija, 2015.).

3R načela razvijala su se tijekom proteklih pedeset godina osiguravajući okvir za izvođenje humanih pokusnih postupaka na životinjama. Postupno su ugrađivana u nacionalna zakonodavstva koja se odnose na korištenje pokusnih životinja u znanstvenim organizacijama ili organizacijama koje novčano podupiru istraživanja na životinjama. Postala su bit etičkih izjava profesionalnih istraživačkih organizacija, knjiga i časopisa. Do danas su objavljene brojne upute i zacrtavani okviri unutar kojih bi se učinkovito nadziralo korištenje pokusnih životinja sa ciljem osiguravanja njihove dobrobiti, a većina ih se oslanjala upravo na 3R pravilo.

U Indiji, primjerice, postoji vladino tijelo *Committee for the purpose of control and supervision of Experiments on Animals* (CPCSEA) koje je osnovao parlament, a čiji korijeni sežu u daleku 1964. godinu. Komitet je ponovno aktiviran 1998. godine i dužnost mu je poduzeti sve mjere nužne kako bi se osiguralo da

životinje neće prije, tijekom ili nakon provođenja pokusa nepotrebno patiti. CPCSEA je godine 1998. u službenom glasilu Indije objavila pravila „*Breeding of and experiments on Animals (Control and Supervision) Rules 1998*“ i osim što je ustrajala u provođenju 3R načela uvela je i koncept četvrtog „R“, odnosno *rehabilitation* (oporavak). Prema tome konceptu troškovi koji proistječu iz brige o korištenim životinjama i njihovog oporavka nakon korištenja u pokusima moraju unaprijed biti uračunati u troškove pokusa te biti u suglasju i pozitivnoj korelaciji s razinom sposobnosti životinja da osjećaju (Pereira i sur., 2004., Pereira i Tettamanti, 2005.).

U svjetlu sveprisutne globalizacije, intenzivnija je i suradnja unutar znanstvenih zajednica. Kako bi rezultati dobiveni tim istraživanjima bili usporedivi, nužna je prihvaćenost i uključivanje istih standarda u brigu i korištenje pokusnih životinja u različitim znanstvenim timovima i laboratorijima s naročitim naglaskom na zaštitu dobrobiti. Podrazumijeva se da se navedeni cilj, prije svega, može ostvariti uvođenjem načela 3R.

Svjetska organizacija za zdravlje životinja (*World Organisation for Animal Health*, OIE) u *Terrestrial Animal Health Code* u poglavlju 7.8. „Korištenje životinja u istraživanjima i obrazovanju“ (*Use of Animals in Research and Education*) objavila je Standarde za korištenje životinja u navedenim aktivnostima. U njemu od svih 180 članica zahtijeva primjenu 3R načela u radu s pokusnim životinjama (Anonymous, 2011.). Razina zaštite dobrobiti životinja, unatoč nužnosti uvođenja 3R načela u svakodnevnu praksu razlikuje se od zemlje do zemlje (Anonymous, 2011.).

Bolje razumijevanje sposobnosti životinja da osjećaju bol i patnju potiče mnoge znanstvenike na detaljnije izučavanje mogućnosti humanog korištenja životinja kao pokusnih modela

(Ferdowsian i Beck, 2011.). Tako se tijekom navedenog procesa, uz 3R počinje pojavljivati još nekoliko "R" načela, a neke od njih smo već naveli u odlomku koji se odnosi na korištenje alternativnih metoda kao *reproducibility* (načelo da pokusi moraju biti ponovljivi) te *relevance* (rezultati istraživanja na jednoj vrsti ili recimo spolu životinje, moraju se moći primijeniti na drugoj, ciljnoj). Osim njih, sve veću važnost ima i *respect* (poštovanje svih uključenih u pokus prema uključenim bićima) i konačno *responsibility* (odgovornost svih osoba, bez iznimke, uključenih u provođenje pokusa) (Anonymous, 2018.a).

Vučinić i sur. (2010.) navode još i *redundancy avoidance* (izbjegavanje nepotrebnih ponavljanja) i smatraju da se načelo pogodnosti i prikladnosti (*relevance*) ne odnosi na biološku relevantnost, već na potrebu postojanja ravnoteže u pokusima *in vivo* u odnosu na opasnosti i rizik koji postoji za pokusne životinje u odnosu na stvarnu korist koja iz tog pokusa proizlazi za čovjeka. Isto tako, još dodaju i načelo koje se odnosi na pravilnost, stručnost i zakonitost pokusa (*regulation*) te navode da se taj "R" odnosi na obvezno angažiranje doktora veterinarske medicine u istraživačkoj skupini koji bi radio na sprječavanju neugodnih tjelesnih i emocionalnih iskustava u pokusnih životinja.

Prema Douglasu (2003.), odgovornost znanstvenika očekuje se u dva područja. Prvo, znanstvenici bi trebali biti odgovorni prema svojoj profesiji i od njih se očekuje razvoj znanstvene misli i određena znanstvena postignuća. S druge strane, šira, općenita odgovornost odnosi se na dužnost znanstvenika da razmatraju utjecaj svoga istraživanja izvan granica svoje znanstvene produkcije, posebice u svjetlu društvene odgovornosti.

Proklamiranju primjene i isticanja 3R načela u radu s pokusnim životinjama kritičari najviše zamjeraju što se time često

podrazumijeva sasvim dostatna razina odgovornosti znanstvenika u korištenju pokusnih životinja i upravljanju istraživanjima na životinjama pa se teme koje se odnose na etiku istraživanja na životinjama tako isključuju iz rasprava u kontekstu politike i dijaloga sa zainteresiranom javnošću, a osobito u svjetlu opravdanosti svrhe korištenja životinja u pokusima.

Godine 2010. preko 50 znanstvenika iz Švicarske i Njemačke okupilo se u Baselu i potpisalo Deklaraciju kojoj je bio cilj ujediniti napore znanstvene zajednice u nastojanjima daljnjeg unapređivanja primjene etičkih principa poput 3R načela u pokusima na životinjama sa svrhom postizanja povjerenja, transparentnosti i dobre komunikacije u osjetljivim raspravama s javnošću (Abbott, 2010.). Temeljna načela Baselske deklaracije su:

- Poštivati i štiti životinje koje su nam povjerene i ne nanositi im nepotrebnu bol, patnju ili štetu te se pridržavati najviših standarda skrbi za životinje i dizajniranju pokusa.
- Pažljivo razmotriti hoće li istraživanja na životinjama odgovoriti na važna pitanja na koja se odgovor ne može dobiti korištenjem alternativnih metoda.
- Nastojati smanjiti broj životinja koje se koriste za istraživanje i koristiti najprikladnije vrste za postizanje određenih spoznaja.
- Poticati suradnju kako bi se izbjeglo ponavljanje pokusa na životinjama.
- Primijeniti najviše standarde zaštite okoliša i javnog zdravlja.
- Uravnotežiti interese bolesnika i društva s našom odgovornošću prema životinjama pri razvoju genetski modificiranih životinja.
- Provoditi najvišu razinu obrazovanja i osposobljavanja za sve osobe koje rade s životinjama i redovito nadzirati njihovu usklađenost sa standardima.

- Prepoznati angažman znanstvenika u njihovim nastojanjima da populariziraju znanstvena dostignuća.
- Promicati dijalog o dobrobiti životinja u istraživanjima putem transparentne komunikacije s javnošću temeljene na činjenicama.
- Pružiti savjete na temelju znanstvenih znanja i stručnosti zakonodavcima o pitanjima istraživanja koja uključuju životinje i njihovu dobrobit.

Na zasadima Baselske deklaracije, godine 2011., osnovano je i Društvo Baselske deklaracije (*Basel Declaration Society*) s ciljem osvješćivanja javnosti o važnosti primjene životinjskih modela u eksperimentalnim biomedicinskim istraživanjima, poticanja komunikacije između istraživača i javnosti te šireg prihvaćanja Baselske deklaracije (Anonymous, 2018.b).

Društvo je godine 2016. objavilo opsežno istraživanje o primjeni 3R načela u laboratorijima za biomedicinska istraživanja u 26 europskih zemalja, a godine 2017. rezultati su postali javno dostupni. Među ostalim preporukama koje su proizašle iz rezultata toga istraživanja ističe se preporuka o nužnosti daljnje implementacije 3R načela i kroz edukaciju mlađih naraštaja o nužnosti njegove primjene. Potiče se međunarodna suradnja ne samo među znanstvenicima, nego i među zakonodavcima. Isto se tako preporučuje i korištenje pilot studija koje mogu znatno pridonijeti smanjenju broja životinja u pokusima (Zeller i sur., 2017.).

Obzor 2020 (*Horizon 2020*) 2020, novi je, i do sada najveći, program Europske unije za istraživanje i inovacije ikad, s gotovo 80 milijardi eura raspoloživih sredstava za razdoblje od 7 godina (2014. do 2020.). Struktura Obzora 2020. temelji se na tri glavna prioriteta: izvrsna znanost (*Excellent Science*), industrijsko vodstvo (*Industrial Leadership*) i društveni izazovi (*Societal Challenges*). Projekt "Odgovorno istraživanje i inovacije" (*Responsible Research and Innovation, RRI*) u okviru

Obzora 2020 podrazumijeva suradnju i dijalog među istraživačima, građanima, političarima, itd. tijekom cijelog procesa istraživanja kako bi se taj proces i njegovi ishodi bolje uskladili s vrijednostima, potrebama i očekivanjima društva.

Najnovija istraživanja pokazuju da bi upravo RRI platforma u budućnosti mogla imati znatan utjecaj na povećanje značaja primjene 3R na tri ključna načina: uključivanjem šireg spektra stručnjaka i javnosti u upravljanje istraživanjima na životinjama; naglašavanjem važnosti uloge znanstvenika koji istražuju na životinjama da pri korištenju laboratorijskih životinja razmotre i šire društveno značenje toga, a ne naglašavaju samo da je u korištenju laboratorijskih životinja važna tek odgovornost, te uvažavanjem i razmatranjem političkih pitanja u kontekstu istraživanja na životinjama (McLeod i Hartley, 2018.).

Zaključna razmatranja

3R načela, koja se svakodnevno i bez iznimke spominju kada se naglasak želi staviti na napore znanstvene zajednice koji se ulažu u osiguranje dobrobiti životinja u pokusu, razvojem znanosti, tehnologije, ali i evolucijom svijesti kako znanstvenika, tako i šire društvene zajednice, svakodnevno se razvijaju, tako da danas već možemo govoriti i 11R načelima. Međutim, upravo se naziv "3R načelo" koristi uvijek kada se u raspravi žele istaknuti aktivnosti vezane uz osiguranje dobrobiti životinja u pokusu, gotovo kao omaž znanstvenicima koji su postavili temelje nove primijenjene znanstvene discipline koja je trebala poboljšati postupke u radu s laboratorijskim životinjama, a ujedno i pridonijeti kvaliteti znanstvenog rada u kojem se te životinje koriste. Neosporno je da je korištenje pokusnih životinja danas, na žalost, 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 pokusnih životinja, posebno u biomedicinskim istraživanjima.

Literatura

- ABBOTT, A. (2010): Basel Declaration defends animal research. *Nature* 468 (7325), 742.
- Anon. (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 EUROPSKIH ZAJEDNICA L 358/1.
- Anon. (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.
- Anon. (2011): Chapter 7.8.: Use of Animals in Research and Education. In: Terrestrial animal Health Code. 2011^o OIE – Terrestrial Animal Health Code. 20th edition. (397-407).
- Anon. (2016): Replacement, Reduction and Refinement—the „Three Rs“. Dostupno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternative_en.htm [29.10.2018.]
- Anon. (2018a): What are 3Rs principles? © SCNAT – Swiss Academy of Sciences. Dostupno na: https://naturalsciences.ch/topics/animal_experimentation/introduction/3rs_principles [15.11.2018.]
- Anon. (2018b): Basel Declaration. Dostupno na: <https://www.basel-declaration.org> [17.8.2018.]
- BAUMANS, V. (2005): Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev. Sci. Tech.* 24, 503-513.
- BROOM, D. M. (1986): Indicators of poor welfare. *Brit. Vet. J.* 142, 524-526.
- BROWN, J. M. (2013): Ethics and Animal Welfare. In: *Laboratory Animal Welfare*. Editors: K. Bayne and P. V. Turner. Academic Press. Copyright^o 2013 Elsevier (7-15).
- DOUGLAS, H. E. (2003): "The Moral Responsibilities of Scientists (Tensions between Autonomy and Responsibility)." *American Philosophical Quarterly* 40, 59-68.
- EUROPSKA KOMISIJA (2015): Communication from the Commission on the European Citizens' initiative "Stop vivisection". Dostupno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/vivisection/en.pdf [11.11.2018.]
- FERDOWSIAN, H. R. and N. BECK (2011): Ethical and Scientific Considerations Regarding Animal Testing and Research. Published online 2011 Sep 7. doi: [10.1371/journal.pone.0024059]
- FRANCO, N. H. (2013): Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)* 19, 238-273.
- HAJAR, R. (2011): Animal Testing and Medicine. *Heart Views* 12, 42.
- HUGHES, B. O. (1976): Behaviour as an index of welfare. Proceedings of the 5th European Poultry Conference. Malta Branch: World Poultry Science Association, Sept. 5-11, 1005-1018.
- McLEOD, C. and S. HARTLEY (2018): Responsibility and Laboratory Animal Research Governance. *Sci. Technol. Human. Values* 43, 723-741.
- OECD (1996): Report of the OECD workshop on harmonisation of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. (Solna report). OECD, Paris, p. 60.
- PASSANTINO, A. (2008): Application of the 3Rs Principles for Animals Used for Experiments at the Beginning of the 21st Century. DOI: 10.5016/1806-8774.2008.v10pT27
- PEREIRA, S., P. VEERARAGHAVAN, S. GHOSH and M. GANDHI (2004): Animal experimentation and ethics in India: the CPCSEA makes a difference. *Altern. Lab. Anim.* 32 Suppl 1B, 411-415.
- PEREIRA, S. and M. TETTAMANTI (2005): Ahimsa and alternatives - the concept of the 4th R. The CPCSEA in India. *ALTEX* 22, 3-6.
- RUSSELL, W. M. S. and R. L. BURCH (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London.
- TANNENBAUM, J. and B. TAYLOR BENNET (2015): Russell and Burch's Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J. Am. Assoc. Lac. Anim. Sci.* 54, 120-132.
- TAYLOR, K., N. GORDON, G. LANGLEY and W. HIGGINS (2008): Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *ATLA - Alternatives to Laboratory Animals*, 36, 327-342.
- UVAROV, O. (1985): Research with animals: requirement, responsibility, welfare. *Lab. Anim.* 19, 51-75.
- WÜRBEL, H. (2001): Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* 24, 207-211.
- WÜRBEL, H., C. BURN and N. LATHAM (2009): Ponašanje laboratorijskih miševa i štakora. In: *The Ethology of Domestic Animals, 2nd Edition: An Introductory Text* (ed. P. Jensen). CAB International. Ponašanje domaćih životinja prema 2. engleskom izdanju. Uvodni tekst. (Urednici hrvatskog izdanja: Pavičić, Ž. i K. Matković). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (217-233).
- VUČINIĆ, M., S. TRAILOVIĆ, J. NEDELJKOVIĆ-TRAILOVIĆ, Z. TODOROVIĆ, S. VUČKOVIĆ, Z. NEŠIĆ, M. PROSTRAN, R. STOJANOVIĆ, D. OBRADOVIĆ i M. SAVIĆ (2010): Eksperimentalne životinje i eksperimentalni modeli. Urednici Vučinić, M. i Z. Todorović. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine, Medicinski fakultet, Farmaceutski fakultet. Beograd. Str. 32.
- ZELLER, R., K. A. C. MARTIN, G. RAINER and A. KRUGER (2017): Survey. 3r Principles in Biological and Biomedical Research Laboratories. The «Basel Declaration Society». Dostupno na: <https://www.basel-declaration.org> [15.8.2018.]

3R Principle for the welfare protection of animals used for scientific purposes - yesterday, today, tomorrow

Gordana GREGURIĆ GRAČNER, DVM, PhD, Assistant Professor, Damjan GRAČNER, DVM, PhD, Full Professor, Klara FUŠ, student, Željko PAVIČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia; Nataša LONČARIĆ, DVM, Senior Veterinary Inspector, Veterinary and Food Safety Directorate, Ministry of Agriculture, Zagreb, Croatia; Jadranka BUBIĆ ŠPOLJAR, DVM, PhD, Senior Advisor, School of Medicine, Zagreb, Croatia; Alenka DOVČ, DVM, PhD, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

The first written evidence of the use of animals in experiments originated in the Ancient world. Until the discovery of anaesthetics, experimental animals experienced unimaginable suffering. The first act prohibiting cruelty to animals was passed by the British Parliament in 1876. In the mid-20th century, scientists Russell and Burch in their work *The Principles of Humane Experimental Technique* laid the foundations of a new applied science discipline aimed at improving procedures in working with laboratory animals, while also contributing to the quality of the scientific work in which these animals were used. The analysis of methods to exclude inhumane treatment of animals in experiments resulted in the creation of the concept of the 3R Principle: Replacement, Reduction and Refinement, with the ultimate goal contained in a single word – humaneness. With the development of science, technology, and the evolution of consciousness within the sciences and the general public, the 3R Principle has evolved rapidly, and today has been expanded into the 11R principle, in which Reliability, Relevance, Reproducibility, Rehabilitation,

Responsibility, Respect, Redundancy avoidance, and Regulation were added to the original 3R principles. Over the past 50 years, the 3R principle has developed into a framework for performing experimental techniques on animals, and for the first time the Principles of Replacement, Reduction and Refinement have been introduced into the European Union legislation through Directive 2010/63/EU. In 2010, the Basel Declaration was adopted, aiming to unite the efforts of the scientific community with the goal for further improvement of the application of ethical principles such as the 3R principles in animal experiments with the aim of achieving positive dialogue between the scientific community and the interested public. Today, the project “European Responsibility Research and Innovation” (RRI) within the European framework programme Horizon 2020 encourages co-operation and dialogue among researchers, citizens, politicians, and others throughout the research process, to better align this process and its outcomes with the values, needs and expectations of society.

Key words: 3R principle; experimental animals; laboratory animals; welfare