Komisja Europejska

Opieka nad zwierzętami

dążenie do lepszego podejścia naukowego

DYREKTYWA 2010/63/UE
W SPRAWIE OCHRONY ZWIERZĄT WYKORZYSTYWANYCH DO CELÓW NAUKOWYCH

© Novo Nordisk

RAMY OCENY DOTKLIWOŚCI

Środowisko

Spis treści:

Dokument roboczy dotyczący ram oceny dotkliwości 1-22

Przykłady mające na celu objaśnienie procesu klasyfikacji dotkliwości, ... 24-99
bieżącej oceny i rzeczywistej oceny dotkliwości

Właściwe organy krajowe do wykonania dyrektywy 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych

Dokument roboczy dotyczący ram oceny dotkliwości

Bruksela, 11–12 lipca 2012 r.

Komisja ustanowiła grupę roboczą ekspertów ds. oceny dotkliwości procedur w celu ułatwienia wykonywania dyrektywy 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Wszystkie państwa członkowskie i główne zainteresowane organizacje zostały wezwane do wyznaczenia ekspertów, którzy będą uczestniczyć w tych pracach.

Odbyły się dwa posiedzenia grupy roboczej ekspertów ds. oceny dotkliwości: w grudniu 2011 r., które w szczególności dotyczyło genetycznie zmienionych zwierząt, i w maju 2012 r., na którym omówiono ogólne ramy oceny rzeczywistej dotkliwości procedur odczuwanej przez zwierzęta.

Niniejszy dokument powstał w wyniku pracy grupy roboczej ekspertów podczas ich dwóch posiedzeń, dyskusji z państwami członkowskimi oraz wkładu prawnego Komisji w zakresie rozumienia ram oceny dotkliwości, jej składników, uczestników i narzędzi pracy oraz metod. Niniejszy dokument został zatwierdzony przez właściwe organy krajowe do wykonania dyrektywy 2010/63/UE na ich posiedzeniu w dniach 11–12 lipca 2012 r.

Zastrzeżenie prawne:

Poniższy tekst ma służyć jako wytyczne dla państw członkowskich i innych podmiotów, na które dyrektywa ta ma wpływ, przyczyniając się do wypracowania wspólnego rozumienia przepisów zawartych w dyrektywie. Wszelkie uwagi należy rozpatrywać w kontekście dyrektywy 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Jedynie Trybunał Sprawiedliwości Unii Europejskiej jest upoważniony do interpretowania prawa UE w sposób prawnie wiążący.

SPIS TREŚCI

Powiązane artykuły dyrektywy 2010/63/UE 3
Kontekst ogólny 3
Ustalenia ogólne dotyczące oceny dotkliwości 4
Ustalenia przed rozpoczęciem badania 6
Wskaźniki dotkliwości 6
Kategorie wysokiego poziomu 7
Czynniki, które należy uwzględnić w ocenie rzeczywistej dotkliwości 8
Sposób zapewnienia spójności w ocenie i przypisywaniu rzeczywistej dotkliwości 10
Opracowywanie formularza oceny dla danej procedury 11
Spójność w ocenie rzeczywistej dotkliwości 12
Kto powinien mieć wkład w ocenę rzeczywistej dotkliwości? 13
Narzędzia do monitorowania, media i inne kwestie 13
Dodatek I Glosariusz obserwacji klinicznych 15
Dodatek II Lektura kontekstowa, wytyczne i źródła internetowe dotyczące oceniania dobrostanu zwierząt poddawanych procedurom naukowym 19

Powiązane artykuły dyrektywy 2010/63/UE

- **artykuł 4 ust. 3** „Państwa członkowskie zapewniają udoskonalenie hodowli, trzymania zwierząt i opieki nad nimi, jak również metod stosowanych w procedurach, tak aby wszelki potencjalny ból, cierpienie, stres lub trwałe uszkodzenie u zwierząt zostały wyeliminowanie lub ograniczone do minimum."
- **artykuł 15 ust. 1** „Państwa członkowskie zapewniają, aby wszystkie procedury były klasyfikowane jako »terminalne, bez odzyskania przytomności przez zwierzę«, »łagodne«, »umiarkowane« lub »dotkliwe« indywidualnie dla każdego przypadku na podstawie kryteriów przyporządkowania określonych w załączniku VIII."
- **artykuł 16 ust. 1 lit d)** „jest ona [procedura ponownego wykorzystania] zgodna z poradą weterynaryjną, z uwzględnieniem doświadczeń życiowych zwierzęcia."
- **artykuł 54 ust. 2** „Państwa członkowskie gromadzą i podają do publicznej wiadomości co roku informacje statystyczne dotyczące wykorzystywania zwierząt w procedurach, w tym informacje o rzeczywistej dotkliwości procedur oraz o pochodzeniu i gatunkach zwierząt z rzędu naczelnych wykorzystywanych w procedurach. […]"

Kontekst ogólny

W dyrektywie 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych wymaga się, aby dokonano oceny dotkliwości każdej procedury w projekcie (artykuł 15) oraz przypisano tym procedurom jedną z następujących klasyfikacji dotkliwości: „terminalna bez odzyskania przytomności przez zwierzę", „łagodna", „umiarkowana" lub „dotkliwa". Załącznik VIII obejmuje wytyczne dotyczące czynników, które należy wziąć pod uwagę podczas ustalania ewentualnego stopnia dotkliwości, i przykłady każdej kategorii dotkliwości.

W art. 54 dotyczącym sprawozdawczości wymaga się, aby dla potrzeb gromadzenia informacji statystycznych zgłaszano rzeczywistą dotkliwość bólu, cierpienia, stresu lub trwałego uszkodzenia odczuwaną przez zwierzę (w przeciwieństwie do oceny lub prognozy stopnia dotkliwości sporządzanej w momencie oceniania projektu). Ponadto rzeczywista dotkliwość jakiejkolwiek poprzedniej procedury będzie kluczowym elementem w ustalaniu, czy zwierzę można ponownie wykorzystać w dalszych procedurach (artykuł 16).

Środki te zapewniają możliwości poprawy jakości nauki i dobrostanu dzięki przyszłej ocenie wniosków projektowych, a dzięki uwzględnieniu rzeczywistego cierpienia odczuwanego przez zwierzęta powinny zapewnić większą przejrzystość i lepsze zrozumienie wpływu procedur naukowych na dobrostan zwierząt.

Główne korzyści z oceny, monitorowania, oceniania i rejestrowania rzeczywistego stopnia dotkliwości obejmują:

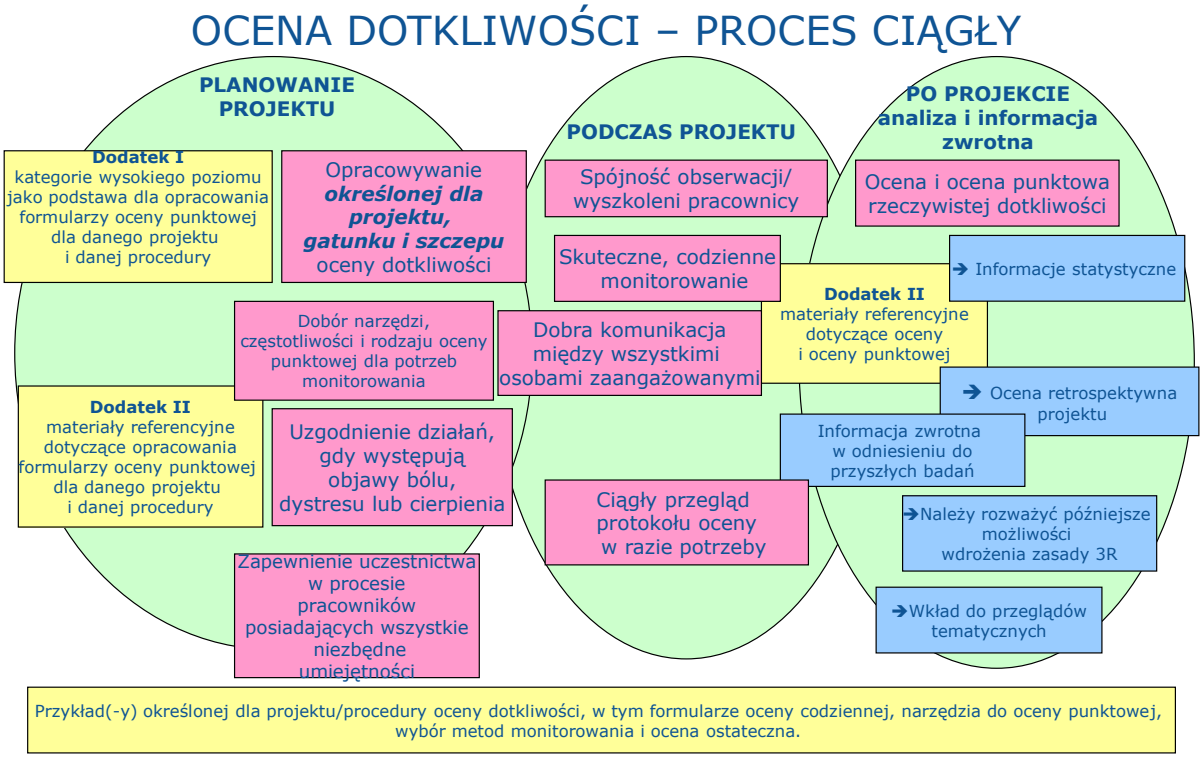
- możliwości dotyczące w szczególności wdrożenia udoskonaleń i zmniejszenia cierpienia, chociaż przyszłe dyskusje również zapewnią w zasadzie możliwość ustalenia, czy wykorzystywanie zwierząt jest niezbędne (zastąpienie), a projekt

badania jest odpowiedni, aby zminimalizować wykorzystywanie zwierząt (ograniczanie);

- poprawiony dobrostan zwierząt, np. jeżeli wcześniej cierpienie zostanie dostrzeżone i złagodzone;
- poprawioną przejrzystość, ponieważ statystyki powinny lepiej odzwierciedlać rzeczywiste koszty związane z dobrostanem zwierząt;
- usprawnioną komunikację między podmiotami odpowiedzialnymi za wykorzystywanie zwierząt, opiekę nad nimi i monitorowanie ich;
- wkład do oceny retrospektywnej projektu podczas jej przeprowadzania (artykuł 39);
- poprawioną jakość danych naukowych dzięki lepszemu dobrostanowi;
- większą wiedzę w zakresie oceniania dotkliwości i objawów klinicznych, co przyczyni się do większej spójności ocen, pod warunkiem że metody podejścia i wyniki zostaną rozpowszechnione, np. za pośrednictwem czasopism, grup dyskusyjnych i spotkań;
- wkład w szkolenia przeznaczone dla badaczy, zootechników i weterynarzy zwierząt laboratoryjnych, jeżeli wyniki są wykorzystywane w charakterze przykładów;
- informacje oparte na dowodach, które można wykorzystać w dokonywanych ocenach relacji między szkodliwością projektu i korzyściami z niego płynących a podobnymi, przyszłymi projektami.

Ustalenia ogólne dotyczące oceny dotkliwości

Ustalanie dotkliwości w ramach procedury powinno być **procesem ciągłym**, który rozpoczyna się na etapie wstępnego projektu badania, jest kontynuowany w trakcie codziennego monitorowania zwierząt w ramach badania przez cały czas trwania projektu, i zostaje zakończony oceną „rzeczywistej" dotkliwości w momencie zakończenia badania, co zapewnia możliwości wskazania dalszych udoskonaleń w odniesieniu do przyszłych badań.



Przy takim sposobie podejścia istnieją większe szanse, że zostanie uwzględniona i wdrożona w całej rozciągłości zasada 3R i że nastąpi poprawa komunikacji między wszystkimi zaangażowanymi podmiotami i spójności.

Skuteczna ocena dotkliwości wymaga:

- **podejścia „zespołowego**”, w którym wykorzystuje się informacje pochodzące od osób z różną wiedzą specjalistyczną, różnym doświadczeniem i różnymi priorytetami, np. badaczy, zootechników i pracowników sprawujących opiekę nad zwierzętami, lekarza weterynarii;
- dobrego planowania;
- odpowiedniego ustawicznego kształcenia i szkolenia całego zaangażowanego personelu;
- systemów codziennej oceny dotkliwości, które są odpowiednio dostosowane do gatunku, szczepu i projektu, w tym świadomych i zorganizowanych obserwacji zwierząt, dokonywanych w odpowiednich odstępach czasowych (np. częstotliwość rosła podczas procedur i po ich zakończeniu);
- skutecznych protokołów opartych na wiarygodnych informacjach do celów oceny zachowań i objawów klinicznych;
- analizy obserwacji w celu sporządzenia świadomej oceny charakteru i poziomu cierpienia;
- świadomości dotkliwości każdej procedury i działania, które należy podjąć, jeżeli dotkliwość zostanie osiągnięta bądź przekroczona;

- spójnego podejścia do ogólnych osądów dotyczących rzeczywistego cierpienia (łagodne, umiarkowane, dotkliwe) do celów sprawozdawczości statystycznej;
- zastanowienia się nad stopniem skuteczności wdrożenia zasady 3R oraz możliwością dokonania ulepszeń w odniesieniu do przyszłych badań.

Ustalenia przed rozpoczęciem badania

Proces mający na celu zapewnianie zminimalizowania dotkliwości podczas procedur naukowych rozpoczyna się na **etapie projektu** w trakcie ustalenia konieczności i zasadności wykorzystania żywych zwierząt do osiągnięcia celów naukowych.

- W przypadkach, w których wykorzystanie żywych zwierząt jest konieczne i uzasadnione, ważne jest, aby został wybrany odpowiedni model, a projekt badań był solidnie opracowany;
- należy zidentyfikować wszystkie aspekty badania, które mogą powodować ból, cierpienie, stres lub trwałe uszkodzenie, i rozważyć sposoby zminimalizowania ich skutków, na przykład dzięki wyszukaniu informacji w literaturze, konsultacjom ze współpracownikami, zootechnikami, weterynarzem i ciałem doradczym ds. dobrostanu zwierząt w stosownych przypadkach;
- zalecana ewentualna klasyfikacja stopnia dotkliwości przypisywana procedurom powinna być oparta na największej dotkliwości przewidywanej w odniesieniu do każdego zwierzęcia poddanego badaniu;
- należy opracować plan obserwacji zwierząt, który będzie odpowiedni dla badania i dostosowany do niego. Ujednolicona terminologia zrozumiała dla wszystkich podmiotów zaangażowanych w badanie przyczyni się do większej spójności w zakresie sprawozdawczości i interpretacji;
- ważne jest zapewnienie dostępności wystarczającej liczby wyszkolonych i kompetentnych pracowników do prowadzenia badania, monitorowania zwierząt i sprawowania opieki nad nimi.

Wskaźniki dotkliwości

Występują zachowania i objawy kliniczne, które można wykorzystać do oceny dotkliwości procedur na etapie pobytu zwierzęcia w klatce (lub zbiorniku, kojcu itp.). Terminologia stosowana do ich opisywania powinna być zrozumiała dla wszystkich osób, które wykorzystują zwierzęta, monitorują je i sprawują nad nimi opiekę. W odniesieniu do każdego systemu oceny dotkliwości konieczne jest głębokie zrozumienie prawidłowego stanu zdrowia, zachowań i dobrostanu gatunku (szczepu w stosownych przypadkach).

Celem powinno być:

- osiągnięcie jak najlepszej jakości życia zwierząt;
- zapewnienie, aby cierpienie spowodowane procedurami naukowymi zostało dostrzeżone oraz

- zminimalizowane, ale

z zachowaniem zgodności z celami naukowymi.

Każdy system oceny powinien zapewniać skuteczne wykrywanie odchylenia od prawidłowego stanu zdrowia i dobrostanu, umożliwiając obserwatorowi rejestrowanie i przekazywanie przejrzystej, spójnej oceny każdego zwierzęcia.

Można zastosować proste, hierarchiczne podejście w celu określenia protokołu oceny dotkliwości, który jest odpowiednio dostosowany do gatunku, szczepu, osobników i procedury. W procesie określania protokołu oceny na etapie przebywania zwierzęcia w klatce należy zidentyfikować wszelkie niepożądane skutki, które mogą wystąpić w ciągu całego życia zwierzęcia, w tym podczas przebywania w klatce, hodowli, sprawowania opieki nad nim i obchodzenia się z nim, oraz niepożądane skutki powstałe w wyniku procedur naukowych i ich konsekwencji. Uwzględnienie tych wszystkich niepożądanych skutków powinno umożliwić ustalenie wskaźników, które można wykorzystać do skutecznej oceny dobrostanu zwierząt podczas pobytu w klatce. Wskaźniki te należy dostosować do gatunku, szczepu i procedur eksperymentalnych, które zastosowano. Powinny one również być łatwe dla zrozumienia, zidentyfikowania i spójnego rejestrowania. Ważne jest jednak zapewnienie możliwości opisania i zarejestrowania wszystkich niespodziewanych skutków niepożądanych na przykład w postaci dowolnego tekstu.

Kategorie wysokiego poziomu

Poniżej zamieszczono listę zbioru nadrzędnych kategorii „wysokiego poziomu", które mają zastosowanie do wszystkich gatunków, jako punkt wyjścia do sporządzenia wyczerpującej listy konkretnych wskaźników w odniesieniu do każdej procedury lub każdego programu opieki nad zwierzętami. Celem jest utworzenie listy wystarczających wskaźników w odniesieniu do każdego badania w celu zminimalizowania ryzyka niewykrycia objawów cierpienia, bez potrzeby wymyślania zbyt złożonego systemu, który byłby niepotrzebnie zbiurokratyzowany i czasochłonny.

Kategorie wysokiego poziomu obejmują:

- wygląd zewnętrzny;
- funkcje organizmu;
- środowisko;
- zachowania;
- wskaźniki specyficzne dla danej procedury;
- dowolne spostrzeżenia (inne stosowne spostrzeżenia).

Wskaźniki w ramach każdej z tych kategorii można dostosować do każdego gatunku. Należy je wykorzystać do stworzenia listy obserwowanych cech charakterystycznych, które może

ocenić odpowiednio wyszkolona osoba, w celu dokonania osądu dotyczącego ogólnego stanu zdrowia i dobrostanu zwierzęcia.

Wskaźniki te należy omówić i wybrać w porozumieniu z osobą (osobami) odpowiedzialną(-ymi) za nadzór nad dobrostanem zwierząt i, w stosownych przypadkach, ciałem doradczym ds. dobrostanu zwierząt. Należy je następnie wykorzystać do opracowania systemów prowadzenia ewidencji w ramach każdego badania na etapie pobytu zwierzęcia w klatce do celów codziennej obserwacji, monitorowania i oceny.

Dodatek I zawiera przykład sposobu dalszego podziału tych kategorii wysokiego poziomu i stosowania ich w celu opracowania odpowiednich kryteriów obserwacyjnych za pomocą ogólnej terminologii opisowej.

Dodatek II zawiera informacje dotyczące wytycznych i źródeł internetowych, które mogą pomóc w opracowywaniu odpowiedniej oceny dobrostanu w odniesieniu do zwierząt poddawanych procedurom naukowym.

Czynniki, które należy uwzględnić w ocenie rzeczywistej dotkliwości

Ważne jest, aby pamiętać, że w zależności od określonej sytuacji liczba elementów może wpływać pozytywnie lub negatywnie na dotkliwość, dlatego też należy uwzględnić różnice między gatunkami.

Ocenę rzeczywistej dotkliwości należy przeprowadzić indywidualnie dla każdego przypadku, wykorzystując spostrzeżenia gromadzone w ramach codziennego monitorowania. W stosownych przypadkach można także zastosować dodatkowe parametry wymagane do celów badania, o ile są dostępne. Na przykład nieobserwowalne wskaźniki (takie jak temperatura ciała, masa ciała, parametry biochemiczne lub dane biotelemetryczne takie jak puls) mogą także być potrzebne na potrzeby badania i powinny zostać wzięte pod uwagę w ocenie dotkliwości, jeżeli mogą dostarczyć dodatkowych, odpowiednich informacji.

Rzeczywista dotkliwość, którą należy zgłosić w odniesieniu do każdego zwierzęcia, powinna odpowiadać najwyższemu poziomowi dotkliwości odczuwanemu podczas całej procedury, a nie dotkliwości odczuwanej na koniec procedury. Podobnie nie należy uznawać oceny za prosty proces addytywny, np. szereg łagodnych procedur = umiarkowana dotkliwość. Powinna ona opierać się na ogólnej ocenie tego, co odczuwają zwierzęta od rozpoczęcia procedury do jej zakończenia.

Poniższa lista zawiera przykłady tych elementów, które należy uwzględnić i rozważyć przy ocenianiu rzeczywistej dotkliwości.

Procedura, technika:

- chirurgiczna/niechirurgiczna;
- stopień i okres trwania zamknięcia;
- wstrzymanie analgezji/znieczulenia, gdy jedno z nich lub oba byłyby konieczne;

- nowy model lub procedura;
- elementy środowiskowe (w tym ograniczenia dotyczące trzymania i pokarmu/wody);
- stres/cierpienie;
- powtarzane procedury i odstępy między nimi (należy również uwzględnić częstotliwość i wspólne stosowanie interwencji „poniżej progu");
- ponowne lub ciągłe wykorzystywanie.

Gatunek, szczep, stadium rozwoju, poprzednie doświadczenie

- **powinny one być brane pod uwagę w pierwszym rzędzie – konieczne jest zrozumienie biologii i zachowań danego gatunku i danej rasy (a czasem osobnika), aby móc skutecznie przewidzieć i ocenić dotkliwość;**
- **gatunek i szczep;**
- pochodzenie zwierzęcia, np. hodowane do celów badań, zdziczałe lub dzikie;
- pochodzenie (w tym poprzednie warunki trzymania) i transport;
- genotyp, fenotyp, płeć, wiek, stan odporności;
- zachowania naturalne i biologia (np. stosunkowe znaczenie różnych zmysłów, takich jak wzrok u naczelnych i węch u gryzoni, oraz zakłócenie tych zachowań i biologii w środowisku laboratoryjnym);
- trzymanie zwierząt pojedynczo/grupowo – uzasadnienie dla trzymania zwierząt społecznych w izolacji lub oddzielania ich od ustalonych grup społecznych na krótki lub długi okres;
- rytm dzienny, np. wpływ wykonywania w czasie dnia procedur naukowych bądź czynności hodowlanych na zwierzęta prowadzące nocny tryb życia;
- oddzielenie od matki w przypadku wszystkich gatunków, w tym gryzoni;
- zdolność poznawcza, świadomość, pamięć, postrzeganie skutków procedur.

Częstotliwość, intensywność

- nie ma bezpośredniego związku między częstotliwością a dotkliwością, tj. zwiększona częstotliwość niekoniecznie musi skutkować większą dotkliwością. Wynika to stąd, że wpływ powtarzanych procedur lub technik na dotkliwość zależy od szeregu czynników, takich jak intensywność każdej interwencji, okres jej trwania, gatunek zwierzęcia i doświadczenie osobnika;
- w przypadku powtarzania interwencji istnieje możliwość aklimatyzacji, która może zmniejszyć dotkliwość, np. w przypadku naczelnych innych niż człowiek, które poddano łagodnym procedurom. Z drugiej strony powtarzanie może zwiększyć dotkliwość, np. ponieważ zwierzę oczekuje stresującej procedury, bądź występuje u niego hiperalgezja w przypadku zabiegu chirurgicznego;
- możliwość budowania pozytywnych skojarzeń lub „nagrody" po zastosowaniu procedur;

- należy zarejestrować najwyższy poziom dotkliwości, a nie dotkliwość „na poziomie odzyskiwania przytomności”.

Czas trwania skutków

- czas trwania jest *związany* z intensywnością (*i w związku z tym z dotkliwością*);
- czy możliwe jest zastosowanie wczesnego humanitarnego zakończenia lub naukowego zakończenia.

Skuteczność udoskonaleń

- odpowiednia analgezja, znieczulenie i opieka pooperacyjna;
- urozmaicenie warunków bytowania – zarówno urozmaicenie środowiska, jak i trzymanie grupowo zwierząt społecznych;
- trzymanie i hodowla zwierząt oraz sprawowanie opieki nad nimi – czy możliwe jest ich udoskonalenie zgodnie z aktualnie najlepszymi praktykami, lub czy procedura wymaga ograniczeń takich jak ograniczona swoboda przez trzymanie zwierząt w mniejszych pomieszczeniach (np. klatkach metabolicznych), podłoga siatkowa lub ekspozycja na warunki środowiskowe, które mogą powodować stres;
- przyuczanie zwierząt do współpracy, lub ułatwianie im przyzwyczajania się do procedur;
- skuteczność protokołów oceny na etapie pobytu zwierzęcia w klatce.

Skumulowana dotkliwość

- w ramach procedury, która składa się z szeregu etapów/interwencji, należy uwzględnić doświadczenie życiowe każdego zwierzęcia, dla którego ograniczenia możliwości udoskonalenia warunków bytowych lub potrzeba częstego wyjmowania z klatki, manipulowania nim, zamykania itp. mogą mieć wpływ na dotkliwość;
- poprzednie procedury w przypadku ponownego wykorzystywania;
- rozważając ponowne wykorzystanie zwierzęcia, należy uwzględnić jego doświadczenie życiowe, w tym elementy, takie jak pochodzenie (np. z wczesnego „odsadzenia”) i transport.

Sposób zapewnienia spójności w ocenie i przypisywaniu rzeczywistej dotkliwości

Wkład wniesiony na etapie projektu badań przez odpowiednich naukowców, zootechników, weterynarzy i pracowników sprawujących opiekę nad zwierzętami jest z reguły potrzebny, aby zapewnić dostępność stosownych danych umożliwiających podjęcie świadomej decyzji odnośnie rzeczywistej dotkliwości odczuwanej na koniec procedury. Ostateczne przypisanie kategorii rzeczywistej dotkliwości będzie wynikiem analizy danych z poczynionych na etapie trzymania zwierzęcia w klatce obserwacji zachowań, objawów klinicznych i innych odpowiednich parametrów.

Elementy przyczyniające się do spójności obejmują:

- uwzględnienie wiedzy specjalistycznej z różnych zakresów, różnych rodzajów doświadczeń i priorytetów – „podejście zespołowe”;
- szkolenie w zakresie wykorzystywania protokołu codziennej oceny (w tym ogólnej terminologii stosowanej do opisywania spostrzeżeń);
- wiedza specjalistyczna z zakresu zdrowia zwierząt, ich dobrostanu i zachowań;
- regularny przegląd wyników;
- komunikacja między wszystkimi podmiotami odpowiedzialnymi za prowadzenie badania i monitorowanie zwierząt (odgórna, oddolna i pozioma i wewnętrzna);
- nadzór (lokalny (np. ciało doradcze ds. dobrostanu zwierząt) regionalny, krajowy, unijny).

Należy uwzględnić następujące kluczowe kwestie w celu zapewnienia spójności w ocenie rzeczywistej dotkliwości:

Opracowywanie formularza oceny dla danej procedury

- formularze oceny, które są dostosowane do gatunku, szczepu i badania powinny być opracowywane i uzgodnione przed rozpoczęciem projektu;
- należy skutecznie wykorzystać wszelkie dostępne, stosowne informacje w opracowywaniu formularzy oceny dla danego badania, na przykład poprzednie doświadczenia, wyniki badań *in vitro* lub *in silico*, informacje zaczerpnięte z literatury, informacje z badań pilotażowych i obserwowane objawy kliniczne u ludzi lub innych zwierząt;
- informacje dotyczące parametrów, które należy obserwować, i sposobu monitorowania powinny być dostępne na etapie pobytu zwierzęcia w klatce;
- Ewentualna klasyfikacja stopnia dotkliwości będzie częściowo określała stopień zaangażowania wymagany na poziomie operacyjnym, potrzebę zastosowania podejścia zespołowego podczas monitorowania i osoby, które powinny zaangażować się w faktyczne obserwacje i proces rejestrowania. Osoby opracowujące protokół oceny dla danego badania powinny przeprowadzić lub potwierdzić przyporządkowanie rzeczywistej, ostatecznej dotkliwości;
- w zależności od złożoności badania przydatne mogą być oddzielne formularze oceny odnoszące się do oddzielnych komponentów, np. formularz dotyczący standardowej opieki operacyjnej/pooperacyjnej stosowny w połączeniu z dopasowaną oceną protokołu badania;
- w niektórych przypadkach formularze oceny dla danego badania mogą także wymagać zamieszczenia w nich informacji odpowiednich do zarządzania kolonią, np. danych dotyczących hodowli zwierząt genetycznie zmienionych i wzrostu.

Spójność w ocenie rzeczywistej dotkliwości

Ocenę rzeczywistej dotkliwości przeprowadza się na końcu procedury i wymaga to dokonania osądu ogólnej dotkliwości rzeczywiście odczuwanej przez zwierzę na podstawie codziennych ocen i z uwzględnieniem przeprowadzonych procedur.

- jedno ogólnie stosowane podejście polega na określeniu poziomów „łagodny", „umiarkowany" i „dotkliwy" w odniesieniu do każdego wskaźnika wykorzystywanego w codziennej ocenie, a następnie dokonanie oceny ich dotkliwości indywidualnie w odniesieniu do każdego przypadku;
- **podobnie jak w przypadku codziennego monitorowania konieczne jest dostosowanie rzeczywistych kryteriów oceny do procedury, gatunku i szczepu,** np. 10-procentowa utrata masy ciała będzie miała inny wpływ na zdrowie i dobrostan młodego, rosnącego szczura, dorosłej myszy z szybko rozwijającym się guzem i dorosłego psa.
- uwzględnienie okresu czasu, w jakim pojawiają się niektóre z tych wskaźników, również stanowi ważny czynnik, zwłaszcza w odniesieniu do utraty masy ciała i konsumpcji pokarmu/wody.

Ocena zostanie dokonana na podstawie zapisów z codziennej oceny z uwzględnieniem procedur przeprowadzonych na zwierzętach, okresu trwania ich niepożądanych skutków i tego, czy zwierzę zostało ponownie wykorzystane, czy nie. Chociaż będzie się to nieodłącznie wiązało z pewnym stopniem subiektywności, celem odpowiedniego szkolenia powinno być jej ograniczenie.

Przypisywanie rzeczywistej dotkliwości, w przypadkach, w których znajduje się martwe zwierzęta

- jeżeli zwierzę padło, tj. nie zostało poddane eutanazji, śmierć mogła nastąpić w wyniku procedury eksperymentalnej lub z innych niezwiązanych z nią przyczyn[1];
- rzeczywistą dotkliwość w odniesieniu do zwierząt, które padły, należy zgłosić jako „dotkliwą", chyba że można odpowiedzialnie stwierdzić, że zwierzę nie odczuwało dotkliwego cierpienia przed śmiercią;
- jeżeli jest mało prawdopodobne, że śmierć była poprzedzona dotkliwym cierpieniem, klasyfikacja rzeczywistej dotkliwości powinna odzwierciedlać doświadczenie uzyskane przed śmiercią zwierzęcia. Czynniki takie jak częstotliwość monitorowania, stosowanie analgezji itp. będą musiały zostać należycie uwzględnione;
- „(trwałe) uszkodzenie" może być odczuwane jedynie przez żywe zwierzę.

[1] Do celów sprawozdawczości statystycznej rzeczywista dotkliwość powinna głównie odnosić się do dotkliwości procedur eksperymentalnych, a nie do niezwiązanych incydentów takich jak wystąpienie choroby lub zalanie klatki wodą. Incydenty tego typu są związane z problemami zdrowotnymi lub praktykami hodowlanymi i opieką, a nie uszkodzeniami na skutek procedur, należy jednak je rejestrować, badać ich przyczyny i wprowadzać środki zaradcze, aby zapobiec ich ponownemu wystąpieniu.

Należy opracować przykłady obrazujące proces klasyfikacji dotkliwości, codziennej oceny i ostatecznej oceny rzeczywistej dotkliwości i udostępnić je środowisku naukowemu.

Kto powinien mieć wkład w ocenę rzeczywistej dotkliwości?

- obserwacja i rejestrowanie skutków stanowią często oddzielne procesy w ocenie rzeczywistej dotkliwości;
- należy wyraźnie określić zakres odpowiedzialności, aby zapewnić skuteczne codzienne monitorowanie zwierząt przy zapewnieniu odpowiedniego wsparcia i nadzoru;
- należy wdrożyć proces weryfikacji służący wspieraniu spójności, np. polegający na porównywaniu wyników ocen przeprowadzonych przez różne osoby;
- role w zakresie obserwowania i monitorowania zwierząt oraz dokonywania ocen rzeczywistej dotkliwości powinny być elastyczne i przystosowalne w zależności od złożoności i dokładności danego badania – chociaż odpowiedzialność prawna za to, aby cierpienie zostało wykryte i zminimalizowane, ciąży na osobie, której nazwisko widnieje w pozwoleniu na projekt;
- ciała doradcze ds. dobrostanu zwierząt powinny także odgrywać pewną rolę w zapewnieniu spójności na szczeblu ośrodka;
- komitety narodowe i właściwe organy również mogą przyczynić się do wspierania spójności.

Narzędzia do monitorowania, media i inne kwestie

- na etapie planowania projektu należy rozważyć zastosowanie formularzy oceny punktowej;
- formularze oceny punktowej powinny być jak najprostsze, ale jednocześnie szczegółowe stosownie do potrzeb i dostosowane do rodzaju badania;
- można wykorzystać poprzednio opracowane formularze oceny, jeżeli są one odpowiednie dla badania, gatunku i szczepu;
- elektroniczne przechowywanie rejestrów może pomóc zapewnić spójność wszystkich stosownych informacji i łatwy dostęp do nich;
- zaleca się używanie ujednoliconego języka i ujednoliconej terminologii;
- rejestrowane dane powinny być jak najbardziej obiektywne;
- należy rozważyć zalety i wady systemów obserwacji opartych na (i) wynikach punktowych i (ii) wynikach "binarnych" (w których wskaźniki oznacza się jako „obecne” lub „nieobecne”) w odniesieniu do każdego indywidualnego przypadku;

- wszystkie rodzaje rejestrów obserwacji powinny umożliwiać dodawanie dowolnego tekstu oraz określonych z góry wskaźników po to, aby można było rejestrować niespodziewane spostrzeżenia;
- niezbędne są skuteczne szkolenia wszystkich stosownych pracowników, obejmujące szczególnie ocenę dotkliwości i dobrostanu oraz techniki monitorowania;
- należy ustalić plan komunikacji, aby objęła wszystkich zaangażowanych pracowników; powinien on obejmować mechanizm szybkiego powiadamiania o niespodziewanych wynikach wszystkich odpowiednich jednostek, i w stosownych przypadkach, właściwego organu;
- monitorowanie powinno być proporcjonalne do przewidywanych skutków – procedury, które mogą spowodować „dotkliwe" cierpienie, będą z reguły wymagały częstszego i bardziej szczegółowego monitorowania;
- powinny istnieć wyraźne kryteria dotyczące interwencji, na przykład w przypadkach, w których obserwuje się szczególne parametry lub w przypadkach, w których zostaje osiągnięty z góry określony poziom cierpienia. Wszyscy zaangażowani pracownicy powinni znać te kryteria i wiedzieć, co zrobić i z kim się kontaktować w razie konieczności interwencji z nich wynikającej.

Jeżeli proces oceny dotkliwości został skutecznie wdrożony, zwierzęta i cały personel zaangażowany w opiekę nad nimi i ich wykorzystywanie odniosą korzyści na skutek poprawy dobrostanu zwierząt, wartości naukowej i przejrzystości.

Dobra komunikacja wewnętrzna i zewnętrzna dotycząca procesu oceny dotkliwości i stosowania zasady 3R przyniesie jeszcze większe korzyści.

Dodatek I

Glosariusz obserwacji klinicznych

Powodzenie każdego programu oceny dotkliwości zależy od doboru wskaźników dobrostanu, które:

• są łatwo i rozpoznawalne i wiarygodne;

• skutecznie zapewniają dobry poziom dobrostanu;

• są właściwe dla badania naukowego, gatunku i szczepu (w stosownych przypadkach);

• można je wykorzystać w praktyczny sposób i nie są zbyt uciążliwe dla zwierzęcia; oraz

• nadają się do wykorzystania dla potrzeb spójnych pomiarów, interpretacji i analiz.

Wspólne podejście do rejestrowania obserwacji klinicznych jest zatem pożądanym celem, ponieważ pomoże ono w opracowaniu spójnych podejść do klasyfikacji dotkliwości. Dzięki niemu możliwe będzie porównywanie ustaleń klinicznych dokonanych w ramach różnych badań i informowanie podmiotów zaangażowanych w ocenę dotkliwości.

Struktura obserwacji dzieli się na następujące sześć kategorii wysokiego poziomu:

wygląd zewnętrzny / funkcje organizmu / środowisko / zachowania / wskaźniki specyficzne dla danej procedury / dowolne obserwacje

Kategorie wysokiego poziomu	**Obszary, na których należy się skupić, obserwując zwierzęta**	**Szczególne wskaźniki, które należy monitorować**
Wygląd zewnętrzny	**Stan fizyczny**	Utrata/przyrost masy ciała
		Otyłe
		Chude

		Ocena punktowa za stan fizyczny, w przypadkach gdy jest dostępna
	Stan sierści i skóry	Piloreksja
		Zaniedbana/brak pielęgnacji
		Tłusta sierść
		Utrata włosów
		Odwodnienie – obwisłość skóry
		Uszkodzenie skóry – opuchlizna, świerzb, wrzód, uszkodzenie/rana
		Zabarwienie kału lub moczu
	Wydzieliny	Z oczu, nosa, układu moczowo-płciowego; zabarwione przez porfiryny u niektórych gatunków, np. u szczurów
	Oczy	Zapadnięte lub „ospałe”
		Zamknięte/pół zamknięte
		Uszkodzenie oka (np. owrzodzenie rogówki)
	Jama ustna	Ślinienie
		Wada zgryzu / przerośnięte zęby
	Inne	„Pysk wyrażający ból” – np. na pół zamknięte oczy i wybrzuszenie nosa u myszy
		Skurcze w brzuchu
		Opuchnięta cześć ciała, np. wzdęty brzuch
Funkcje organizmu	**Oddychanie**	Przyspieszony oddech (*tachypnoe*)
		Głęboki oddech (*hyperpnoea*)
		Bardzo ciężki oddech (*dyspnoe*)
		Świszczący oddech lub wydawanie innych dźwięków podczas oddychania
	Pobieranie pokarmu/wody	Zwiększone/zmniejszone
	Temperatura ciała	Podwyższona/obniżona; zmierzona temperatura ciała, w przypadkach, w których jest to możliwe (np. za pomocą mikroczipa lub urządzenia telemetrycznego, termometru kontaktowego lub bezkontaktowego); barwa kończyn u gryzoni
	Zmysły	Pogorszenie wzroku, słuchu lub równowagi

Środowisko	**Warunki bytowania zwierząt w pomieszczeniu, w tym ściółka, materiały do budowy gniazd, przedmioty urozmaicania warunków bytowania**	Obecność i konsystencja kału
		Mokra ściółka, np. z powodu poliurii
		Obecność wymiocin lub krwi
		Wykorzystywanie przez zwierzę przedmiotów urozmaicania warunków bytowania, np. materiałów do budowy gniazd, kostek do żucia
Zachowania	**Interakcje społeczne**	Odchylenie od standardowego usposobienia – interakcje z nastawieniem pełnym obaw/agresywnym wobec innych zwierząt, lęk (np. wyraźne odruchy ucieczki, ukrywanie się)
		Osamotnione lub odsunięte od innych osobników z grupy społecznej
	Zachowania niepożądane	Zachowania powtarzalne/stereotypowe
		Wyrywanie sierści (gryzonie); *trichotillomania*
		Zwiększona agresja wobec ludzi lub innych zwierząt
	Pozycja i poruszanie się	Nienaturalna postawa
		Nienaturalny chód, kulawizna, brak ruchu / letarg / niechęć do poruszania się w przypadku stymulacji
		Nieskoordynowane ruchy
		Pozycja skulona, przechylona głowa
	Inne	Drżenie
		Napady/konwulsje/skurcze
		Wydawanie odgłosów; spontaniczne lub wywołane *(Uwaga – odgłosy wydawane przez niektóre gatunki, np. gryzonie, to ultradźwięki, zatem wydawanie odgłosów słyszalnych ma szczególne znaczenie. Odgłosy wydawane przez króliki również są ogólnie niesłyszalne dla człowieka, chyba że zwierzę jest w stresie).*
Wskaźniki specyficzne dla danej procedury	Identyfikuje się je na podstawie indywidualnego projektu, jego potencjalnych niepożądanych skutków i	Na przykład, w modelu EAE mogą one obejmować utratę sprawności ogona, osłabienie kończyn tylnych, osłabienie kończyn przednich, paraliż, utratę funkcji pęcherza

	przewidywanych wskaźników tych skutków.	
Dowolne obserwacje	Schemat oceny dotkliwości powinien zawsze obejmować możliwość zapisania każdej obserwacji niespodziewanego, negatywnego wpływu na dobrostan.	

Dodatek II

Lektura kontekstowa, wytyczne i źródła internetowe dotyczące oceniania dobrostanu zwierząt poddawanych procedurom naukowym

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, dostępne na stronie http://www.tinyurl.com/65ez5vh.

Materiały szkoleniowe Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA), zob. http://www.ahwla.org.uk/index.html.

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*., zob. http://www.ccac.ca/ i kliknij na zakładkę „Three Rs microsite", następnie wyszukaj „welfare assessment" (ocena dobrostanu) (strona dostępna w językach angielskim i francuskim).

Categorising the severity of scientific procedures on animals – Summary and reports from three round-table discussions, pod redakcją Jane A. Smith i Maggy Jennings w imieniu Boyd Group i RSPCA, lipiec 2004 r.
Opublikowane przez departament ds. zwierząt laboratoryjnych RSPCA.

Grupa robocza ds. sprawozdawczości objawów klinicznych u zwierząt laboratoryjnych FELASA (2012) – (w prasie).

Instytut badań na zwierzętach laboratoryjnych (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals,* Waszyngton D.C., National Academies Press.
Instytut badań na zwierzętach laboratoryjnych (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals,* Waszyngton D.C., National Academies Press, zob. http://dels.nas.edu/animal_pain/.

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, i in., (2006) „Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research", [w:] *Laboratory Animals* **40,** s. 323–340.

Wspólna grupa robocza ds. udoskonalenia (2011) „A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals", [w:] *Laboratory Animals* **45,** s. 1-13.

Leach MC i in. (2008), „Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare", [w:] *Animal Welfare* **17,** s. 161-170.

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*, zob. http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment.

Krajowa Rada ds. Zdrowia i Badań Medycznych (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals,* Canberra: Rząd Australii, zob. http://www.nhmrc.gov.au i wyszukaj „pain and distress" (ból i stres).

Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation,* [w:] OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19, Paryż, OECD.

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, i in., „Assessing the welfare of genetically altered mice", pełna wersja dostępna na stronie http://www.nc3rs.org.uk/gamice. Streszczenie opublikowano w *Laboratory Animals* **40,** s. 111–114.

Workman P i in., (2010) „Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research", [w:] *British Journal of Cancer* **102**, s. 1555-1577, dostępne na stronie http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed.

1.2 Proponowane przydatne czasopisma do dalszej lektury

Applied Animal Behaviour Science	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
Animal Technology and Welfare	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
Animal Welfare	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
Contemporary Topics in *Laboratory Animal Science* i *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
Lab Animal i *Lab Animal* *Europe*	http://www.labanimal.com/laban/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
Laboratory Animals	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Proponowane słowa kluczowe dla potrzeb związanych z wyszukiwaniem literatury

Następujące słowa kluczowe są pomocne przy wyszukiwaniu informacji na temat oceny dotkliwości:

wpływ	ocena stosunku szkodliwości projektu i korzyści z niego płynących	wskaźniki dodatnie	skala dotkliwości
dobrostan zwierząt	humanitarne zakończenie	dobrostan pozytywny	zmiany zachowań charakterystyczne dla stanów chorobowych
cierpienie zwierząt	potrzeby	jakościowa ocena zachowań	stres
ocena	obiektywna ocena	jakość życia	cierpienie
dyskomfort	ból	udoskonalenie	ocena dobrostanu
dystres	ocena bólu	formularze oceny punktowej	wskaźnik dobrostanu
ocena uszkodzenia	pomiar bólu	system oceny punktowej	wyniki w zakresie dobrostanu

Odniesienia związane z klasyfikacją rzeczywistej dotkliwości

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*, Canadian Council on Animal Care, dostępne na stronach http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines (wersja w j. angielskim) i http://www.ccac.ca/fr_/normes/lignes_directrices (wersja w j. francuskim).

Grupa Robocza ds. Bólu i Dystresu FELASA (1994) „Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs", [w:] *Laboratory Animals* **28**, s. 97–112.

Jones HRP, Oates J i Trussell BA (1999) „An applied approach to the assessment of severity", [w:] Hendriksen CFM. & Morton DB (red.), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research.* Proceedings of the International Conference, 22–25 November 1998, Zeist, The Netherlands; Royal Society for Medicine Press Ltd., Londyn, s. 40–47.

LASA /APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*, dostępne na stronach http://www.lasa.co.uk/publications.html.

Morton, DB i Hau J (2011) Rozdział 18: „Welfare assessment and humane endpoints", [w:] *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*, Hau J i Schapiro, SJ (red.), CRC Press LLC, Stany Zjednoczone Ameryki, s. 535–572.

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J i Thompson P (2004) „Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement", [w:] *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**, s. S1:1–S1:94.

Wolfensohn S i Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*, Blackwell Publishing Ltd, Oksford (wydanie 4. w przygotowaniu).

(Wszystkie strony dostępne dnia 24 maja 2012 r.)

Przykłady mające na celu objaśnienie procesu klasyfikacji dotkliwości, bieżącej oceny i rzeczywistej oceny dotkliwości

Bruksela, dnia 11 stycznia 2013 r.

W *dokumencie roboczym dotyczącym ram oceny dotkliwości* sporządzonym przez grupę roboczą ekspertów Komisji Europejskiej oraz zatwierdzonym przez właściwe organy krajowe do wykonywania dyrektywy 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych na ich posiedzeniu w lipcu 2012 r. zalecono opracowanie przykładów obrazujących „proces klasyfikacji dotkliwości, bieżącej oceny i ostatecznej oceny rzeczywistej dotkliwości" oraz udostępnienie tych przykładów środowisku naukowemu.

Kontynuując przedmiotowe prace, grupa robocza ekspertów przedstawiła szereg przykładów, aby pokazać, w jaki sposób omówiony w *dokumencie roboczym* proces można zastosować w odniesieniu do różnych procedur. Przykłady te mają ułatwić właściwym organom, użytkownikom, zootechnikom, lekarzom weterynarii i wszystkim pozostałym odpowiednim pracownikom skuteczne przewidywanie i łagodzenie bólu, cierpienia i stresu, a także jednolitą ocenę podczas wykonywania procedur. Niniejszy dokument został zatwierdzony przez właściwe organy krajowe do wykonania dyrektywy 2010/63/UE na ich posiedzeniu w dniach 23–24 stycznia 2013 r.

Niezwykle istotne jest, aby podczas korzystania z przedstawionych tu przykładów uwzględniono szereg ważnych czynników:

- zakłada się, że **dobra praktyka jest wdrażana** we wszystkich aspektach działalności w odniesieniu do utrzymywania, hodowli i opieki; procedur doskonalenia, kształcenia i szkoleń, oceny kompetencji, pozyskiwania i wykorzystywania bieżących danych dotyczących zastępowania, ograniczania i doskonalenia oraz projektowania badań doświadczalnych;

- formularze oceny punktowej dołączone do przykładów mają **uzupełniać, a nie zastępować osąd wyszkolonych, kompetentnych i empatycznych pracowników**; celem jest umożliwienie dokonywania bardziej systematycznych i obiektywnych obserwacji, prowadzenia ewidencji i ocena cierpienia, nie odsuwając przy tym na dalszy plan profesjonalnego osądu;

- każdy przykład dotyczy **hipotetycznej, ale realistycznej sytuacji**; nie byłoby właściwe uwzględnienie wszystkich szczegółowych informacji, które dostępne są w praktyce, ale uwzględniono informacje szczegółowe **wystarczające do wyjaśnienia sposobu stosowania procesu**;

- zgodnie z treścią *dokumentu roboczego* niezwykle istotne jest, aby **przemyśleć i dostosować ocenę dotkliwości** w odniesieniu do gatunku, szczepu i procedury przeprowadzanej w ośrodku indywidualnego użytkownika; w związku z powyższym grupa ekspertów **zdecydowanie odradza** wykorzystywanie tabel i systemów formularzy oceny w przedstawionej formie, **nawet do celów wykonywania tych samych procedur**; należy dokonywać regularnych przeglądów wszystkich protokołów dotyczących oceny dotkliwości i w stosownych przypadkach wprowadzać do nich zmiany;

- w przedstawionych tu przykładach także są dokonywane korekty z uwagi na zwiększanie wiedzy dotyczącej wskaźników bólu, cierpienia i stresu oraz z uwagi na zmiany w podejściu do oceny i klasyfikacji dotkliwości; każdy przykład opatrzono datą; w sprawie aktualizacji należy odwiedzić stronę internetową Komisji Europejskiej http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm;

- **pożądane byłby informacje zwrotne** dotyczące użyteczności tych przykładów, wraz z propozycjami dalszych procedur, które należy uwzględnić; prosimy o przesyłanie uwag na adres env-laboratory-animals@ec.europa.eu.

Spis treści:

Model 1 – badania onkologiczne 27

1a) – Utrzymywanie linii ludzkich komórek nowotworowych u bezwłosych myszy z obniżoną odpornością 28

1b) – skuteczność nowych środków farmaceutycznych w odniesieniu do rozwoju nowotworu 34

Model 2 – eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) u myszy 43

Model 3 – zapalenie stawów 55

Model 4 – udar 67

Model 5 – produkcja przeciwciał poliklonalnych u królików 80

Model 6 - tworzenie i utrzymanie zwierząt zmienionych genetycznie 87

Model – GeneA$^{tm1a(Funding)Lab}$ 89

Model – Tg(GeneB)^{Labcode} 95

Model – GeneC$^{tm1a(Funding)Lab}$ 97

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 1 – badania onkologiczne (1a i 1b)

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

1. Modele zwierzęce w badaniach onkologicznych (1a i 1b)

Kontekst ogólny: Ocena nowych leków antynowotworowych *in vivo*

Nowotwory stanowią główną przyczynę zgonów w krajach rozwiniętych, a starzenie się społeczeństwa w nieunikniony sposób będzie prowadziło do wzrostu obciążenia chorobami. W 2010 r. prawdopodobieństwo zgonu z powodu nowotworu przed siedemdziesiątym rokiem życia wynosiło w UE jeden do siedmiu. W związku z tym istnieje potrzeba opracowania nowych, skuteczniejszych produktów leczniczych zwalczających nowotwory. Korzyści obejmą obniżenie wskaźnika śmiertelności z powodu nowotworów i poprawę jakości życia osób, które zachorują na nowotwór w przyszłości.

Poza modelami komputerowymi i metodyką *in vitro*, jak na przykład badaniami kultury komórkowej w procesie opracowywania nowych leków przeciwko nowotworom, wykorzystywane są obecnie modele zwierzęce. Po potwierdzeniu selektywności i aktywności związków chemicznych metodą *in vitro* na zwierzętach testuje się tylko te związki chemiczne, które wykazują korzystne właściwości. Obszerniejsze badania skuteczności poprzedzone są badaniami tolerancji na małych grupach zwierząt w celu określenia maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) i schematu dawkowania.

Dotkliwość badania dla zwierząt będzie zależała od modeli i celu badania. Przykładowo utrzymywanie linii komórek nowotworowych nie powinno mieć istotnego wpływu na dobrostan zwierząt, pod warunkiem, że we wszystkich aspektach działalności stosuje się dobrą praktykę, jak na przykład odpowiednie monitorowanie zwierząt i przyjęcie wczesnego humanitarnego zakończenia. Badania mające na celu ocenę nowych metod leczenia w modelach przerzutowych prawdopodobnie stanowią istotniejszy powód do zaniepokojenia z uwagi na rozwój wielu nowotworów i możliwość negatywnego wpływu cytotoksycznych produktów leczniczych.

Opublikowano już szereg wytycznych w sprawie dobrostanu i wykorzystywania zwierząt w badaniach nad nowotworami, na przykład w *British Journal of Cancer* (Workman i in., 2010 r.). W powyższych wytycznych przedstawiono szczegółowy przegląd różnych dostępnych zwierzęcych modeli nowotworów, ich wpływ na zwierzęta i sposoby minimalizowania cierpienia zwierząt.

W niniejszym dokumencie przedstawiono dwa przykłady ilustrujące wykorzystywane w onkologii modele zwierzęce zaliczone do różnych klas dotkliwości.

Źródła

Workman i in. (2010 r.), „Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research", *British Journal of Cancer* (2010 r.) 102(11), s. 1555–1577; darmowy dostęp pod adresem http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf.

1 a) – Utrzymywanie linii ludzkich komórek nowotworowych u bezwłosych myszy z obniżoną odpornością

Niektóre linie ludzkich komórek nowotworowych nie mnożą się skutecznie w hodowli komórkowej i niekiedy zachodzi potrzeba scharakteryzowania i utrzymania linii ludzkich komórek w ksenogennym modelu *in vivo*.

Badanie

30 samcom bezwłosych myszy należących do szczepu BALB/c zostanie wstrzyknięte podskórnie w lewy bok 10^3 zawiesiny komórek HCT 116 w 0,1 ml soli fizjologicznej. Zwierzęta będą trzymane grupowo w klatkach z wentylacją indywidualną (IVC) zawierających ściółkę i materiały do budowy gniazd. Ocena dobrostanu zwierząt będzie przeprowadzana codziennie, a zwierzęta będą ważone co 4 dni. Osobniki będą co drugi dzień poddawane badaniu palpacyjnemu na obecność guzów, a każdy wykryty guz będzie również mierzony co drugi dzień za pomocą suwmiarki. 15. dnia zwierzęta zostaną poddane eutanazji celem pobrania guzów nowotworowych.

Wstępna ocena i uwagi dotyczące określonych udoskonaleń oraz humanitarnego zakończenia

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Punkty końcowe**
Utrzymywanie myszy mających obniżoną odporność	Zwierzęta narażone są na infekcje.	Zwierzęta przebywają w klatkach z wentylacją indywidualną, praktyki hodowlane są dostosowane tak, aby minimalizować ryzyko skażenia. Zwierzęta trzymane są w grupie, zapewnia się im urozmaicone warunki środowiskowe w celu ograniczenia stresu. Hodowla i opieka będą poddawane analizie w przypadku wystąpienia jakichkolwiek oznak stresu, agresji lub zaburzeń zachowawczych.	Każde zwierzę wykazujące oznaki złego stanu zdrowia zostanie uśmiercone.
Podskórne wstrzyknięcie komórek nowotworowych	Przejściowy dyskomfort związany z wstrzyknięciem.	Wstrzyknięcia dokonuje się tylko raz. Wstrzyknięta zostanie odpowiednia ilość (maksymalnie 0,2 ml).	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny, jeżeli po wstrzyknięciu zaobserwuje się stres lub dyskomfort w stopniu większym niż łagodny i nie nastąpi

		Zwierzęta będą ściśle monitorowane w okresie następującym bezpośrednio po wstrzyknięciu.	natychmiastowa poprawa stanu zdrowia (bardzo rzadkie przypadki).
Rozwój nowotworu	Może powodować dyskomfort lub mieć wpływ na naturalne zachowania lub poruszanie się. Guz nowotworowy może zostać zainfekowany lub może przekształcić się we wrzód (ale nie powinien powodować przerzutów).	Pomiar guza nowotworowego dokonywany będzie co drugi dzień. Program monitorowania obejmie uważną obserwację postawy i chodu, zwierzęcia oraz rozmiaru i stanu guza nowotworowego.	Zwierzę zostanie uśmiercone, jeżeli guz przekształci się we wrzód lub będzie zakłócał naturalne zachowanie, postawę lub sprawność ruchową zwierzęcia, bądź też jeżeli jego średnica przekroczy 1,2 cm (Workman i in. 2010 r.).

Analiza

Przewiduje się, że zwierzęta odczują jedynie **ŁAGODNY** dyskomfort i będą uśmiercane, jeżeli jakiekolwiek problemy związane z ich zdrowiem lub dobrostanem spowodują zaostrzenie tego stanu.

W związku z tym właściwe jest uznanie ewentualnego stopnia dotkliwości za ŁAGODNY.

W końcowej części opisu tego modelu podano przykład wypełnionego formularza obserwacyjnego.

Obserwacje kliniczne

Opracowano podstawowy formularz oceny punktowej, który w szczególności dotyczy rozmiaru guza, masy ciała zwierzęcia, jego postawy i chodu, ponieważ nie przewiduje się wystąpienia zbyt wielu innych objawów klinicznych. Formularz zawiera wolne miejsce, aby umożliwić odnotowywanie nieoczekiwanych objawów klinicznych w postaci dowolnego tekstu. Wpisanie do formularza „NWA” (nie wykryto anomalii) stanowi potwierdzenie, że zwierzęta zostały przebadane i że nie stwierdzono żadnych anomalii. Przykład przedstawiono poniżej.

Wyniki

- u żadnego zwierzęcia nie odnotowano znaczącej utraty masy ciała;
- u 5 zwierząt nie odnotowano rozwoju guza nowotworowego;
- rozwój guzów nowotworowych na boku nastąpił u 25 zwierząt. Guzy nie zakłócały naturalnego zachowania zwierząt, a ich rozmiar wynosił nie więcej niż 1 cm w dniu 14, w którym zwierzęta uśmiercono zgodnie z protokołem badań dotyczącym pobierania guzów;
- w obrębie jednej klatki wśród zwierząt odnotowano agresywne zachowanie oraz oznaki walki; jedno zwierzę miało rany po ugryzieniach na ogonie i grzbiecie i zostało umieszczone w oddzielnej klatce, jego rany dezynfekowano miejscowo każdego dnia do momentu ich wyleczenia, a zwierzę było trzymane w takich warunkach do zakończenia procedury.

Ocena rzeczywistej dotkliwości procedur

- 29 zwierząt ukończyło badanie, odczuwając najwyżej lekkie cierpienie związane z wstrzyknięciem i rozwojem nowotworów.
  W odniesieniu do tych zwierząt rzeczywistą dotkliwość procedur oceniono na **ŁAGODNĄ**; u jednego zwierzęcia stwierdzono rany po ugryzieniach, które skutecznie wyleczono. Zwierzę to odczuło pewne dodatkowe cierpienie będące wynikiem agresji, ale nie miało to związku z procedurą. Powyższe incydenty opanowano w sposób skuteczny i zminimalizowano cierpienie. Mimo że stopień cierpienia, jakie to zwierzę odczuło był umiarkowany, ponieważ incydent ten nie miał związku z procedurą, rzeczywistą dotkliwość procedury, którą należy zarejestrować, oceniono na **ŁAGODNĄ**.

Przykładowy formularz obserwacyjny (wypełniony dla przypadku hipotetycznego)

Rozwój guza nowotworowego u bezwłosych myszy – formularz procedur i obserwacji				
Klatka 1 – myszy o nr 1–5				
Data	Procedura	Rozmiar guza nowotworowego (cm)	Waga (g)	Obserwacje kliniczne – **należy uważnie kontrolować postawę i chód.**

28.02	Wstrzyknięcie podskórne		1–21 2–22 3–21 4–22 5–22	Nie wykryto żadnych oznak problemów związanych z dobrostanem po wstrzyknięciu.
01.03				Nie wykryto anomalii (NWA).
02.03	Badanie palpacyjne			NWA
03.03				NWA
04.03	Badanie palpacyjne		1–21 2–22 3–21 4–22 5–22	NWA
05.03				NWA
06.03	Badanie palpacyjne			NWA

07.03				Pewne zachowania agresywne; brak widocznych ran.
08.03	Pomiar guza	1–0,1 2–0,1 3–0,1 4 – nie wykryto guza 5–0,2	1–21 2–22 3–21 4–22 5–22	U myszy nr 1 stwierdzono rany po ugryzieniach na ogonie i grzbiecie i poddano je miejscowemu leczeniu; zwierzę przeniesiono do oddzielnej klatki. Pojedynczo trzymanemu zwierzęciu zapewniono skrzynkę do budowy gniazda, ale usunięto ją z klatki, w której przebywają pozostałe cztery myszy, na wypadek, gdyby była ona powodem agresji.
09.03				Zdezynfekowano rany myszy nr 1, stwierdzono prawidłowe gojenie się tych ran; nie wykryto żadnych oznak agresji pośród pozostałych zwierząt.
10.03	Pomiar guza	1–0,2 2–0,1 3–0,1 4 – nie wykryto guza 5–0,2		Zdezynfekowano rany myszy nr 1.
11.03				Zdezynfekowano rany myszy nr 1

12.03	Pomiar guza	1–0,4 2–0,3 3–0,3 4 – nie wykryto guza 5–0,5	1–22 2–22 3–21 4–21 5–23	Rany u myszy nr 1 zagoiły się, wstrzymano proces ich dezynfekowania.
13.03				NWA
14.03	Eutanazja i pobór nowotworu			

1 b) skuteczność nowych środków farmaceutycznych w odniesieniu do rozwoju nowotworu – procedura wielostopniowa

Badanie to ma na celu ocenę skuteczności nowych leków w ograniczaniu lub zatrzymywaniu rozwoju komórek nowotworowych. Aby rozpocząć leczenie nowotwór musi być w pełni wykształcony (zazwyczaj średnica wynosząca 0,5 cm jest wystarczająca) – z uwagi na czas trwania badania niektóre guzy nowotworowe mogą osiągnąć średnicę 1,2 cm, zazwyczaj w grupie kontrolnej nośnika. Cytotoksyczne produkty lecznicze mogą mieć negatywny wpływ na dobrostan zwierząt.

30 samcom bezwłosych myszy należących do szczepu BALB/c zostaną wstrzyknięte wolno rozwijające się komórki nowotworowe (0,1 ml). Ocena dobrostanu zwierząt będzie dokonywana codziennie, a zwierzęta będą ważone raz w tygodniu przez 3 kolejne tygodnie. Rozwój guza nowotworowego zostanie zmierzony za pomocą suwmiarki w dniu 7 i 14; w dniu 20 guzy nowotworowe zostaną ponownie zmierzone, zwierzęta

zostaną poddane randomizacji i rozpocznie się ich leczenie w formie dootrzewnowych wstrzyknięć dokonywanych dwa razy dziennie przez 7 dni.

Wstępna ocena prospektywna i uwagi dotyczące określonych udoskonaleń oraz humanitarnego zakończenia

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Humanitarne zakończenie**
Utrzymywanie myszy mających obniżoną odporność	Zwierzęta narażone są na infekcje.	Zwierzęta przebywają w klatkach z wentylacją indywidualną, praktyki hodowlane są dostosowane tak, aby minimalizować ryzyko skażenia. Zwierzęta trzymane są w grupie, zapewnia się im urozmaicone warunki środowiskowe w celu ograniczenia stresu. Hodowla i opieka będą poddawane analizie w przypadku wystąpienia jakichkolwiek oznak stresu, agresji lub zaburzeń zachowawczych.	Każde zwierzę wykazujące objawy współistniejącej choroby zostanie uśmiercone.
Podskórne wstrzyknięcie komórek	Przejściowy dyskomfort związany z wstrzyknięciem.	Wstrzyknięcia dokonuje się tylko raz.	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny, jeżeli po

nowotworowych		Wstrzyknięta zostanie odpowiednia ilość (maksymalnie 0,2 ml). Zwierzęta będą ściśle monitorowane w okresie następującym bezpośrednio po wstrzyknięciu.	wstrzyknięciu zaobserwuje się stres lub dyskomfort w stopniu większym niż łagodny i nie nastąpi natychmiastowa poprawa stanu zdrowia (bardzo rzadkie przypadki).
Rozwój nowotworu	Może powodować dyskomfort lub mieć wpływ na naturalne zachowania lub poruszanie się. Nowotwór może zostać zainfekowany lub może przekształcić się we wrzód (ale nie powinien skutkować przerzutami).	Bieżąca obserwacja zwierząt, regularne monitorowanie ich ogólnego stanu zdrowia i rozwoju nowotworu. Program monitorowania obejmie uważną obserwację postawy i chodu zwierzęcia oraz rozmiaru i stanu guza nowotworowego. Interwencje o charakterze farmaceutycznym rozpoczną się po osiągnięciu przez guz średnicy 0,5 cm (mierzonej za pomocą suwmiarki).	Zwierzę zostanie uśmiercone, jeżeli guz przekształci się we wrzód lub będzie zakłócał naturalne zachowanie, postawę lub sprawność ruchową zwierzęcia, bądź też jeżeli jego średnica przekroczy 1,2 cm (Workman i in. 2010 r.).
Dootrzewnowe wstrzyknięcie nowego środka farmaceutycznego	Przejściowy dyskomfort związany z wstrzyknięciem. Cytotoksyczne produkty lecznicze mogą powodować biegunkę, utratę	Zwierzęta będą ściśle monitorowane w okresie następującym bezpośrednio po wstrzyknięciu.	Zwierzęta będą uśmiercane, jeżeli utrata wagi przekroczy 20 % pierwotnej masy ciała. Uśmiercane będą także zwierzęta, które nie będą przyjmowały pokarmu lub będą

	masy ciała, anoreksję lub letarg.	Maksymalna objętość wynosi 10 ml/kg dziennie przez 7 dni. Stosowane będą minimalne poziomy dawek (określane po przeprowadzeniu badań dotyczących zakresu dawek). Do oceny dobrostanu stosowany będzie kliniczny system punktowy.	miały biegunkę przez ponad 48 godzin. Górna granica klinicznej oceny punktowej będzie wyznaczała humanitarne zakończenie.

Analiza
Z uwagi na rozmiar guza, zwiększone prawdopodobieństwo owrzodzenia, częstotliwość wstrzyknięć i negatywny wpływ zastosowanych produktów leczniczych, w tym przypadku należy uznać ewentualny stopień **dotkliwości za UMIARKOWANY**.

Czy dotkliwość procedur mogłaby zostać zaklasyfikowana jako ŁAGODNA?

Najprawdopodobniej nie, chyba że cele naukowe mogłyby zostać osiągnięte przy wcześniejszym humanitarnym zakończeniu, przykładowo ograniczając maksymalny rozmiar guza. Oznaczałoby to także wstrzykiwanie produktów leczniczych w dawkach niepowodujących żadnych znaczących szkodliwych skutków klinicznych. W takich okolicznościach, stwierdzenie ŁAGODNEJ dotkliwości mogłoby być właściwe.

Obserwacje kliniczne

W końcowej części opisu tego modelu podano przykład formularza obserwacyjnego i przykładowy formularz oceny.

Wyniki

Spośród 30 samców myszy należących szczepu BALB/c do oceny skuteczności użyto 25 osobników; 10 zwierząt otrzymało produkt leczniczy B w dawce H, kolejne 10 otrzymało produkt leczniczy B w dawce X, a 5-ciu podano produkt leczniczy C w dawce Y.

Ocena rzeczywistej dotkliwości procedur

- u 3 zwierząt nie wykryto nowotworów i zostały one poddane eutanazji, ponieważ nie mogły zostać wykorzystane do celów eksperymentu – **ŁAGODNA**;
- u 2 zwierząt wystąpiło owrzodzenie w miejscu wstrzyknięcia nowotworu zanim rozpoczęto leczenie i zostały one uśmiercone – **UMIARKOWANA**;
- u 10 zwierząt otrzymujących produkt leczniczy B w dawce H wykształciły się guzy nowotworowe, które były względnie małe, nie stwierdzono znaczącej utraty masy ciała ani żadnych objawów klinicznych – **ŁAGODNA**;
- u 7 zwierząt otrzymujących produkt leczniczy B w dawce X stwierdzono zmniejszenie się rozmiarów guzów nowotworowych, 15-procentową utratę masy ciała i występowanie luźnych stolców, ale trzymano je do zakończenia eksperymentu – **UMIARKOWANA**;
- u 3 zwierząt otrzymujących produkt leczniczy B w dawce X stwierdzono zmniejszenie się rozmiarów guzów nowotworowych, 15-procentową utratę masy ciała, występowanie luźnych stolców, anoreksję i głęboki letarg; zostały one uśmiercone w dniu 25 w sposób humanitarny – **DOTKLIWA**;
- u 5 zwierząt otrzymujących produkt leczniczy C w dawce Y stwierdzono ciągły rozwój guza nowotworowego, zwiększenie masy ciała i brak innych objawów klinicznych oprócz rozwoju guza. Zwierzęta te poddano eutanazji w momencie, w którym rozmiar guza przekroczył 1,2 cm – **UMIARKOWANA.**

Przykładowy formularz oceny punktowej

Nr zwierzęcia				
Data	01.06	02.06	03.06	04.06
Wygląd zewnętrzny				
Masa ciała				
Stan skóry				
Funkcje organizmu				
Duszność lub				

szybkie oddychanie				
Przyjmowanie pokarmu				
Środowisko				
Luźne stolce lub biegunka				
Krew w biegunce				
Zachowania				
Kontakt z człowiekiem				
Agresja				
Nienaturalny chód				
Nienaturalna postawa				
Niechęć do poruszania się				
Wskaźniki specyficzne dla danej procedury				
Rozmiar guza				

nowotworowego				
Owrzodzenie guza				
Guz ograniczający ruch				
Łączna ocena punktowa				
Inne spostrzeżenia				

Przykłady klinicznej oceny punktowej

Wygląd zewnętrzny	**Ocena punktowa**
Masa ciała	
Utrata masy ciała o 5–10 %	1
Utrata masy ciała o 11–15 %	2
Utrata masy ciała o 16–20 %	3
Utrata masy ciała o 20 % i więcej	HEP
Stan sierści	

Lekko zaniedbana skóra	1
Nieznaczna piloreksja	2
Znaczna piloreksja	3
Funkcje organizmu	
Szybkie oddychanie (przyspieszony oddech)	1
Duszność (trudność w oddychaniu)	3
Środowisko	
Luźne stolce lub biegunka	1
Krew w biegunce	HEP
Zachowanie	
Napięcie i nerwowość podczas kontaktu	1
Znaczny stres podczas kontaktu, np. dygotanie, wydawanie odgłosów, agresywność	3
Sprawność ruchowa	
Nieznacznie nienaturalny chód / nienaturalna postawa	1

Bardzo nienaturalny chód / nienaturalna postawa	2
Istotne problemy w poruszaniu się / niechęć do poruszania się	3
Bezruch > 24 godz.	HEP
Wskaźniki określone dla procedury	
Rozmiar guza > 1,2 cm	HEP
Owrzodzenie guza	HEP
Guz ograniczający ruch	HEP

Działania	
Ocena 1	Skorygować częstotliwość monitorowania
2	Rozważyć dodatkową pielęgnację, np podawanie większej ilości płynów
4	Skonsultować się z lekarzem weterynarii
6	Zastosować humanitarne zakończenie

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 2 – eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) u myszy

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

Kontekst ogólny

Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) jest wykorzystywane do modelowania różnych aspektów stwardnienia rozsianego (MS) u gryzoni i naczelnych. Stwardnienie rozsiane jest wielopostaciowym, złożonym zaburzeniem neurologicznym występującym u młodych osobników dorosłych. Objawy tego zaburzenia obejmują reakcje zapalne, demielinizację i utratę aksonów. Modele zwierzęce wykorzystywane są do badań nad patofizjologią tej choroby, a także do oceny potencjalnych strategii ochronnych lub leczniczych, w tym immunomodulacji, ochrony immunologicznej, regeneracji aksonów i odbudowy otoczki mielinowej. Wielopostaciowy charakter stwardnienia rozsianego oraz fakt, że choroba ta ma wiele stadiów, wymaga stosowania odpowiednich modeli w celu uzyskania odpowiedzi na pytania dotyczące różnych stadiów tej choroby.

EAE polega na stymulowaniu aktywności systemu immunologicznego ukierunkowanej na otoczkę mielinową, co wywołuje reakcję zapalną w ośrodkowym układzie nerwowym i otwarcie bariery krew-mózg. Może powodować to poważną chorobę neurologiczną w modelu zwierzęcym, po której powinna nastąpić częściowa poprawa stanu zdrowia w trakcie trwania pierwszej przewlekłej postaci remitująco-nawracającej. Objawy tej postaci obejmują reakcję zapalną i odwracalną demielinizację. Po upływie 9–10 tygodni choroba zwierzęcia osiągnie postać postępującą, której objawem jest przewlekła demielinizacja i utrata aksonów. Na tym etapie choroby możliwa jest ocena różnych strategii leczniczych. Należy uważnie określić humanitarne i naukowe zakończenia badania, uwzględniając jego cele.

Źródła

Emerson, M.R. i in., (2009 r.), „Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design”, *Comparative Medicine* **59:** s. 112-128.
Miller, S.D.i in., (2010 r.) „Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse”, *Current Protocols in Immunology,* **88:** 15.1.1–15.1.20.
Weissert, R. (ed) (2012 r.) „Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – Models, Disease Biology and Experimental Therapy”, opublikowany przez In Tech, DOI: 10.5772/1190, http://www.intechopen.com.
Wolfensohn, S. i in.(w trakcie opracowywania) „Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis”.

Badanie

W tym przykładzie EAE zostanie wywołane się u czterech samców i czterech samic myszy Biozzi ABH (szeroko stosowanego szczepu, który uważa się za posiadający wysoką wartość translacyjną) w celu dokonania oceny potencjalnej metody leczenia stwardnienia rozsianego. Na wstępnym etapie planowania projektu użytkownik bierze pod uwagę każde ewentualne niepożądane zdarzenie w odniesieniu do zwierząt oraz ustala potencjalne przyczyny cierpienia, omawiając je z zootechnikami, personelem sprawującym opiekę nad zwierzętami i lekarza weterynarii. Przeprowadzili oni badania nad udoskonaleniami, które są realizowane w ramach projektu. Myszy będą umieszczone w grupach społecznych złożonych z czterech osobników tej samej płci. Szczególna uwaga będzie przywiązywana do bezpośredniego otoczenia, ponieważ zwierzęta z EAE charakteryzują się znacznymi zaburzeniami ruchu. W klatkach należy zapewnić pełną podłogę, ściółkę z trocin, odpowiednie schronienia i materiały do budowy gniazd oraz kostki do żucia. Zwierzętom zostanie podany adiuwant wywołujący reakcję zapalną celem wywołania EAE, po czym będą monitorowane podczas okresu rekonwalescencji oraz w trakcie trwania przewlekłej postaci remitująco-nawracającej (9–10 tygodni). Po osiągnięciu postaci postępującej, dokonana zostanie ocena potencjalnych związków leczniczych u myszy podczas trwającego trzy tygodnie badania.

Wstępna ocena i uwagi dotyczące określonych udoskonaleń oraz humanitarnego zakończenia

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	Punkty końcowe
Wielokrotne wstrzyknięcie adiuwantu wywołującego reakcję zapalną	Dyskomfort lub ból związany z pierwszym wstrzyknięciem. Możliwe wystąpienie reakcji w miejscu wstrzyknięcia skutkujące podrażnieniem lub dyskomfortem.	Małe dawki zostaną wstrzyknięte w wielu miejscach pod skórą (z wyjątkiem poduszek łap i podstawy ogona). Skład adiuwantu i nośnika został opracowany tak, aby powodować jak najmniejsze podrażnienia. Zwierzęta będą monitorowane po wstrzyknięciu.	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny, jeżeli po wstrzyknięciu zaobserwuje się ból lub stres w stopniu większym niż przejściowy umiarkowany.
Wywołanie EAE – początkowa dotkliwa choroba neurologiczna, po której następuje poprawa stanu zdrowia	Paraliż, który może powodować stres lub niepokój: utratę sprawności ogona, osłabienie kończyn tylnych, utratę sprawności ruchowej, paraliż kończyn, zaburzenia czynności układu moczowego (nietrzymanie moczu lub zatrzymanie moczu).	Czynności układu moczowego będą monitorowane poprzez codzienne kontrolowanie pęcherza. W razie potrzeby pęcherz będzie opróżniany ręcznie w przypadkach, w których dojdzie do zatrzymania moczu (monitorując uważnie pod kątem wszelkich oznak bólu lub stresu występujących po	Należy zastosować humanitarne zakończenie w przypadku każdego z następujących kryteriów: • obustronny paraliż przednich kończyn trwający dłużej niż 24 godz.; • obustronny paraliż tylnych kończyn utrzymujący się maksymalnie do 5 dni;

		opróżnieniu pęcherza). Jeżeli zwierzęta nie trzymają moczu, klatka będzie często sprawdzana w celu wykrycia wilgotnej ściółki i wilgotnych materiałów do budowy gniazd, które należy zastąpić w razie potrzeby świeżymi materiałami. Zwierzętom zapewni się odpowiednie schronienia i materiały do budowy gniazd.	• wszelkie samookaleczenia; • trwałe zatrzymanie moczu / niemożność opróżnienia pęcherza; • niedowład (utrata możliwości poruszania się, nieznaczny paraliż) • utrata masy ciała o 35 %* • zwierzęta nie jedzą i nie piją przez dłużej niż 24 godz. od wystąpienia choroby; • zwierzęta nie wracają do zdrowia po wywołaniu u nich EAE w ciągu 3 tygodni od wystąpienia klinicznych objawów choroby; • kliniczne objawy współistniejącej choroby, np. kulenie się.
	Znaczna utrata masy ciała (np. nawet o 35 %)	Zwierzętom zapewni się stały dostęp do wody i pokarmu w pojemnikach umieszczonych na podłodze klatki. Masa ciała i stan zdrowia będą monitorowane codziennie i częściej poddawane ocenie punktowej (w razie potrzeby) w przypadku wystąpienia objawów utraty masy ciała. Zwierzętom zapewni się namoczony pokarm i pojemniki z płynami, wraz z podskórnym	

		podawaniem płynów uzupełniających w razie potrzeby.	
Kliniczna postać remitująco-nawracająca	Przewlekłe zaburzenia neurologiczne	Wszelkie czynniki stresogenne będą ograniczane, w tym także poziomy hałasu. W razie potrzeby temperatura otoczenia zostanie podniesiona przy użyciu poduszek grzewczych, dodatkowej ściółki i dodatkowych materiałów do budowy gniazd	
Podanie nowego środka leczniczego (w trakcie trwania postaci postępującej)	Dyskomfort w związku z wstrzyknięciem Skutki uboczne lub brak skuteczności środka leczniczego	Zwierzęta będą uważnie monitorowane po wstrzyknięciu ocenianego środka leczniczego	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny, jeżeli zaobserwuje się któregokolwiek z przedstawionych powyżej objawów lub jeżeli wystąpią jakiekolwiek poważne skutki uboczne w związku z podaniem nowatorskiego środka leczniczego

* Utrata masy ciała o 35 % stanowi skrajny punkt końcowy badania w ocenie skuteczności, który wymaga wiarygodnego uzasadnienia naukowego. W tym przypadku znaczna utrata masy ciała jest nieunikniona, a zwierzęta mogą odzyskać zdrowie po utracie masy ciała przy zapewnieniu odpowiedniego wsparcia, np. dodatkowego ciepła i pokarmu, w tym w razie potrzeby karmienia ręcznego. Punkt końcowy wyznaczony 35-procentową utratą masy ciała został ustalony do celów powyższego badania, jako sposób na ograniczenie wymogu

wywoływania EAE u kolejnych zwierząt niepoddanych eksperymentowi (naïve animals), który byłby znacznie wyższy i z bardziej „konwencjonalnym” punktem końcowym (np. 20 %).

Analiza

Ewentualny stopień dotkliwości należy uznać za DOTKLIWY, ponieważ przewiduje się, że procedura ta spowoduje poważne naruszenie ogólnego dobrostanu zwierząt i ich ogólnego stanu zdrowia.

Czy dotkliwość procedur mogłaby zostać uznana za UMIARKOWANĄ?

Mimo że ewentualny stopień dotkliwości procedur w tym modelu należy zawsze uznawać za DOTKLIWY ze względów przedstawionych powyżej, retrospektywnie można uznać tę dotkliwość za UMIARKOWANĄ, w zależności od czasu trwania badania i realizacji wczesnego humanitarnego zakończenia, co wskazano w powyższym punkcie.

Obserwacje kliniczne

Podczas badania myszy były monitorowane przez zootechników i pracowników sprawujących nad nimi opiekę przy użyciu systemu formularzy klinicznej oceny punktowej, dostosowanego do protokołu w wyniku dyskusji przeprowadzonych z użytkownikami, zootechnikami, pracownikami sprawującymi opiekę nad zwierzętami i lekarzem weterynarii. Monitorowaniem objęto parametry dotyczące masy ciała, stanu sierści, sprawności ogona, kontroli nad pęcherzem, obrócenie się grzbietem do góry, chodu, niedowładu i jego zaawansowanych objawów (postawa spoczynkowa na boku; częściowy paraliż; przyspieszone, powolne lub głębokie oddychanie). Ponieważ projekt obejmował wykonywanie dotkliwych procedur, zwierzęta były uważnie monitorowane, a użytkownicy regularnie dokonywali bieżących przeglądów dotyczących dotkliwości procedur, konsultując je z ciałem doradczym ds. dobrostanu zwierząt, zootechnikiem i wyznaczonym lekarzem weterynarii. Poniżej przedstawiono objaśniający przykładowy formularz oceny punktowej.

Przykład stosownego formularza oceny punktowej

Tabela. Formularz klinicznej oceny punktowej myszy z EAE

Data:					
Wygląd zewnętrzny					
Masa ciała					
Stan sierści					
Funkcje organizmu					
Kontrola nad opróżnianiem pęcherza					
Sprawność ogona					
Oddychanie					
Środowisko					
Stan gniazda					
Zachowanie					
Zachowania społeczne					

Chód					
Wskaźniki specyficzne dla danej procedury					
Postawa spoczynkowa na boku					
Czas prostowania postawy					
Niedowład					
Paraliż					
Pozostałe spostrzeżenia					
(Dowolny tekst)					

Uwagi: każdy wskaźnik oceniono zgodnie z systemem oceny przedstawionym w tabeli poniżej, w której (na przykład) wprowadzono by do tabeli „1” w polu „sprawność ogona”, w przypadku zaobserwowania rzadszego podnoszenia ogona oraz „2” w polu „stan gniazda”, w przypadku zaobserwowania nieporządku w gniazdach.

Tabela. System oceny wskaźników formularza klinicznej oceny punktowej dotyczącej EAE

Ocena punktowa:	**1 = łagodna**	**2 = umiarkowana**	**3 = dotkliwa**
Utrata masy ciała	Do 10 %	10 %–20 %	20 %–35 %
Stan sierści	Sierść lekko zaniedbana.	Brak oznak pielęgnacji.	Znaczna/długotrwała piloreksja.
Kontrola nad opróżnianiem pęcherza – nietrzymanie moczu	Dowody wskazujące na pewną utratę kontroli, np. niewielkie ilości moczu w gnieździe.	Bardziej wyrazisty „wyciek” moczu.	Nietrzymanie moczu.
Kontrola nad opróżnianiem pęcherza – zatrzymanie moczu	Pęcherz może być badany palpacyjnie ale jego opróżnienie następuje podczas kontaktu.	Opróżnienie pęcherza wymaga zwiększonego wysiłku.	Zwierzę nie jest w stanie samodzielnie oddać moczu; oznaki dyskomfortu/stresu podczas ręcznego opróżniania lub bezpośrednio po takim opróżnieniu.
Sprawność ogona	Rzadsze podnoszenie lub podwijanie ogona	Utrata sprawności w dalszej połowie ogona	Utrata sprawności w całym ogonie.
Oddychanie: przyspieszone, powolne lub głębokie oddychanie	W niewielkim stopniu.	Umiarkowanie.	W znacznym stopniu.
Stan gniazda	Niewielki nieporządek.	Próba budowy gniazda, ale niezorganizowana.	Brak gniazda.

Zachowania społeczne	Nie oczekuje się zmiany przy umiarkowanym cierpieniu; ocenę rozpoczyna się od oceny 2.	Ograniczone interakcje z innymi zwierzętami.	Znacznie ograniczone interakcje; zwierzę zachowuje się pasywnie.
Chód	Niezdarny.	Zwierzę powłóczy jedną kończyną tylną.	Zwierzę powłóczy obiema kończynami tylnymi.
Postawa spoczynkowa na boku	Nie oczekuje się zmiany przy łagodnym lub umiarkowanym cierpieniu; ocenę rozpoczyna się od oceny 3.	Nie oczekuje się zmiany przy łagodnym lub umiarkowanym cierpieniu; ocenę rozpoczyna się od oceny 3.	Występuje.
Czas prostowania postawy	Zwierzę obraca się powoli po ułożeniu go na grzbiecie.	Znaczne trudności w obróceniu się grzbietem do góry.	Zwierzę nie może obrócić się grzbietem do góry w ciągu 5 sekund po ułożeniu go na grzbiecie.
Niedowład	Zwierzę powoli odwodzi kończyny przednie po ułożeniu go na grzbiecie.	Zwierzę ma ograniczoną możliwość odwodzenia kończyn przednich po ułożeniu go na grzbiecie.	Zwierzę nie odwodzi kończyn.
Częściowy lub całkowity paraliż	Nie oczekuje się zmiany przy łagodnym lub umiarkowanym cierpieniu; ocenę rozpoczyna się od oceny 3.	Nie oczekuje się zmiany przy łagodnym lub umiarkowanym cierpieniu; ocenę rozpoczyna się od oceny 3.	Występuje.

Ocena rzeczywistej dotkliwości procedur

Na zakończenie procedury dokonano analizy formularza oceny punktowej w odniesieniu do każdego osobnika, aby ocenić punktację wskaźników i ich zmiany w czasie.

- u dwóch myszy odnotowano utratę masy ciała o 8 % po wywołaniu EAE, lekko zaniedbaną sierść oraz powolne odwodzenie kończyn, ale uzyskały one ocenę „2" po uwzględnieniu wszystkich pozostałych wskaźników w odniesieniu do pierwszych 5 dni trwania projektu. Następnie ich wyniki przyjęły wartość „1" lub „0" w odniesieniu do każdego wskaźnika w trakcie stadium remitująco-nawracającego oraz podczas badań leków; dotkliwość = **UMIARKOWANA;**
- trzy myszy straciły 22 %–32 % masy ciała i uzyskały kombinację ocen „3", „2" i „1" w trakcie stadium remitująco-nawracającego oraz podczas badań leków; dotkliwość = **DOTKLIWA;**
- jedna mysz straciła 37 % masy ciała w trakcie stadium po wywołaniu choroby i została uśmiercona w sposób humanitarny; dotkliwość = **DOTKLIWA;**
- dwie myszy straciły odpowiednio 15 i 18 % masy ciała i uzyskały kombinację ocen „2" i „3" dla wszystkich pozostałych wskaźników w odniesieniu do pierwszych 4 dni badania. Następnie uzyskały kombinację ocen „1" i „2" w trakcie stadium remitująco-nawracającego oraz podczas badań leków; dotkliwość = **DOTKLIWA.**

Nie zaobserwowano paraliżu, a ocena sposobu oddychania zwierząt przebywających w klatkach okazała się zbyt trudna, w związku z czym oba te wskaźniki zostały usunięte z formularzy wyników. W polu przeznaczonym na dowolny tekst odnotowywano często, że zwierzęta spędzały więcej czasu w schronieniach, co stanowiło wczesną oznakę cierpienia, w związku z czym wskaźnik ten dodano do formularzy do celów przyszłych projektów.

U 6 zwierząt dotkliwość procedur sklasyfikowano jako **DOTKLIWĄ**, a u 2 zwierząt dotkliwość procedur sklasyfikowano jako **UMIARKOWANĄ**.

Możliwości dalszego stosowania zasady 3R

Po dokonaniu oceny rzeczywistej dotkliwości, użytkownicy przeprowadzili konsultacje ze współpracownikami i przeszukali literaturę pod kątem dalszych udoskonaleń. Zidentyfikowano następujące dodatkowe udoskonalenia:

- karmienie zwierząt wysokoenergetycznym pokarmem uzupełniającym, takim jak galaretka i mleko zagęszczone, przed podaniem adiuwantu;
- stosowanie mniejszej dawki adiuwantu;

- stosowanie alternatywnego protokołu badań, aby ograniczyć czas trwania projektu.

Przedmiotowe udoskonalenia dodano do protokołu w celu dalszych badań z zamiarem porównania rzeczywistych poziomów dotkliwości aby sprawdzić, czy udoskonalenia te były skuteczne.

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 3 – zapalenie stawów

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

Kontekst ogólny

Zwierzęce modele zapalenia stawów wykorzystywane są do badania patogenezy tej choroby oraz do oceny potencjalnych produktów leczniczych przeciwko zapaleniu stawów przeznaczonych do użytku klinicznego. Istotne kryteria wyboru modelu obejmują zatem podobieństwo morfologiczne do choroby ludzi i zdolność modelu umożliwiającą przewidywanie skuteczności ocenianych związków leczniczych u ludzi.

Najczęściej wykorzystywane zwierzęce modele reumatoidalnego zapalenia stawów obejmują: adiuwantowe zapalenie stawów u szczurów, kolagenowe zapalenie stawów typu II u szczurów i zapalenie stawów wywołane antygenami u kilku gatunków (Bendele, 2001 r.). Najczęstszym miejscem wstrzyknięcia jest podstawa ogona, ponieważ skutkiem takiego wstrzyknięcia jest pożądana reakcja immunogenna, chociaż w literaturze odnotowano także inne miejsca wstrzyknięcia. Istnieje także znaczna różnorodność szczepów pod względem podatności, dotkliwości i opóźnień w wywoływaniu zapalenia stawów. Przykładowo podatność szczepów zmienionych genetycznie na rozwój zapalenia stawów może być modyfikowana (wzmacniania lub tłumiona) w zależności od skutków zmian w genach. W przypadku często wykorzystywanych i w związku z tym dobrze zweryfikowanych zwierzęcych modeli zapalenia stawów wystąpienie choroby będzie możliwe do przewidzenia, a techniki oceny będą prawdopodobnie dobrze zdefiniowane i scharakteryzowane. W przypadku takich modeli wielokrotna ocena, w tym analiza chodu i wykorzystanie filamentów von Freya, może być stosowana w miejsce pojedynczych pomiarów obserwacyjnych.Należy zauważyć, że należy przeprowadzać regularne przeglądy dostępnych szczepów, protokołów i udoskonaleń, aby dokonać wyboru jedynie tych, które są najbardziej odpowiednie w odniesieniu do rozwiązania kwestii naukowej podnoszonej osobno dla każdego przypadku (Joe i in., 1999 r.).

Model omówiony w tym przykładzie przedstawia kolagenowe zapalenie stawów typu II u szczurów, mogące powodować dotkliwe cierpienie. W związku z tym przedstawienie istotnego uzasadnienia naukowego dotyczącego korzystania z tego modelu jest warunkiem bezwzględnym. Szczury uodparnia się przeciwko heterologicznemu kolagenowi typu II, powodując zmiany patologiczne podobne do zmian obserwowanych w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów u ludzi (Bendele, 2001 r.). Wywołane zapalenie wielostawowe charakteryzuje się znacznym zniszczeniem chrząstki powiązanym z osadzaniem się kompleksu immunologicznego na powierzchniach stawowych, resorpcją kości i przerostem okostnej, a także umiarkowanym lub poważnym zapaleniem błony maziowej i zapaleniem okołostawowym.

Źródła

Bendele, A.M., „Animal models of rheumatoid arthritis", *J Musculoskel Neuron Interact* 2001 r., 1(4): s. 377-385
Jasemian, Y. i in. (2011 r.), „Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography", *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4):** s. 469-477
Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L., „Animal models of rheumatoid arthritis", *Current Rheumatology Reports* 1999 r., 1, s. 139-149

Badanie

W tym przykładzie zapalenie stawów zostanie wywołane u 18 samców i 18 samic szczurów szczepu Lewis poprzez wielokrotne wstrzykiwanie niekompletnego adiuwantu Freunda (FIA, *Freund's Incomplete Adjuvant*) i kolagenu. Miejscem wstrzykiwania będzie podstawa ogona. Codzienne leczenie rozpocznie się po upływie 10 dni (D10), po rozwinięciu się zapalenia stawów i będzie kontynuowane każdego dnia przez kolejne 14 dni (do D24). Celem tego badania będzie ocena przypuszczalnych środków leczniczych. Dokonano przeglądu opublikowanych wcześniej danych dotyczących powiązanych związków w celu sprawdzenia, czy zastosowanie analgezji miałoby niekorzystny wpływ na cele naukowe i stwierdzono, że mogłoby to stanowić czynnik zakłócający eksperyment. W związku z tym analgezja nie zostanie zastosowana w czasie rozwoju zapalenia stawów, ani w odniesieniu do grupy kontrolnej, natomiast szczególną uwagą objęte zostaną niefarmakologiczne metody uśmierzania bólu (np. udoskonalenia hodowli) celem złagodzenia cierpienia.

Wszystkie zwierzęta będą codziennie obserwowane i ważone oraz oceniane przy pomocy ogólnego formularza klinicznej oceny punktowej, a także zostaną przebadane w dniu 0 (przed pierwszym wstrzyknięciem) i w dniu 10 (przed rozpoczęciem leczenia), w dniu 13, 16, 20 i 24. Badania obejmą pośredni pomiar zaburzeń dotyczących funkcji fizycznych, takich jak średnica stawów (mierzona za pomocą suwmiarki) i kliniczną ocenę punktową przeprowadzaną zgodnie z systemem oceny punktowej dotyczącym zapalenia stawów. Humanitarne zakończenie zostanie zastosowane w oparciu o kliniczną ocenę punktową (zob. poniżej).

Ocena nowych farmaceutycznych środków leczniczych w modelu zapalenia stawów u szczurów (kolagen typu II)

DOTKLIWA dotkliwość procedur

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Punkty końcowe**
Podskórne wstrzyknięcia bydlęcego kolagenu typu II w niekompletnym adiuwancie Freunda (FIA) w podstawę ogona dokonywane maksymalnie trzykrotnie	Stres związany z ograniczeniem ruchu. Przejściowy ból, umiarkowana opuchlizna w miejscu wstrzyknięcia i uczucie dyskomfortu trwające od jednego do dwóch dni. Możliwe, jednak bardzo mało prawdopodobne dzięki zastosowaniu FIA, wystąpienie owrzodzenia skóry.	Empatyczna postawa i właściwe obchodzenie się ze zwierzętami podczas wykonywania procedur. Wybór standardowej dawki i postaci użytkowej w celu zminimalizowania opuchlizny i bólu.	W przypadku nieustępującego owrzodzenia skóry lub wdania się infekcji, zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny.
Rozwój zapalenia stawów (D0–D10)	Dyskomfort, ból, niepełnosprawność i stres; u zwierzęcia mogą występować objawy złego stanu zdrowia, w tym nieefektowny wygląd, brak apetytu, niechęć do poruszania się, utrata masy ciała, opuchlizna stawów, wydawanie słyszalnych odgłosów podczas kontaktu ze zwierzęciem.	Uważne monitorowanie kliniczne przy użyciu ogólnego formularza klinicznej oceny punktowej, zwiększenie częstotliwości monitorowania w momencie wystąpienia objawów klinicznych (zazwyczaj około D8–D10). Zapewnienie dodatkowej miękkiej ściółki i materiałów do budowy gniazd w trakcie trwania badania.	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny, jeżeli osiągnięte zostaną określone wcześniej wyniki oceny klinicznej w odniesieniu do humanitarnego zakończenia (zob. tabela poniżej).

		Zapewnienie zwierzętom łatwego dostępu do wody i pokarmu (np. na podłodze klatki) w trakcie trwania badania. Zastosowanie systemu klinicznej oceny punktowej dotyczącej zapalenia stawów, który pozwala na ocenę stopnia opuchlizny i liczby stawów dotkniętych chorobą.	
Podanie środków farmakologicznych (w grupie badanej i kontrolnej, dwa razy dziennie) w drodze podskórnego lub dootrzewnowego wstrzyknięcia **(D10–D24)**	Przejściowy dyskomfort związany z wstrzyknięciem. Na podstawie wcześniejszych danych otrzymanych z badań nad zwierzętami oczekuje się, że środki farmakologiczne nie spowodują działań niepożądanych.	Codzienne, uważne monitorowanie przy użyciu ogólnego formularza klinicznej oceny punktowej.	W przypadku wystąpienia istotnych skutków niepożądanych zastosuje się humanitarne zakończenie.
Ocena wpływu środków farmakologicznych na dotkliwość zapalenia stawów (D0, D10, D13, D16, D20 i D24)	W zależności od zastosowanej metody zwierzę może odczuć pewien dodatkowy, przejściowy ból lub dyskomfort np. w związku z zastosowaniem włókien von Freya, użyciem suwmiarki, koniecznością kontaktu ze zwierzęciem.	Skrupulatne kliniczne monitorowanie. Częstotliwość monitorowania należy ograniczyć (do minimum spójnego z celami naukowymi) do momentu poprawy stanu zdrowia zwierzęcia.	Zob. tabela poniżej.

Uwaga: przed rozpoczęciem badania należy omówić i uzgodnić system klinicznej oceny punktowej dotyczący zapalenia stawów z badaczem, lekarzem weterynarii, zootechnikiem i pracownikami sprawującymi opiekę nad zwierzętami.

Analiza

W konsekwencji prawdopodobieństwa wystąpienia znaczących skutków klinicznych u zwierzęcia, które mogą utrzymywać się przez szereg tygodni, należy uznać ewentualny stopień dotkliwości powyższych procedur za **DOTKLIWY**.

Czy dotkliwość procedur mogłaby zostać uznana za UMIARKOWANĄ?

Możliwość ograniczenia dotkliwości do umiarkowanej zależy od celu badania. Przykładowo w przypadku częstego i szczegółowego monitorowania zwierząt oraz w przypadku, gdy nie ma możliwości wprowadzenia wczesnego humanitarnego zakończenia (np. w momencie wystąpienia kulawizny lub po okresie łagodnej kulawizny w jednej kończynie, bądź też przy zastosowaniu metod obrazowania *in-vivo* w celu wykrywania wczesnych zmian w patologii stawów), możliwe jest sklasyfikowanie dotkliwości procedury jako UMIARKOWANA. Takie wczesne humanitarne zakończenie (np. zakończenie badania w dniu 6 po wykonaniu obrazowania) jest możliwe w przypadku projektów, których celem jest badanie wczesnych zmian zapalnych. Leczenie profilaktyczne (rozpoczynane przed pełnym rozwojem zapalenia stawów) przy użyciu nowych środków farmaceutycznych, mających silne działanie przeciwzapalne i tłumiących rozwój całkowitego zapalenia stawów, może także prowadzić do ograniczenia dotkliwości do dotkliwości **UMIARKOWANEJ**. Rodzaj badania zobrazowanego w tym przykładzie ma jednak na celu ocenę leczenia całkowicie rozwiniętego zapalenia stawów, w związku z czym dotkliwość pozostaje sklasyfikowana jako **DOTKLIWA**.

Czy dotkliwość procedur mogłaby przekroczyć górną granicę?

Zgodnie z art. 15 ust. 2 dyrektywy „państwa członkowskie zapewniają, aby dana procedura nie była wykonywana, jeśli wiąże się ona z dotkliwym bólem, cierpieniem lub stresem, które mogą mieć charakter długotrwały i nie można ich złagodzić". Badanie to może powodować dotkliwe cierpienie przez szereg tygodni, które należy uznać za długotrwałe. Gdyby doszło do rozwoju zapalenia stawów we wszystkich łapach i

cierpienie nie zostało złagodzone, w badaniu przekroczono by górną granicę dotkliwości i konieczne byłoby znaczne udoskonalenie tego badania lub zastosowanie „klauzuli ochronnych” (art. 55 dyrektywy) oraz złożenie do Komisji wniosku o zezwolenie na przeprowadzenie tego badania.

W odniesieniu do powyższego przykładu istnieją jednak środki mające na celu ograniczanie cierpienia, uwzględniające cel naukowy badania, takie jak doskonalenie składu adiuwantu, sposób jego podania i jego wybór, pozwolenie na rozwój zapalenia stawów jedynie w kończynach tylnych, zapewnianie wygodnego środowiska bytowania i łatwego dostępu do pokarmu i wody, kompleksowy system monitorowania i humanitarne zakończenie. W związku z tym przedmiotowy projekt nie zostałby uznany za wykraczający poza górną granicę i może zostać zatwierdzony z zastrzeżeniem skądinąd pozytywnej oceny, w tym przeglądu stosunku szkodliwości projektu i korzyści z niego płynących.

Poniżej przedstawiono przykładowy formularz klinicznej oceny punktowej przeznaczony do codziennej obserwacji szczurów z zapaleniem stawów.

Data:	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Dzień 4
Wygląd zewnętrzny				
Masa ciała				
Brak oznak pielęgnacji				
Odwodnienie				
Funkcje organizmu				
Duszność				
Szybkie oddychanie				
Zachowanie				

Niechęć do poruszania się				
Letarg/apatia				
Bezruch				
Wydawanie odgłosów				
Wskaźnik w ramach danej procedury				
Ocena punktowa łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów (zob. tabela 2)				
Pozostałe spostrzeżenia				
(Dowolny tekst)				
Łączna ocena punktowa				

Uwaga: każdy wskaźnik oceniono zgodnie z systemem przedstawionym w tabeli 1 i 2 poniżej. Przykładowo ocena „1" zostałaby wprowadzona do formularza oceny punktowej w polu „brak oznak pielęgnacji" (tabela 1), a „5" w polu „wskaźnik w ramach danej procedury", jeżeli dwóm kończynom tylnym przyznano by odpowiednio „3" i „2" (tabela 2). Działania i humanitarne zakończenie określone poniżej uwzględniają wymagania dotyczące unikania dotkliwego cierpienia w każdym możliwym przypadku ale nie w przypadku uśmiercania zwierząt w sposób humanitarny zanim wystarczające dane zostaną uzyskane, co mogłoby wymagać konieczności wykorzystania kolejnych zwierząt niepoddanych eksperymentowi (naïve animals).

Tabela 1. System oceny punktowej w odniesieniu do wskaźników zastosowanych w formularzu klinicznej oceny punktowej

	Ocena punktowa
<u>Wygląd zewnętrzny</u>	
Utrata masy ciała w normie <5 %	0
Utrata masy ciała o 5–10 %	1
Utrata masy ciała o 11–15 %	2
Utrata masy ciała o 16–20 %	3
Utrata masy ciała o 20 % i więcej	HEP
Brak oznak pielęgnacji	1
Ściągnięta skóra /odwodnienie	1
<u>Funkcje organizmu</u>	
Duszność	2
Szybkie oddychanie	1
<u>Zachowanie</u>	
Niechęć do poruszania się	1

Tabela 2. Wskaźnik w ramach danej procedury – ocena punktowa łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów

0	W normie
1	Rumień i opuchlizna wokół jednej kostki
2	Rumień i opuchlizna wokół kostki i bliższej połowy stawu skokowego
3	Rumień i opuchlizna wokół kostki i wszystkich stawów skokowych aż po stawy śródstopia
4	Rumień i opuchlizna całej łapy, w tym palców

Powyższy system oceny punktowej wykorzystywany jako wskaźnik określony dla procedury opracowano w oparciu o rosnące poziomy opuchlizny i rumienia okołostawowego. Punkty przydzielono w oparciu o badanie fizykalne i kontrolę wizualną i są wykorzystywane do celów obliczania „wskaźnika zapalenia stawów" określonego jako sumę punktów przyznanych w odniesieniu do obu kończyn tylnych.

Letarg/apatia	2
Trwający bezruch < 24 godz.	3
Bezruch > 24 godz.	HEP
Wydawanie odgłosów podczas kontaktu	1
Wydawanie odgłosów, napięcie i zdenerwowanie podczas kontaktu	2
Wydawanie odgłosów podczas poruszania się / spontaniczne	3
Wskaźnik w ramach danej procedury	
Ocena punktowa łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów (zob. tabela 2)	0–8

HEP: zastosowano humanitarne zakończenie, bez względu na to, czy występują inne objawy kliniczne, czy nie.

Przykłady właściwych interwencji w odpowiedzi na łączną ocenę kliniczną

Działania, które należy podjąć	**Łączna ocena**

	punktowa
Zwiększyć częstotliwość monitorowania; rozważyć podawanie dodatkowych płynów / dodatkową opiekę	≥4
Dokonać przeglądu postępów z lekarzem weterynarii	5–15
Humanitarne zakończenie	≥16

Uwaga: łączną ocenę punktową uzyskuje się z formularzy klinicznej oceny punktowej, wypełnionych zgodnie z systemami oceny punktowej przedstawionymi w tabeli 1 i 2. Przykładowo zwierzę, u którego odnotowano utratę masy ciała o 12 %, oznaki zaniedbania pielęgnacji i opuchliznę wokół obu kostek kończyn tylnych, otrzymałoby łączną ocenę w wysokości 5 punktów.

Ocena retrospektywna:
36 szczurom wstrzyknięto bydlęcy kolagen typu II w niekompletnym adiuwancie Freunda (FIA). U wszystkich zwierząt zaobserwowano rozwój zapalenia stawów: Oceny punktowe łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów wynosiły 6 punktów do dnia 10. U wszystkich zwierząt odnotowano utratę masy ciała o 5–10 %. Pomiary średnicy stawów wskazały na znaczne zmiany w porównaniu z danymi początkowymi. Codzienne obserwacje kliniczne wykazały brak oznak pielęgnacji, niechęć do poruszania się, apatię, wydawanie odgłosów podczas kontaktu (w trakcie obserwacji i zmiany klatek), zmniejszone przyjmowania pokarmu i okresy bezruchu.

- 12 zwierząt umieszczono w grupie leczonej solą fizjologiczną. Najwyższe oceny punktowe łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów wynosiły 6–8 punktów w odniesieniu do wszystkich pomiarów (D13, D16, D20 i D24). Pomiary średnicy stawów także wykazały znaczny wzrost w stosunku do danych początkowych. Kliniczna ocena punktowa wyniosła 4–8 i wykazano utratę masy ciała o 5–15 %, za wyjątkiem jednego zwierzęcia, u którego odnotowano utratę masy ciała o 21 % w dniu 17, a następnie zwierzę to uśmiercono w sposób humanitarny.
  Ocena retrospektywna: DOTKLIWA;

- 12 zwierząt poddano leczeniu PRODUKTEM LECZNICZYM A w **niskiej** dawce. U wszystkich zwierząt oceny punktowe łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów, nie różniły się od ocen dotyczących grupy leczonej solą fizjologiczną do dnia 16.

W dniu 20 u jednego zwierzęcia odnotowano ocenę punktową łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów w wysokości 8 punktów, podczas gdy oceny pozostałych zwierząt wynosiły 6–7 punktów.

W dniu 24 u pięciu zwierząt odnotowano niższą ocenę punktową łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów (5–7). Objawy kliniczne zaobserwowane u tych pięciu zwierząt wskazały na pewną poprawę, wciąż jednak obserwowano spadek masy ciała o 5–10 %; ograniczeniu uległ także stopień poruszania się zwierząt w obrębie klatki.

U pozostałych siedmiu zwierząt nie odnotowano ograniczenia objawów klinicznych i objawów związanych z zapaleniem stawów w stosunku do grupy leczonej solą fizjologiczną.
Ocena retrospektywna: DOTKLIWA;

- 12 zwierząt poddano leczeniu PRODUKTEM LECZNICZYM A w dawce wysokiej dawce**.** W dniu 13 oceny punktowe łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów wyniosły 4–6 punktów; w przypadku średnic stawów także odnotowano nieznaczny spadek. Objawy kliniczne wskazywały na brak oznak pielęgnacji i utratę masy ciała o < 10 %. W dniu 16 oceny punktowe łap, w których rozwinęło się zapalenie stawów spadły do 4 punktów i odnotowano znaczne zmniejszenie się średnic stawów. W dniu 16 ustabilizowały się masy ciała. U niektórych zwierząt wciąż obserwowano niechęć do ruchu. Od dnia 20 opuchlizna wokół stawów uległa zmniejszeniu do poziomu 2–4 punktów. Zaobserwowano naturalne zachowania w klatce. Masa ciała zwierząt powróciła do poziomów sprzed procedury.
  Ocena retrospektywna: DOTKLIWA.

Uwaga: pod koniec badania w trzeciej grupie dwunastu zwierząt, przeznaczony do celów badań środek „PRODUKT LECZNICZY A" podawany w dawce określonej jako **wysoka**, okazał się być skuteczny w ograniczaniu rzeczywistej dotkliwości procedur do umiarkowanej. Jednak model wymagał całkowitego rozwinięcia zapalenia stawów u wszystkich zwierząt jeszcze przed rozpoczęciem leczenia, w którym to momencie zwierzęta wskazywały na dotkliwość objawów klinicznych zgodnych z klasyfikacją „dotkliwe", rzeczywista dotkliwość została zatem sklasyfikowana jako **dotkliwa**.

Ponieważ projekt ten obejmuje wykonywanie dotkliwych procedur, użytkownik regularnie dokonuje bieżących przeglądów dotyczących dotkliwości procedur, konsultując je z ciałem doradczym ds. dobrostanu zwierząt, zootechnikiem i wyznaczonym lekarzem weterynarii, aby zapewnić konsekwentne stosowanie zasady 3R.

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 4 – udar

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

Kontekst ogólny

Udar definiuje się jako utratę lub zmianę normalnego funkcjonowania organizmu, która wynika z niedokrwienia części mózgu. Mimo lepszego rozumienia patofizjologii naczyniowego uszkodzenia mózgu, skuteczne leczenie udaru pozostaje ważną niezaspokojoną potrzebą medyczną, a celem trwających w tej dziedzinie badań jest znalezienie właściwych środków zapobiegawczych i leczniczych.

U pacjentów obserwuje się trzy różne rodzaje udarów: niedokrwienny, krwotoczny śródmózgowy i krwotoczny podpajęczynówkowy, jednak większość z dostępnych obecnie zwierzęcych modeli opiera się na rodzaju niedokrwiennym. Z punktu widzenia dobrostanu zwierząt modele udaru, ze względu na ich specyficzny charakter, stanowią wyzwanie. Niezbędne są dobre interakcje i komunikacja między wszystkimi osobami uczestniczącymi w procedurach naukowych (weterynarzami, badaczami, technikami hodowcami zwierząt i pracownikami sprawującymi opiekę nad zwierzętami), aby możliwe było zapewnienie odpowiedniej równowagi między uzyskaniem stosownego modelu a zminimalizowaniem cierpienia zwierząt.

U gryzoni udar jest zazwyczaj wywoływany przez czasowe lub stałe zablokowanie tętnicy środkowej mózgu (okluzja tętnicy środkowej mózgu; model MCAO).Celem modelu MCAO jest odtworzenie w sposób eksperymentalny centralnej niedokrwistości mózgu, która występuje przy udarze, przy czym model ten intensywnie wykorzystywano także do badania mechanizmów uszkodzenia, identyfikacji potencjalnych celów i testowania potencjalnych środków neuroochronnych. Zidentyfikowano różnice w szczepach myszy i szczurów, a także złożony i znaczący wpływ wieku, płci, współistniejących chorób, takich jak cukrzyca, nadciśnienie i miażdżyca. O ile w badaniach przedklinicznych dotyczących udaru wykorzystuje się często zdrowe młode gryzonie płci męskiej, wpływ wymienionych powyżej czynników można zbadać używając modeli współistniejących różnych chorób (np. spontanicznie nadciśnienie u szczurów, cukrzyca indukowana streptozotocyną (STZ)). W takich przypadkach współistnienia różnych chorób konieczne mogą być bardziej wnikliwe obserwacje objawów klinicznych i wcześniejsze zastosowanie humanitarnych punktów końcowych.

W standardowym projekcie badania zwierzęta szkoli się, aby wykonywały określone testy behawioralne przed zastosowaniem procedury MCAO. Podczas terapeutycznego okna czasowego, ustalonego zgodnie z mechanizmem działania produktu leczniczego i celem badania,

zwierzętom podaje się badany związek. W analizie wyników należy uwzględnić informacje dotyczące rozległości obszaru martwicy niedokrwiennej, współczynnika śmiertelności, częstotliwości komplikacji (np. krwotok podpajęczynówkowy) wraz z oceną funkcjonalną i neurologiczną w celu monitorowania postępu. Seryjne obrazowanie techniką rezonansu magnetycznego okazało się ważnym narzędziem do gromadzenia informacji na temat zróżnicowania rozległości obszaru martwicy niedokrwiennej w czasie, ale może także zapewniać informacje dodatkowe dotyczące przepływu krwi lub metabolizmu. Można uwzględnić także końcowe punkty histologiczne, biochemiczne i molekularne.

Istnieją różne testy behawioralne, które można zastosować w przypadku modeli udaru. Najprostsze testy obejmują systemy neurologicznej oceny punktowej, za pomocą których dokonuje się ogólnej oceny stanu neurologicznego, oraz testy stawiania kończyny wykorzystywane do pomiaru odruchów ruchowych. Zasadniczo wykorzystuje się je do oceny zwierząt znajdujących się w ostrej fazie poudarowej. W badaniach długoterminowych można korzystać z bardziej złożonych testów (np. dwustronny test samoprzylepnego znacznika, test chodzenia po belce, test *rotarod*, test klatki schodowej) w celu oceniania funkcji sensorycznych i motorycznych oraz funkcji poznawczych takich jak pamięć (np. testy biernego unikania lub oceny strategii uczenia się).

Dobrą praktyką jest wykonanie kilku testów behawioralnych, w tym co najmniej jednego testu w każdej fazie (ostrej i długoterminowej), aby zgromadzić obszerne informacje na temat oddziaływania na funkcje sensoryczne, motoryczne i poznawcze. Testy należy dobierać starannie w celu wychwycenia skutków potencjalnych strategii terapeutycznych. W niniejszym dokumencie nie przedstawiono szczegółowych opisów każdego testu behawioralnego wraz z planami szkoleń, jednak aby zapoznać się z dokładnym przeglądem i analizą ich stosowania zob. Schaar et al. (2010).

Źródła

- Braeuninger S i Kleinschnitz C. *Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T and Bouet V. *Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31.
- Graham SM i in. *Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496.
- Yanamoto H i in. *Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique*.ExpNeurol, 2003 Aug; 182(2):261-74.

- Liu S i in. *Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). Journal of experimental stroke and translational medicine*, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL i in. *Functional assessments in the rodent stroke model. Experimental &Translatinal Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; otwarty dostęp na stronie internetowej: http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13.
- Virley i in. *A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000;20: 563-582.

Badanie

Skuteczność nowego środka leczniczego w odniesieniu do modelu okluzji tętnicy środkowej mózgu za pomocą nici umieszczonej w świetle naczynia (MCAO) u szczurów.

W tym przykładzie 40 młodych szczurów Sprague-Dawley płci męskiej (300–350 g) zostanie poddanych stałej procedurze MCAO przy zastosowaniu techniki polegającej zamknięciu światła naczynia przez wprowadzenie nici do tętnicy w ogólnym znieczuleniu. Szczury zostaną poddane randomizacji (n=10/grupa) aby otrzymać nośnik (10ml/kg) lub badaną substancję (związek A) w ilości 1, 3 lub 10 mg/kg, podane w postaci infuzji dożylnej do żyły ogonowej w ciągu 1 godz. po upływie 30 min od przeprowadzenia procedury MCAO. Kolejne dawki (nośnika lub związku A w ilości 1, 3 lub 10 mg/kg) zostaną podane wewnątrzotrzewnowo w ciągu 6 i 24 godz. po MCAO. Szczury będą początkowo trzymane w parach w klatkach z podłogami pełnymi z głęboką ściółką i materiałem do budowy gniazd. Ilości pokarmu będą ograniczone podczas wstępnego szkolenia, aby ułatwić wykonanie testu klatki schodowej, co zależne jest od zapotrzebowania na pokarm. Zwierzętom zapewni się pokarm *ad libitum* w ciągu 6 godzin przed zabiegiem do 6 dni po MCAO w celu poprawienia masy i opieki pooperacyjnej.

Wynik funkcjonalny będzie codziennie poddawany ocenie za pomocą systemu neurologicznej oceny punktowej (skala Bedersona; zob. Schaar et al. 2010) i testów behawioralnych (dwustronny test samoprzylepnego znacznika i test chodzenia po belce); Test klatki schodowej będzie również wykonywany codziennie począwszy od 7. dnia po MCAO, aby zapewnić wystarczającą ilość czasu na opiekę pooperacyjną przed ponownym prowadzeniem ograniczeń pokarmu. Nie przewiduje się, aby którykolwiek z testów behawioralnych spowodował znaczący stres. Obrazowanie techniką rezonansu magnetycznego będzie wykonane na szczurach poddanych znieczuleniu w 1., 7., 14. i 28. dniu w celu oceny wielkości zmiany patologicznej. Wszystkie zwierzęta zostaną uśmiercone 28 dni po MCAO.

Wstępna ocena i uwzględnienie określonych udoskonaleń oraz humanitarnego zakończenia

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Humanitarne zakończenie**
Szkolenie przedoperacyjne w zakresie testów behawioralnych w ciągu 2–3 tygodni: dwustronny test samoprzylepnego znacznika (zaniedbanie przeciwstronne), chodzenie po belce (koordynacja kończyny tylnej) i test klatki schodowej (sprawne dosięganie kończyną przednią).	Minimalny stres / niepokój może być wywoływany, zanim zwierzęta przyzwyczają się do testów, ponieważ testy wiążą się z koniecznością przenoszenia zwierząt do nowych pomieszczeń/klatek.	Stopniowa habituacja w odniesieniu do aparatury przeznaczonej do badania Spokojne, empatyczne postępowanie przy kontakcie ze zwierzęciem..	Wycofanie z sesji w przypadku zaobserwowania objawów stresu. Zwierzęta nieosiągające wyników stanu wyjściowego w ciągu ustalonego wcześniej limitu czasowego będą wykluczane z badań.
Ograniczenie pokarmu (85–90 % masy w trakcie nieograniczonego spożywania pokarmu) przed zabiegiem i od 7. dnia po MCAO w celu ułatwienia wykonania	Umiarkowany głód; możliwa frustracja i niepokój..	Utrata masy ciała nie przekroczy 10 %, w przeciwnym razie ograniczenia pokarmu zostaną wstrzymane.	W przypadku zaobserwowania problemów behawioralnych spowodowanych brakiem przyjmowanego pokarmu

testu klatki schodowej.			zwierzę zostanie wycofane z badań.
Przy zastosowaniu ogólnego znieczulenia czasowe (90 min) zamknięcie światła tętnicy środkowej mózgu z za pomocą nici wprowadzonej przez tętnicę szyjną wspólną	Ból i dyskomfort związany z zabiegiem chirurgicznym Możliwość wystąpienia niespodziewanych komplikacji na skutek zabiegu chirurgicznego, np. krwotoku podpajęczynówkowego, ipsilateralnego uszkodzenia siatkówki, powstawania zakrzepów w świetle naczynia, obrzęku mózgu z udziałem podwzgórza i wynikającą z tego hipertermią lub czasową martwicą mięśni. Powikłania te mogą przyjmować szereg różnych form, na przykład nagła zapaść, paraliż, silny kręcz szyi, drgawki. Zniechęcenie i potencjalne oddziaływanie znieczulenia na zmienne fizjologiczne (takie jak hipertermia, niedociśnienie, hipoksja).	Stosowanie odpowiedniego i wywołującego minimalnie negatywną reakcję znieczulenia za pomocą odpowiednich środków przeciwbólowych (tj. skutecznych, chociaż o minimalnych właściwościach neuroochronnych) Dobrze wyszkolony chirurg stosujący odpowiednią aseptyczną technikę chirurgiczną (z regularnym przeglądem skuteczności). Utrzymanie homeostazy podczas znieczulenia. Stosowanie unormowanych włókien monofilament i techniki chirurgicznej w celu ograniczenia zmienności i komplikacji powstałych na skutek rozległych zmian patologicznych. Intensywna opieka pooperacyjna	Zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny w przypadku wystąpienia któregokolwiek z następujących problemów: • wystąpienie znaczących problemów technicznych podczas zabiegu chirurgicznego; • nieodzyskanie pełnej przytomności po znieczuleniu; • objawy niespodziewanych komplikacji chirurgicznych; • w przypadku utraty masy ciała zwierzęcia o ponad 20 % w stosunku do wagi sprzed zabiegu mimo

	Ograniczone pobieranie pokarmu wynikające z obniżonego poziomu świadomości, obniżonej zdolności do przeżuwania i niewielkiej ruchliwości, zasadniczo w ciągu pierwszych 48 godz. po MCAO. Stopień zaburzeń sprawności ruchowej, które mogłyby wywołać stres lub frustrację.	przez pierwsze 3–5 dni, w tym zapewnianie zewnętrznych źródeł ciepła. Regularne kontrolowanie masy ciała; codzienna obserwacja i opatrywanie ran Zapewnianie łatwego dostępu do pokarmu i wody podczas okresu rekonwalescencji lub dodatkowego pokarmu (rozdrobnionego, płynnego) oraz w razie potrzeby pomoc w karmieniu; w razie potrzeby nawadnianie (np. przez wstrzyknięcie soli fizjologicznej).	podawania dodatkowego pokarmu lub nawadniania, lub jeżeli zwierzę pozostaje nieruchome przez ponad 24 godziny.
Testy behawioralne (dwustronny test samoprzylepnego wskaźnika i test chodzenia po belce) przeprowadzane codziennie od 1. dnia do 28. dnia po MCAO; test klatki schodowej przeprowadzany codziennie od 7. dnia po MCAO	Dla zwierząt te zadania mogą być stresujące, jeżeli ich sprawność ruchowa uległa pogorszeniu.	Monitorowanie behawioralnych wskaźników niepokoju lub stresu. Doświadczeni pracownicy będą stale obserwować zwierzęta.	Zazwyczaj ustala się maksymalny czas na wykonanie (granica) danego zadania i podaje się wynik końcowy.
Podawanie nowego środka leczniczego drogą	Przejściowy dyskomfort związany z	Podawanie środka zgodnie z zasadą stosowania dobrych	W przypadku zauważenia jakichkolwiek dotkliwych

podskórną/dożylną/dootrzewnową przed lub po zabiegu chirurgicznym (zapobiegawcze/lecznicze)	drogą podawania. Nie przewiduje się skutków niepożądanych w związku z poziomami podawanych dawek.	praktyk najmniej bolesną/stresującą drogą i za pomocą technik możliwych do wykorzystania, pozostając w zgodzie z celami naukowymi. Zwierzęta zostaną poddane wnikliwej obserwacji w zakresie wystąpienia niepożądanych skutków badanych substancji.	niepożądanych skutków spowodowanych przyjęciem środków leczniczych zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny.
Podłużne obrazowanie techniką rezonansu magnetycznego w znieczuleniu w 1., 7. 14. i 28. dniu po MCAO.	Kilkakrotne znieczulanie Brak reakcji i potencjalne oddziaływanie znieczulenia na zmienne fizjologiczne (takie jak hipertermia, niedociśnienie, hipoksja).	Stosowanie odpowiedniego i wywołującego minimalnie negatywną reakcję znieczulenia. Utrzymanie homeostazy podczas znieczulenia, w tym stosowanie leczenia płynami przed lub w trakcie znieczulenia, jeżeli występują problemy z nawodnieniem i ogrzaniem w celu utrzymania normotermii.	Zwierzęta, które nie odzyskają przytomności po znieczuleniu, zostaną poddane eutanazji. W przypadku braku możliwości utrzymania homeostazy po znieczuleniu zwierzęta będą uśmiercane w sposób humanitarny.

Analiza

Model ten uznawany jest za DOTKLIWY, ponieważ obejmuje procedury chirurgiczne, wywołuje niepożądane (chociaż zazwyczaj przejściowe) skutki MCAO dla dobrostanu zwierząt i możliwość wystąpienia komplikacji okołooperacyjnych. Negatywny wpływ na dobrostan zwierząt

można jednak ograniczyć dzięki intensywnej opiece pooperacyjnej trwającej co najmniej przez pierwsze 48 godz. oraz wnikliwe monitorowanie fazy późniejszej, podejmując natychmiastowe działania w przypadku wystąpienia problemów. Z doświadczalnego punktu widzenia skupienie się na udoskonaleniu i normalizacji każdej procedury może doprowadzić do ograniczonego występowania komplikacji i zmienności, i w związku z tym do otrzymywania danych o lepszej jakości oraz ograniczenia liczby wykorzystywanych zwierząt.

W tym przypadku należy zatem uznać ewentualny stopień dotkliwości powyższych procedur za DOTKLIWY.

Czy dotkliwość procedur mogłaby zostać uznana za UMIARKOWANĄ?

Chociaż ewentualny stopień dotkliwości tego modelu zawsze należy uznawać za DOTKLIWY z przyczyn wymienionych powyżej, to jednak występowanie dotkliwych skutków można ograniczyć dzięki działaniom doświadczonego pracownika w połączeniu ze specjalistycznym nadzorem weterynaryjnym i opieką nad zwierzętami oraz ustalonymi uprzednio interwencjami w przypadku wystąpienia komplikacji. W niektórych przypadkach możliwe jest dopuszczenie UMIARKOWANEJ dotkliwości, ale tylko indywidualnie dla jednostkowej grupy badawczej, która posiada udokumentowane doświadczenie w zakresie stosowania danego modelu, i wykazano, że grupa ta jest w stanie korzystać z modelu, nie powodując cierpienia większego niż umiarkowane.

Obserwacja kliniczna

Zwierzęta monitoruje się dokładnie w trakcie okresu pooperacyjnego. W razie potrzeby przewiduje się analgezję i miejscową terapię wspierającą.

Przykład połączonego systemu neurologicznej/klinicznej oceny punktowej stosowanego jako wsparcie w monitorowaniu klinicznego stanu zwierząt poprzez procedurę przedstawiony został w końcowej części tego przykładu.

Wyniki

Wszystkie zwierzęta, z wyjątkiem jednego w grupie kontrolnej nośnika, odzyskały przytomność po zabiegu bez żadnych niespodziewanych komplikacji dzięki zapewnieniu intensywnej pomocy okołooperacyjnej.

- Wszystkie 10 zwierząt z grupy kontrolnej nośnika odznaczały się najniższym wynikiem neurologicznej oceny punktowej w trakcie całego badania oraz słabym wynikiem w testach behawioralnych w porównaniu ze zwierzętami poddanymi leczeniu. Wynik klinicznej

oceny punktowej był podobny do wyniku w grupie zwierząt poddanych leczeniu w okresie bezpośrednio po (pierwsze 48 godz.) MCAO, następnie wśród zwierząt w grupie kontrolnej nośnika zauważono różnice:

- konieczne było poddanie eutanazji 1/10 z nich w 2. dniu po zabiegu ze względu na utratę masy ciała >20 % (mimo podawania dodatkowego pokarmu i nawadniania).
  Ocena: DOTKLIWA

- u 6/10 zwierząt rozwinęło się umiarkowane zaburzenie neurologiczne, a poprawa wyniku klinicznej oceny w czasie okazała się minimalna
  Ocena: DOTKLIWA

- u 3/10 zwierząt rozwinęło się umiarkowane zaburzenie neurologiczne i nastąpiło stopniowe ograniczenie wyniku klinicznej oceny w czasie wynikające prawdopodobnie z ich umiejętności kompensowania długotrwałych zaburzeń neurologicznych i dostosowywania się do nich
  Ocena: UMIARKOWANA

- U wszystkich 20 zwierząt z grupy poddanej działaniu związku A w mniejszych dawkach (1 i 3 mg/kg) nastąpiła poprawa wyniku neurologicznej oceny punktowej po upływie 48 godz. od MCAO, a także poprawa wyniku klinicznej oceny punktowej.
  Ocena: UMIARKOWANA

- U wszystkich 10 zwierząt z grupy poddanej działaniu związku A w największej dawce (10 mg/kg) nastąpiła poprawa wyniku neurologicznej oceny punktowej w porównaniu z grupą kontrolną nośnika po upływie 24 godz. od MCAO, zaledwie minimalna utrata masy ciała (5 %) 24 godz. po zabiegu i znaczna poprawa w wyniku klinicznej oceny punktowej po upływie 48 godz. po MCAO
  Ocena: UMIARKOWANA

Ocena rzeczywistej dotkliwości

7 zwierząt uznano za dotknięte w stopniu **DOTKLIWYM;** 33 zwierzęta uznano za dotknięte w stopniu **UMIARKOWANYM**

System oceny punktowej

Ocenę dotkliwości przeprowadza się na podstawie zestawienia ogólnych obserwacji klinicznych (masa ciała, wygląd, zachowanie, warunki w klatce) oraz określonej dla procedury oceny neurologicznej. Skala Bedersona jest ogólną skalą do oceny neurologicznej, którą opracowano w

celu mierzenia upośledzeń neurologicznych występujących po udarze. Stosuje się skalę 0–3, gdzie 0=normalny, a 3=najwyższy stopień niepełnosprawności. Testy obejmują fleksję kończyny przedniej, opór na boczne pchnięcie i krążenie w kółko.

Stopień 0: brak zauważalnego zaburzenia

Stopień 1: fleksja kończyny przedniej

Stopień 2: zmniejszony opór na boczne pchnięcie (i fleksję kończyny) bez krążenia

Stopień 3: zachowanie jak w przypadku stopnia 2, z krążeniem w kółko

HEP: humanitarne zakończenie

	Ocena punktowa
Wygląd zewnętrzny	
Utrata masy ciała o 5–10 %	1
Utrata masy ciała o 11–15 %	2
Utrata masy ciała o 16–20 %	3
Utrata masy ciała 20 % i więcej	HEP
Sierść lekko zaniedbana	1
Nieznaczna piloreksja	2
Znaczna piloreksja	3

Działania	
Ocena punktowa	
1	Częstotliwość dokonywania przeglądu monitorowania
4	Zapewnianie dodatkowej opieki, np. dodatkowe płyny i rozdrobniony wilgotny pokarm
5	Postęp przeglądu z weterynarzem
12	Zastosowanie humanitarnego zakończenia

Zachowanie	
Nieznacznie nienaturalny chód	1
Bardzo nienaturalny chód	2
Znaczne problemy z poruszaniem	3
Bezruch >24 godz.	HEP
Napięcie i nerwowość podczas kontaktu	2
Znaczny stres podczas kontaktu, np. dygotanie, wydawanie odgłosów, agresywność	3
Środowisko	
Gniazdo w niewielkim nieładzie	1
Gniazdo prawie nierozpoznawalne	2
Brak gniazda	**3**
Neurologiczna ocena punktowa	
Fleksja kończyny przedniej	1
Zmniejszony opór na boczne pchnięcie(i fleksję kończyny przedniej) bez krążenia	2

Zachowanie podobno jak w przypadku stopnia 2., z krążeniem	3

Działania – należy zauważyć, że ze względu na fakt, iż komplikacje chirurgiczne obserwuje się zasadniczo bezpośrednio w okresie rekonwalescencji po operacji, niezbędne jest wnikliwe monitorowanie i empatyczny osąd eksperta w trakcie pierwszych 24 godzin w celu zapewniania identyfikacji niepożądanych skutków i podjęcia działań mających im zaradzić, a także uśmiercania zwierząt w sposób humanitarny, jeżeli ich cierpienie przekracza stopień dotkliwości uznany za dotkliwy.

Przykład pojedynczego formularza obserwacji (dni 0 –4)

Dzień	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Wygląd zewnętrzny					
Masa ciała (g) (ocena)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
Stan sierści					
Sierść zaniedbana/piloreksja	1	1	0	1	0
Zachowania					
Chód	3	2	2	2	1
Reakcja na kontakt	0	0	2	0	0
Środowisko					
Stan gniazda	3	2	1	0	0

Określona dla procedury neurologiczna ocena punktowa	2	2	1	1	1
Łączna ocena **punktowa**	9	8	8	5	3
Wielkość zmiany patologicznej (ocena na podstawie obrazowania metodą rezonansu magnetycznego)*		11 %			
Inne spostrzeżenia	Odzyskanie przytomności po operacji w sposób niezakłócony, brak komplikacji Dawkowanie po 30 min i 6 godz.	Poruszanie się po klatce i próba zbudowania gniazda.	Testy behawioralne, początkowo okazuje niepokój, ale ukończył wszystkie, gniazdo bardziej uporządkowane.	Sierść mniej zadbana, ale waga stabilna i gniazdo w dobrym stanie.	Ukończone testy behawioralne, mniejszy niepokój i znaczna poprawa chodu.

***** „wielkość zmiany patologicznej” (oceniana przy użyciu obrazowania metodą rezonansu magnetycznego) została uwzględniona, aby badacz uzupełnił tą pozycje na koniec badania. Dane te można następnie skorelować z obserwacjami klinicznymi i behawioralnymi, aby umożliwić dalsze udoskonalanie monitorowania, opieki nad zwierzętami i procedur.

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 5 – produkcja przeciwciał poliklonalnych u królików

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

Kontekst ogólny

Głównym celem produkcji przeciwciał u zwierząt laboratoryjnych jest uzyskanie wysokiego miana, wysokiego powinowactwa surowic odpornościowych do użytku w doświadczeniach lub testach diagnostycznych.

Duża część badań współczesnej biologii i chemii opiera się na dostępności wysoce swoistych przeciwciał do użytku w ramach różnych technik takich jak immunohistochemia, testy ELISA, immunoprecypitacja białek oraz immunoblot. Dlatego też wytwarzanie dużych ilości swoistych przeciwciał ukierunkowanych na białka lub peptydy, będące przedmiotem zainteresowania, jest niezbędne, aby pomyślnie zrealizować wiele podstawowych i stosowanych programów badawczych.

W tym przykładzie królik zostanie wykorzystany w celu wytworzenia przeciwciał przeciwko małym peptydom, które uznaje się za istotne w regulacji podziału komórki, w ramach programu badawczego obejmującego badania biochemiczne w zakresie podziału komórki u ssaków.

Źródła

- *Canadian Council on Animal Care guidelines on*; *antibody production* (2002). Dostępne na stronie internetowej: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf.
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H i in.) 2001) „A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes". *Journal of Applied Toxicology* **21:** 15-23.
- JWGR (2001*) Refining procedures for the administration of substances. Laboratory Animals***35:** 1-41.
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) *Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses*. *PLOS ONE***7(9):** e44437 (ogólnodostępne na stronie internetowej: http://www.plosone.org).
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) „Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation". *ILAR Journal***46:**269-279.

- Stills HF (2005) „Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants". *ILAR Journal46:280-293.*
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research.*Southwater, UK: RSPCA (ogólnodostępne na stronie internetowej: http://www.rspca.org.uk/researchrabbits).

Badanie

Na podstawie wcześniejszych doświadczeń stwierdzono, że pojedynczy królik powinien zapewnić wystarczającą ilość materiału przeciwko każdemu peptydowi będącemu przedmiotem zainteresowania. Królik będzie umieszczony w kojcu podłogowym w stałej grupie złożonej ze zgodnie współżyjących królików (także wykorzystywanych do produkcji przeciwciał), z zapewnioną wystarczającą przestrzenią dla urozmaicenia warunków bytowania, ruchu i naturalnych zachowań społecznych (UFAW/RSPCA 2008).Zwierzę zostanie poddane immunizacji za pomocą mieszaniny antygenu/adiuwanta. Niewielkie ilości krwi zostaną pobrane w określonych z góry momentach w celu stwierdzenia, czy immunizacja przebiegła pomyślnie. Po uzyskaniu odpowiedniego miana przeciwciał, zwierzę zostanie wykrwawione w głębokim znieczuleniu bez wybudzania w celu zebrania przeciwciał z krwi.

Czynności wymagające kontaktu z królikami mogą być stresujące i powinny być wykonywane przez kompetentnych i empatycznych pracowników. Zachowanie królików może być trudne do zinterpretowania i dobrą praktyką jest utrwalanie znajomości literatury dotyczącej zachowania królików i ich dobrostanu. Na przykład w najnowszych publikacjach stwierdzono, że u królików w określonych warunkach może pojawiać się oznak „pysków ściągniętych bólem" (Keating i in. 2012) i możliwość wykorzystania tego jako narzędzia do oceny dobrostanu należy badać indywidualnie dla każdego przypadku.

Ze względu na niewielką immunogenność krótkiego łańcucha peptydowego konieczne będzie podanie go w połączeniu z adiuwantem. Wcześniej używano kompletnego adiuwanta Freunda, jednak teraz dostępne są syntetyczne adiuwanty, które także są skuteczne w przypadku tej procedury, a ich działanie jest drażniące w minimalnym stopniu.

Wstępna ocena ewentualnego stopnia dotkliwości i uwagi dotyczące określonych udoskonaleń oraz humanitarnego zakończenia.

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	Metodyka i interwencje	Humanitarne zakończenie
Immunizacja za pomocą antygenu i adiuwanta; trzy podskórne wstrzyknięcia w 8., 22., i 37. dniu.	Dyskomfort odczuwany na skutek wstrzyknięcia W reakcji na wstrzyknięcie adiuwanta mogą powstawać niebolesne guzki. Możliwe (rzadkie) owrzodzenie w miejscu wstrzyknięcia.	Wstrzykiwana ilość, postać użytkowa i częstotliwość wstrzyknięć będą zgodne z wytycznymi w zakresie dobrych praktyk (np. EFPIA/ECVAM lub JWGR), zazwyczaj maksymalnie w czterech miejscach i w ilości 0,25 ml na jedno miejsce. Każdy wrzód zostanie natychmiast poddany leczeniu weterynaryjnemu.	W przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów przedłużającego się dyskomfortu, bólu lub stresu (np. ciągłe kierowanie uwagi na miejsca wstrzyknięcia lub guzki), lub jeżeli powstaną niegojące się wrzody, zwierzęta zostaną uśmiercone w sposób humanitarny.
Pobieranie próbek krwi w celu oceny reakcji na przeciwciała (do 5 pobrań).	Chwytanie, kontakt z człowiekiem i unieruchamianie zwierząt mogą być dla nich stresujące. Nieznaczny dyskomfort związany z ukłuciem.	Próbki zostaną pobrane z żyły powierzchownej (usznej). Niewielkie ilości krwi (<5ml) wyłącznie w celu sprawdzenia miana przeciwciał	Jeżeli procedura wywoła u zwierzęcia nadmierny stres, pobieranie próbek zostanie przełożone do momentu aż zwierzę powróci do normalnego

	Niewielkie ryzyko krwotoku lub powstania krwiaka.	Zastosowanie ucisku w miejscu pobrania.	stanu.
Wykrwawienie w znieczuleniu ogólnym.	Niewielki dyskomfort i możliwa reakcja negatywna na substancję w trakcie indukcji znieczulenia.	Stosowanie substancji znieczulającej wywołującej minimalną negatywną reakcję.	Zwierzę pozostaje w znieczuleniu do momentu uśmiercenia.

Analiza

Przewiduje się jedynie łagodną dotkliwość ze względu na udoskonalenia w hodowli i opiekę, dobre praktyki w zakresie wstrzyknięć i pobierania próbek oraz wybór minimalnie drażniącego adiuwanta.

W tym przypadku należy zatem uznać ewentualny stopień dotkliwości powyższych procedur za ŁAGODNY.

Czy procedura mogłaby nadal być udoskonalana?

Możliwość stosowania minimalnie drażniących adiuwantów i środków znieczulających wywołujących mniej negatywną reakcję należy regularnie weryfikować przez monitorowanie publikacji i omawianie tej kwestii z współpracownikami. Można byłoby opracować program przystosowujący młode osobniki do czynności wymagających kontaktu z człowiekiem w celu dalszego ograniczania stresu (UFAW/RSPCA, 2008).

Obserwacje kliniczne

Ponieważ w tym badaniu przewidywano jedynie niewielkie skutki niepożądane, zastosowano podstawowy system monitorowania; tj. zwierzę poddawano kontroli codziennie, a obserwacje zapisywano, ale nie uznano za konieczne, aby użyć usystematyzowanego formularza zapisu obserwacji.

W końcowej części tego przykładu zawarto objaśniający przykładowy formularz obserwacyjny.

Ocena rzeczywistego stopnia dotkliwości

Odnotowano przejściową, niewielką opuchliznę w miejscu wstrzyknięcia, ale nie wymagała ona leczenia. U królika zaobserwowano przez krótki okres czasu częściowe kierowanie uwagi na miejsce wstrzyknięcia, jednak uznano, że wskazuje to jedynie na występowanie łagodnego dyskomfortu. Nie zauważono oznak „pysków ściągniętych bólem".

Nie odnotowano efektów niepożądanych w związku z rzeczywistym pobieraniem próbek krwi z żyły usznej.

Uznano, że sklasyfikowanie stopnia dotkliwości jako **ŁAGODNEGO** jest odpowiednie w przypadku tego zwierzęcia.

Przykładowy formularz obserwacyjny

Produkcja przeciwciał u królików – formularz procedur i obserwacji		
Data	Masa ciała (kg)	Uwagi
01.03	3,5	Wstępne pobranie krwi – 5 ml krwi z żyły usznej; nie odnotowano niepożądanych skutków
02.03		Nie wykryto anomalii (NWA)
06.03		NWA
07.03		NWA
08.03	3,6	Immunizacja – 0,25 ml x 2 miejsca podskórnie, niewielkie zainteresowanie tymi miejscami (pielęgnowanie) przez kilka minut, następnie powrót do stanu normalnego

09.03		NWA
10.03		NWA
11.03		NWA
12.03		Niewielka, miękka nieboląca opuchlizna w miejscu LHS
13.03		Opuchlizna utrzymuje się w miejscu LHS, stan nie pogorszył się
14.03		Opuchlizna nadal utrzymuje się w miejscu LHS, ale nie jest bolesna przy badaniu palpacyjnym
15.03	3,6	Opuchlizna ustąpiła, stan ogólny w normie

21.03		NWA
22.03	3,6	Immunizacja – 0,25 ml x 2 miejsca podskórnie, krótkotrwałe zainteresowanie tymi miejscami

28.09		NWA
29.03	3,7	NWA
30.03		Pobranie krwi do badań – 2 ml krwi z żyły usznej; brak niepożądanych skutków

05.04		NWA
06.04	3,6	Immunizacja – 0,25 ml x 2 miejsca

14.04	3,6	NWA
15.04		Pobranie krwi do badań – 2 ml krwi z żyły usznej; brak niepożądanych skutków

26.04		NWA
27.04	3,6	Wykrwawienie w znieczuleniu ogólnym, brak niepożądanych skutków

Należy zachować potwierdzenie, że zwierzę było kontrolowane co najmniej raz dziennie, np. w zapisach dotyczących danego zwierzęcia (jak wyżej) lub w zapisach dotyczących pomieszczenia.

Przykłady objaśniające proces klasyfikacji dotkliwości
Model 6 – tworzenie i utrzymanie zwierząt zmienionych genetycznie

Ostatnia aktualizacja: 05/02/2013

1. Kontekst ogólny

Wykorzystywanie w badaniach zwierząt zmienionych genetycznie przyczyniło się do zrozumienia funkcji genów i odpowiadających im białek. Różne fenotypy mogą mieć szereg różnorakich skutków dla dobrostanu zwierząt, niektóre z nich mogą wywoływać ból, cierpienie lub stres. Mimo że można przewidzieć niektóre fenotypy i wyniki, podczas tworzenia linii zmienionych genetycznie może pojawić się wiele nieoczekiwanych lub drugorzędnych cech, tak więc dokładne przewidzenie poziomu dotkliwości nie zawsze jest możliwe. W praktyce w wielu liniach zmienionych genetycznie nie występuje oddziaływanie na fenotyp i można sporządzać protokoły oceny w celu zapewnienia wykrycia jakichkolwiek niepożądanych fenotypów. Ewentualnie przewidywany fenotyp można często powiązać z nieprzewidzianymi fenotypami drugorzędnymi, które ujawniają się w różnych momentach, i różne czynniki środowiskowe mogą mieć na nie wpływ.

Oceniając rzeczywistą szkodę wyrządzoną zwierzętom, należy wziąć pod uwagę wiele czynników, takich jak typ mutacji, genotyp, fenotyp i strategia hodowli (np. unikanie szkodliwych fenotypów homozygotycznych przez kojarzenie heterozygot x szczepu dzikiego) wraz z charakterem wszystkich dodatkowych procedur naukowych lub hodowlanych i potencjalnych skutków wymienionych elementów. Systematyczne i przeprowadzone w odpowiednim czasie obserwacje, zarówno podczas rozwoju kolonii, jak i w trakcie całej fazy eksperymentalnej kolonii są konieczne, aby możliwe było dokonanie skutecznej oceny dobrostanu zwierząt.

Nowe linie należy uważnie monitorować i poddawać standardowej ocenie dobrostanu. Wszystkie linie powinny być oceniane indywidualnie przez odpowiednio przeszkolonych i kompetentnych pracowników podczas rozwoju kolonii i ich utrzymania, a informacje dotyczące określonych zaobserwowanych niepożądanych skutków powinny być zestawione i zgłoszone. Uprawniony personel powinien stosować wszystkie stosowne procedury naukowe i razem z pracownikami sprawującymi opiekę powinien monitorować i prowadzić rejestr skutków występujących w odniesieniu do zwierząt. Humanitarne zakończenia należy ustalać z góry, uwzględniając parametry takie jak utrata masy ciała, stan fizyczny i zachowania będą przedmiotem zainteresowania, a także szczegółowe cechy rozwojowe. Nie należy utrzymywać przy życiu żadnego ze zwierząt, jeżeli przekroczona zostanie granica przewidywanej dotkliwości, chyba że zwierzę to jest szczególnie ważne z naukowego punktu widzenia, jednak w takiej sytuacji konieczne jest pozwolenie wydane przez właściwy organ.

Charakter, wybrany moment przeprowadzenia i czas trwania obserwacji będą zależne od liczby czynników innych niż zastosowana mutacja. Na przykład cechy genetyczne i warunki środowiskowe, w których zwierzęta są trzymane, mogą znacząco zmienić ekspresję fenotypu. Należy dokładnie odnotować te określone czynniki, aby ułatwić w większym stopniu porównania między obiektami oraz ogólne monitorowanie zwierząt zmienionych genetycznie. 08).Należy także uwzględnić długość życia każdej linii w obrębie poszczególnego obiektu, ponieważ niektóre fenotypy pojawiają się późno, a więc ich zaobserwowanie będzie możliwe tylko jeżeli zwierzęta trzymane są przez dłuższy okres czasu.

Źródła

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (dostępne na stronie internetowej: http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport).
Wells DJ i in. (2006) *Assessing the welfare of genetically altered miceLaboratory Animals* **40(2):** 111-114 (dostępne na stronie internetowej: http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0).

2 Przykłady

Trzy przykłady w sekcjach 2.1–2.3 poniżej przedstawiają sposób dokonywania oceny stopnia dotkliwości w przypadku myszy zmienionych genetycznie, w tym przegląd krytycznych etapów rozwoju, wpływ procedur i rozwój kolonii. W każdym przykładzie uwzględnia się przede wszystkim zasady oceny stopnia dotkliwości zamiast analizować każdy możliwy scenariusz w ramach rozwoju kolonii.

Stworzenie każdego modelu będzie przebiegać zgodnie z unormowanymi procedurami wymagającymi poddania osobników męskich będących reproduktorami chirurgicznemu zabiegowi wazektomii, manipulacji zarodkami i ich implantacji chirurgicznej w organizmie biorcy będącego osobnikiem żeńskim w stanie ciąży urojonej. Zakłada się stosowanie dobrych praktyk, zgodnie z którymi przestrzega się warunków aseptycznych, kontroluje się ból i zapewnia się obecność kompetentnego chirurga.

Potwierdzenie obecności w potomstwie założyciela lub potomstwie otrzymanym z linii zarodkowej zostanie ustalone na podstawie próbek tkanek uzyskanych jako produkt uboczny identyfikacji (nacinanie uszu) lub za pomocą metody mniej inwazyjnej, która zapewni odpowiednie tkanki do wykorzystania przy ocenie genotypu. Strategia fenotypowa dla każdej linii będzie zależna od genu, obszaru badań i przewidywanych skutków. Ocena stopnia dotkliwości będzie przeprowadzana na podstawie serii unormowanych obserwacji.

2.1 Model myszy zmienionej genetycznie – *GeneA*$^{tm1a(Funding)Lab}$

2.1.1 Kontekst ogólny

Za pomocą nowej mutacji w genie *GeneA*, która była ukierunkowana na linię zarodkowych komórek macierzystych otrzymanych ze szczepu źródłowego C57BL/6N o nieznanym potencjale fenotypowym, stworzono kolonię myszy. Model utrzymano w określonym szczepie źródłowym (C57BL/6N). Po ustanowieniu transferu linii zarodkowej myszy G1 przeprowadzono podstawowe badanie oceny dobrostanu, wykorzystując w tym celu 30 młodych z 3–5 miotów z niezależnych kryć. Potomstwo monitorowano na ustalonych krytycznych etapach rozwoju kolonii: w momencie urodzenia, 14 dni po urodzeniu (w połączeniu z identyfikacją młodych i odzyskiwaniem tkanek w celu genotypowania) oraz w chwili odsadzenia od matki. Opracowano odpowiedni formularz oceny punktowej na podstawie programu oceny dobrostanu zwierząt zmienionych genetycznie (Wells i in. 2006). Zootechnicy wraz z osobami zarządzającymi koloniami, które monitorują wskaźniki genotypu, prowadzili obserwacje młodych na etapie pobytu klatce. W miarę możliwości myszy trzymano w grupach po odsadzeniu od matki, w wentylowanych oddzielnie klatkach wyposażonych w ściółkę, materiały do budowy gniazd i z zapewnionym odpowiednio urozmaiconym środowiskiem. Zootechnicy podczas codziennych interakcji dokonywali oceny na etapie pobytu zwierząt w klatkach aż do momentu osiągnięcia przez myszy dojrzałości płciowej. Oceny długoterminowe dotyczące niepożądanych skutków dla dobrostanu związanych z wiekiem monitorowano i rejestrowano na podstawie obserwacji zwierząt należących do hodowli podstawowej i przyszłych zwierząt hodowlanych. Wszystkie obserwacje porównano ze szczepem źródłowym i oceniono ich przydatność.

2.1.2 Ocena

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Punkty końcowe**
Podstawowe skutki zmiany genetycznej.	Genetyczna modyfikacja może powodować niepożądane skutki	Stałe monitorowania na etapie trzymania zwierząt w klatkach.	Zwierzęta zostaną uśmiercone, jeżeli stopień dotkliwości

	kliniczne. W przypadkach, w których skutki te są nieprzewidywalne, każda oznaka świadcząca o tym, że u zwierząt poddanych mutacji nastąpiła zmiana normalnych fizycznych lub behawioralnych parametrów (tj. tych parametrów, o których wiadomo, że występują w fenotypach powiązanych z cechami genetycznymi lub myszy kontrolnych szczepu dzikiego) może wskazywać na problem naruszenia dobrostanu.	Ocena dobrostanu w określonych momentach rozwoju; narodziny, odsadzenie i dojrzałość płciowa. W zależności od charakteru każdego z wykrytych niepożądanych skutków w miarę możliwości zastosowane zostaną czynniki łagodzące, takie jak zmienione strategie hodowli lub udoskonalenia hodowli (np. większa ilość materiałów do budowy gniazd w celu rozwiązania problemu pogorszenia termoregulacji).	przekroczy poziom umiarkowany.
Pobieranie próbek tkanek do celów genotypowania.	Możliwy ból lub stres wywołany metodą pobierania próbek tkanek, np. nakłuwanie uszu/nacinanie uszu lub pobieranie próbki z koniuszka ogona Biopsja ogona jest powszechnie stosowana w przypadkach, w których wymaga się pobrania większych ilości DNA, jednak może powodować ból krótko-i długotrwały (ból długotrwały spowodowany przez powstawanie	W przypadkach identyfikowania zwierząt metodą nacinania uszu dobrą praktyką jest wykorzystywanie w miarę możliwości tkanek usznych do celów genotypowania W przypadku pobierania próbki z koniuszka ogona należy pobierać minimalną ilość materiału (mając na uwadze, że powtarzanie procedury pobierania próbki jest	Nie ma zastosowania, ponieważ procedura powinna być wykonywana jednorazowo i nie jest prawdopodobne, aby spowodowany ból lub stres osiągały poziom, w przypadku którego uśmiercanie w sposób humanitarny byłoby konieczne.

	nerwiaków)	wysoce niewskazane), w razie potrzeby należy zastosować znieczulenie i analgezję, a problem nadmiernego krwawienia należy niezwłocznie rozwiązać. Nowe rozwiązania w zakresie technik mniej inwazyjnych należy monitorować, oceniać lokalnie i wdrażać w miarę możliwości.	
Fenotypowanie.	Stres wywołany czynnościami wymagającymi kontaktu lub zastosowaniem testu fenotypowego, np. stres związany z umieszczeniem zwierzęcia w nieprzyjaznym otoczeniu, podawanie związków eksperymentalnych w celu wywołania reakcji, monitorowanie zakażenia, znieczulenie i unieruchomienie w celu poddania obrazowaniu itd.	Szkolenia pracowników przeprowadzających fenotypowanie w zakresie wykonywania czynności wymagających kontaktu ze zwierzętami oraz obserwacji w sposób kompetentny, empatyczny i znormalizowany. Stosowanie znieczulenia podczas obrazowania lub wykonywania innych bolesnych procedur. Usystematyzowanie testów fenotypowych w taki sposób, aby przechodzić od testów najmniej inwazyjnych (np. obserwacja na otwartej przestrzeni) do testów najbardziej inwazyjnych (np.	W przypadku gdy mutacja wywoła dotkliwą reakcję na test fenotypowy, osiągnięte zostaną humanitarne punkty końcowe i zwierzęta zostaną uśmiercone w sposób humanitarny.

		procedury wymagające znieczulenia).	

Badany gen jest nową mutacją, aczkolwiek nieznane są skutki niepożądane. Doświadczenie w tym zakładzie pokazało, że znaczna część podobnych modeli zasadniczo odznacza się fenotypem łagodnym. W niektórych przypadkach w ramach modelu będą jednak niespodziewanie ujawniać się umiarkowane objawy kliniczne i dlatego też, na tej podstawie w tym przykładzie ewentualny stopień dotkliwości zostałby uznany za UMIARKOWANY.

2.1.3 Wyniki

Wstępna ocena noworodków (w momencie narodzin):

Kolor młodych **(tylko w przypadku noworodków)**	W normie
Zachowania młodych **(tylko w przypadku noworodków)**	W normie
Prosaki **(tylko w przypadku noworodków)**	Zaobserwowano
Miot	Wszystkie młode spełniały parametry podstawowe w odniesieniu

	do rozmiaru miotu, homogeniczności miotu, rozwoju i wzrostu młodych.

Po upływie 14 dni od narodzin i odsadzeniu od matki zaobserwowano następujące wskaźniki.

Wygląd ogólny	Wszystkie młode były pod względem morfologicznym „normalne” Nie zaobserwowano cech wskazujących na wady rozwojowe
Wielkość, uformowanie i rozwój	Rozwój w normie, zgodny ze standardową krzywą rozwoju w przypadku szczepu źródłowego
Stan sierści	W normie
Zachowanie – Postawa, chód, aktywność i interakcje z otoczeniem	Zachowania i interakcje z wszystkimi zwierzętami w klatce w normie; nie zaobserwowano hiperaktywności i agresji
Objawy kliniczne	Brak
Względna wielkość	W normie w porównaniu ze szczepem źródłowym
Liczby	Współczynnik śmiertelności przed odsadzeniem był w normie w porównaniu z szczepem źródłowym

Obserwacje kliniczne

Wszystkie obserwacje i wskaźniki odnoszące się do noworodków przed odsadzeniem uznano normalne w stosunku do źródłowych cech genetycznych (C57BL/6N) w przypadku myszy homozygotycznych, heterozygotycznych i myszy szczepu dzikiego urodzonych z zachowaniem normalnych proporcji Mendla.

W wieku 4 tygodni myszy homozygotyczne i myszy szczepu typu dzikiego (7+7) zostały poddane serii testów obserwacyjnych i proceduralnych o charakterze łagodnym, takich jak SHIRPA, dysmorfologia, test „pustego pola", parametry biochemiczne krwi, obrazowanie przy użyciu aparatów DEXA i FAXITRON przez okres 16 tygodni. W końcowej części tego eksperymentu analiza fenotypowa wykazała obniżenie klirensu glukozy u myszy homozygotycznych po przeprowadzeniu dootrzewnowego testu tolerancji glukozy (ipGTT). Chociaż poziom klirensu glukozy obniżył się w trakcie badania, po przeprowadzeniu procedury wszystkie zwierzęta wróciły do stanu wyjściowego i nie odnotowano żadnych innych niepożądanych skutków.

2.1.4 Analiza wyników

Ocena rzeczywistej dotkliwości

Po założeniu kolonii do jej utrzymania i rozwoju użyto myszy heterozygotycznych i osobników szczepu dzikiego z tego samego miotu. Nie zaobserwowano szkodliwych fenotypów wu żadnej z myszy użytych do hodowli i utrzymania, więc uznano, że nie będzie żadnych skutków niepożądanych. Ponieważ nie przewiduje się żadnych szkodliwych fenotypów, linia ta mogłaby zostać w związku z tym utworzona jako homozygotyczna i utrzymywana bez konieczności wydania pozwolenia na projekty.

Opisane powyżej kojarzenie myszy heterozygotycznych x myszy heterozygotycznych doprowadziło do utworzenia myszy homozygotycznych. Grupę tych myszy wykorzystano do standardowego badania w zakresie fenotypowania obejmującego serię łagodnych protokołów, w tym wkłucie igły w celu pobrania próbki krwi podczas dootrzewnowego testu tolerancji glukozy. Jednocześnie poddano testom myszy kontrolne szczepu dzikiego. Łączny wpływ na myszy byłby łagodny ze względu na pobieranie próbek krwi i dalsze procedury fenotypowania w przeciwieństwie do ogólnego wpływu na zmianę genetyczną.

Podsumowanie

Hodowla i utrzymanie – brak skutków niepożądanych

Myszy homozygotyczne + myszy szczepu dzikiego – ŁAGODNY – na podstawie badań przesiewowych (brak skutku zmiany genetycznej)

Podsumowując, można uznać, że linia myszy zmienionych genetycznie zawiera nieszkodliwy fenotyp. Hodowla stabilnych linii nie wymagałaby wydania pozwolenia na projekty na mocy dyrektywy.

2.2 Model myszy zmienionej genetycznie – *Tg(GeneB)*^{Labcode}

2.2.1 Kontekst ogólny

Założona zostanie kolonia myszy z mutacją polegającą na nadekspresji transgenu jako model do badań nad pewną formą nowotworu. Linia zostanie stworzona na bazie szczepu C57BL/6N. Nie można jednak zdefiniować wystąpienia i tempa rozwoju nowotworu i będzie to wymagać oceny w ramach charakterystyki modelu. Po powstaniu linii założyciela przeprowadzone zostanie podstawowe badanie oceny dobrostanu zgodnie z opisem zawartym w sekcji 2.1. Najbardziej użyteczna linia będzie rozwijana w celu prowadzania badań nad tym typem białaczki.

2.2.2 Ocena

Jakie procedury będą stosowane wobec zwierząt w ramach tego badania?	**Co będą odczuwać zwierzęta? Jak duże cierpienie może to spowodować? Co może spotęgować ich cierpienie?**	**W jaki sposób cierpienie będzie ograniczane do minimum?**	
	Skutki niepożądane	**Metodyka i interwencje**	**Punkty końcowe**
Ocena i charakterystyka rozwoju nowotworu	Utrata masy ciała i pogorszenie stanu zdrowia będą postępować wraz z rozwojem nowotworu	Interwencje będą opierać się na codziennych obserwacjach z wykorzystaniem kryteriów, takich	Zwierzęta należące do hodowli podstawowej i hodowlane, u których wystąpią objawy kliniczne

	Podskórna opuchlizna może powodować dyskomfort, wpływać na normalne zachowanie, postawę i sprawność ruchową Zwierzęta mogą być bardziej podatne na chorobę ze względu na naruszony system odpornościowy	jak: utrata masy ciała, pogorszenie stanu zdrowia, letarg itd. Codzienne obserwacje i monitorowanie ogólnego stanu zdrowia i rozwoju nowotworu.	nieobjęte procedurami eksperymentalnymi, takiej jak utrata masy ciała o ponad 15 %, zły stan sierści, letarg, zostaną uśmiercone w sposób humanitarny. Zwierzę zostanie uśmiercone w sposób humanitarny, jeżeli guz przekształci się we wrzód lub będzie zakłócał naturalne zachowanie, postawę lub sprawność ruchową zwierzęcia, bądź też jeżeli jego średnica przekroczy 1,2 cm. Zwierzęta wykazujące oznaki złego stanu zdrowia będą uśmiercane w sposób humanitarny.

Badany model zostanie zmutowany w celu stworzenia przewidywanej choroby genetycznej. Nie można łatwo przewidzieć momentu wystąpienia choroby, ale jej objawy kliniczne można z góry określić, aby scharakteryzować moment wystąpienia choroby. Model już scharakteryzowany wymagałby utrzymania w celu umożliwienia korzystania z niego w trakcie kolejnych badań eksperymentalnych w zakresie potencjalnego leczenia tego rodzaju badanego nowotworu. W związku z tym w tym przykładzie ewentualny stopień dotkliwości zostałby uznany za UMIARKOWANY.

2.2.3 Wyniki

Przeprowadzono oceny dobrostanu, jak przedstawiono powyżej w sekcji 2.2. Nie odnotowano żadnych zaburzeń w odniesieniu do krytycznych momentów rozwoju oraz osiąganiu dojrzałości płciowej. Powiększono kolonię o zwierzęta hodowane i przyszłe zwierzęta hodowlane, które

kojarzono od 10. tygodnia życia, aby utrzymać kolonię i stworzyć nowe zwierzęta doświadczalne. Zwierzęta monitorowano w trakcie całego okresu i odnotowano rozwój nowotworu po 18. tygodniu życia u 60 % zwierząt ze zmutowanym genem. Kliniczny przebieg choroby wynosił 4–6 tygodni, a po tym czasie zwierzęta wymagały poddania ich eutanazji.

2.2.4 Analiza wyników

Ocena rzeczywistej dotkliwości

Odnotowano, że u zwierząt ze zmutowanym genem nastąpił rozwój nowotworu u 60 % zwierząt po 18. tygodniu życia. Strategia hodowli zakładała kojarzenie zwierząt po 10. tygodniu życia. Uznano możliwość rozwinięcia się nowotworu u par hodowlanych za wystarczającą w celu dokonania zmian w hodowli i utrzymaniu. Pary hodowlane kojarzono następnie od 6. tygodnia życia i rozdzielono je do 12. tygodnia życia poprzez uśmiercenie osobników płci męskiej. Osobniki płci żeńskiej należące do hodowli podstawowej oraz zmienione genetycznie monitorowano codziennie w celu wykrycia wczesnych objawów rozwoju nowotworu. Zwierzęta, które nie zostały wykorzystane lub nie były potrzebne do badań, zostały uśmiercone w sposób humanitarny, zanim pojawiły się jakiekolwiek objawy kliniczne.

Podsumowanie

Zwierzęta przed 18. tygodniem życia – brak niepożądanych skutków
Zwierzęta, u których rozwijał się nowotwór po 18. tygodniu życia – ŁAGODNE ze względu na wczesne kliniczne punkty końcowe
Zwierzęta, u których rozwijał się nowotwór po 18. tygodniu życia, i przeznaczone do wykorzystania – ŁAGODNE lub UMIARKOWANE w zależności od zastosowania klinicznych punktów końcowych

2.3 Model myszy zmienionej genetycznie – *GeneC*$^{\mathbf{tm1a(Funding)Lab}}$

2.3.1 Kontekst ogólny

Stworzono kolonię myszy z mutacją w genie *GeneC*, która była ukierunkowana na linię zarodkowych komórek macierzystych otrzymanych ze szczepu C57BL/6N o znanym potencjale fenotypowym, w celu prowadzenia badań nad zachowaniem i pamięcią. Model ten utrzymano w ramach określonego szczepu źródłowego (C57BL/6N). Po ustanowieniu transferu linii zarodkowej myszy G1 przeprowadzono podstawowe badanie oceny dobrostanu.

2.3.2 Ocena

Jak określono w sekcji 2.1, badany gen jest nową mutacją. Celem modelu jest wykorzystanie go w przyszłych badaniach behawioralnych testujących skuteczność nowych środków farmaceutycznych. Doświadczenie w tym zakładzie pokazało, że znaczna część podobnych modeli zasadniczo odznacza się fenotypem łagodnym. W niektórych przypadkach w ramach modelu będą jednak niespodziewanie ujawniać się umiarkowane objawy kliniczne i dlatego też, na tej podstawie, w tym przykładzie ewentualny stopień dotkliwości zostałby uznany za UMIARKOWANY.

2.3.3 Wyniki

Wszystkie obserwacje i wskaźniki uznano za pozostające w normie w porównaniu z źródłem genetycznym tego modelu (C57BL/6N) w przypadku myszy homozygotycznych, heterozygotycznych i myszy szczepu dzikiego urodzonych z zachowaniem normalnych proporcji Mendla.

Po ukończeniu 4. tygodnia życia myszy homozygotyczne i myszy szczepu dzikiego poddano serii obserwacji i testów w celu oceny procesu uczenia się i pamięci. Testy prowadzono przez okres 10 tygodni. W końcowej części tej analizy fenotypowej nie zaobserwowano żadnych szkodliwych fenotypów. Model ten wykorzystano później do badania skuteczności nowych środków farmaceutycznych.

W ramach hodowli myszy heterozygotycznych stworzono zdrowe homozygotyczne zwierzęta, u których ujawniła się podobna zdolność do reprodukcji jak w przypadku szczepu źródłowego. Dlatego też w celu ograniczenia liczby zwierząt zastosowano strategię hodowli polegającą na kojarzeniu homozygotycznym. W przeciwieństwie do kojarzenia pierwotnego, w ramach którego myszy homozygotyczne powstały z kojarzenia osobników heterozygotycznych z osobnikami heterozygotycznymi, nowa grupa zwierząt homozygotycznych powstała z homozygotycznego kojarzenia rodziców okazała się charłacza i nie zdołała osiągnąć wielkości i wagi swojego rodzeństwa.

Chociaż przeznaczeniem linii był pierwotnie model zachowania i pamięci, przeprowadzono także dalszą analizę tkanek i krwi otrzymanych z tych zwierząt. Podczas analizy wyników biochemii krwi i przeglądu kolejnych publikacji ustalono, że gen *GeneC* stanowi niezbędne białko transportowe, które wiąże witaminę B12. Delecja genu *GeneC* skutkowała naruszeniem mechanizmu transportu pozakomórkowego, co wpływało w negatywny sposób na syntezę DNA i metabolizm tłuszczu i białek. Wpływ tej mutacji nie byłby widoczny u myszy urodzonych przez heterozygotycznego osobnika płci żeńskiej, ponieważ matczyne źródło witaminy B12 jest przenoszone w łonie matki przez łożysko do rozwijającego się płodu. Dlatego też pierwotny *knock-out* w przypadku tego genu przewidywał przechowanie wystarczającej ilości witaminy

B12, aby umożliwić mu przetrwanie i rozwijanie się przynajmniej do 16. tygodnia życia, zapewniając normalną hodowlę i płodność szczepu źródłowego.

2.3.4 Analiza wyników

Ocena rzeczywistej dotkliwości

Przykład ten pokazuje, że utrzymanie kolonii może mieć znaczący i często nieoczekiwany wpływ na myszy. Na podstawie dostępnych wcześniej informacji i wyników pierwotnych hodowli i fenotypowania kolonia nie wyróżniałaby się niczym nadzwyczajnym. Logicznie rzecz ujmując, utrzymywanie kolonii zgodnie z homozygotyczną strategią kojarzenia w normalnych okolicznościach zapewniałoby pozyskiwanie minimalnej liczby zwierząt, co jest pożądane, aby ograniczyć wykorzystanie zwierząt. Nieprzewidziane szkodliwe fenotypy mogą wystąpić w liniach utrzymywanych wcześniej jako normalne zwierzęta bez pozwolenia na prowadzenie projektów. Na skutek niepożądanego wpływu na dobrostan zwierząt w tym przykładzie należałoby objąć ten model z powrotem pozwoleniem na projekty, gdyby zastosowano ten typ programu hodowli.

Podsumowanie

Hodowla i utrzymanie par heterozygotycznych – brak skutków niepożądanych

Hodowla i utrzymanie par homozygotycznych – umiarkowana dotkliwość w przypadku potomstwa tej generacji ze względu na charłaczenie i brak rozwoju

Przykład 2.3 – uwzględnia się tu w szczególności potrzebę przekazywania dokładnych i przydatnych danych związanych z dobrostanem między instytutami w przypadku gdy szkodliwe fenotypy mogą się ujawnić, na przykład w postaci „paszportu genetycznego myszy”[i].

[i] RSPCA GA Passport Working Group (2010) GA Passports: *The Key to Consistent Animal Care.* Southwater, UK: RSPCA (dostępne na stronie internetowej: http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport).