

MARIA MINTA, BOGDAN WŁODARCZYK, BOGUMIŁ BIERNACKI, JAN ŻMUDZKI

Możliwości ograniczenia liczby zwierząt w badaniach toksykologicznych

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Metody stosowane dotychczas w badaniach toksykologicznych, mimo że nie spełniają wszystkich potrzeb, posiadają swoją ugruntowaną pozycję (40). Są one rezultatem wielu lat pracy i jeśli są wykonywane zgodnie z określonymi wymogami (21, 30, 36), ciągle stanowią podstawowe źródło wiedzy toksykologicznej niezbędnej przy ocenie ryzyka toksykologicznego dla człowieka. Badania te są jednak bardzo czasochłonne i wymagają dużego nakładu pracy. Związane są przy tym z użyciem dużej liczby zwierząt. Największy wzrost zapotrzebowania na zwierzęta laboratoryjne do doświadczeń nastąpił w latach 70-tych. Wydaje się, że głównym tego powodem było rygorystyczne przestrzeganie testowania na nieszkodliwość leków, dodatków do żywności, środków ochrony roślin i innych grup produktów przez instytucje odpowiedzialne za zdrowie (np. WHO, FDA w USA, PZH w Polsce, etc.). Bezpośrednią przyczyną wprowadzenia obowiązku badania każdego leku były wydarzenia, które okazały się niezamierzonymi doświadczeniami na ludziach. Przykładem może być tragedia talidomidowa, w której przekonano się o teratogennym działaniu leku, wprowadzonego przedwcześnie i bez wyczerpujących badań. Dane pochodzące z krajów, w których zużycie zwierząt jest rejestrowane wskazują, że z ogólnej liczby około 100 mln kręgowców poświęconych co roku do doświadczeń 20–25% przeznaczają się dla badań nad lekami, a 10–15% dla celów toksykologii (41).

W ostatnich trzydziestu latach notuje się w wielu krajach, także w Polsce, nasilenie akcji protestacyjnych przeciwko masowemu wykorzystywaniu zwierząt dla celów doświadczalnych. Poza niemożliwymi do zaakceptowania motywami emocjonalnymi (wypuszczenie zwierząt doświadczalnych na wolność, całkowity zakaz wykonywania doświadczeń na zwierzętach) trudno nie zgodzić się z racjonalnymi argumentami tych protestów (19). Niektóre bowiem testy toksykologiczne są wyjątkowo brutalne np. badanie działania żrącego i drażniącego oko i skórę i ich wykonywanie sprawia zwierzęciu duży ból. Inne np. oznaczanie DL_{50} opierają się na śmiertelnościowym wskaźniku oraz doprowadzeniu do silnych objawów klinicznych zatrucia. Częstym zjawiskiem jest także, wynikające z braku właściwej informacji naukowej, powielanie badań lub wykonywanie doświadczeń nieprzydatnych.

Działania na rzecz ochrony zwierząt doświadczalnych

Na podstawie przeglądu aktów prawnych w zakresie ochrony zwierząt na świecie można stwierdzić, że wykorzystywaniu zwierząt do doświadczeń stale towarzyszyła troska o ich los (24). Już w 1822 r. ukazała się Brytyjska ustawa przeciw okrucieństwu wobec zwierząt, rozszerzona w 1876 r. o elementy wyznaczające zasady prowadzenia doświadczeń na zwierzętach. Podobna ustawa w USA (Animal Welfare Act) została uchwalona w 1966 r. Te i inne akty prawne nie były jednak w stanie zapobiec masowemu i dość dowolnemu używaniu zwierząt dla celów doświadczalnych (15, 31). Zaobserwowane nieprawidłowości w wykonywaniu badań spowodowały, że w wielu krajach Europy Zachodniej wydano szereg przepisów i decyzji administracyjnych, dotyczących warunków i zasad ochrony zwierząt oraz eksperymentowania na nich (7–10, 23). Do najważniejszych należą:

- Wytyczne ICLA (International Committee for Laboratory Animals) z 1974 r.;
- Europejska Konwencja o ochronie zwierząt kręgowych używanych do celów doświadczalnych oraz innych celów naukowych przyjęta przez Radę Europy 18 marca 1986 r. w Strasburgu;
- Dyrektywa Rady UE 86/609/EEC „o ochronie zwierząt stosowanych do doświadczeń i innych celów naukowych”;
- Dyrektywa Rady UE 86/35/EEC „zakazująca od 1.01.1998 r. wprowadzania na rynek produktów kosmetycznych, których składniki były badane na zwierzętach” (ze względu na brak uwierzytelnionych metod alternatywnych termin ten został przesunięty do 30.06.1998 r.);
- wprowadzenie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej – „Good Laboratory Practice” (w USA w 1978 r.), „Grundsätze der Guten Laborpraxis” (w RFN w 1990 r.).

W Polsce pierwszym dostępnym aktem prawnym w tym względzie jest ustawa z 1928 r. o ochronie zwierząt, uzupełniona w 1959 r. o elementy dotyczące zwierząt doświadczalnych (10, 11, 12). Od 1961 r. kraj nasz jest członkiem Międzynarodowego Komitetu ds. Zwierząt Laboratoryjnych (ICLA) przekształconego w 1979 r. w Międzynarodową Radę ds. Zwierząt Laboratoryjnych (ICLAS). Od 21 sierpnia 1997 r. obowiązuje w kraju nowa ustawa o ochronie zwierząt (13),

która powinna przyczynić się zarówno do wcielenia w życie uregulowań prawnych jak i przestrzegania norm etycznych. Wymiernym efektem takich działań jest tworzenie w ośrodkach naukowych komisji bioetycznych zajmujących się całokształtem problematyki doświadczeń na zwierzętach (32, 42).

Nowe strategie badań

W ciągu ostatnich kilkunastu lat w krajach wysoko uprzemysłowionych podejmowane są nowe projekty badawcze zmierzające do ograniczenia badań na zwierzętach i tam gdzie to możliwe wprowadzania innych modeli doświadczalnych (39). Na skalę międzynarodową problemem nowelizacji i weryfikacji metod prowadzenia badań zajmuje się Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD). Wszystkie działania w tym zakresie uwzględniają przede wszystkim zasadę 3R:

- ograniczenie liczby zwierząt (ang. Reduction);
- doskonalenie metod w kierunku zmniejszenia cierpień zwierząt w eksperymencie (ang. Refinement);
- zastępowanie zwierząt w eksperymencie przez modele badawcze nie odczuwające cierpień (ang. Replacement).

Pomysłodawcami tej idei byli Anglicy Russel i Burch, którzy w 1959 r. nakreślili jej zasady (3).

O ile przez wiele lat zasada 3R nie znajdowała zrozumienia to obecnie jest ona drogowskazem dla nowych strategii prowadzenia badań biomedycznych (3, 37, 43). Dla metod pozwalających realizować zasadę 3R przyjęto nazwę metod alternatywnych (34, 38). W wielu krajach powstały fundacje i instytucje zajmujące się metodami alternatywnymi i opracowujące nowe programy badawcze (16, 37, 39). Jednym z najstarszych jest program FRAME (The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments), którego założenia powstały już w 1969 r., natomiast realizacja rozpoczęła się dopiero w latach 80-tych (1). Dla koordynowania realizacji tych zamierzeń w Europie i czuwania nad prawidłowym rozwojem badań alternatywnych Parlament UE w Brukseli powołał ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods).

W naszym środowisku naukowym zagadnienia te są od jakiegoś czasu także dostrzegane i były między innymi przedmiotem dwóch konferencji zorganizowanych z inicjatywy Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego: „Jakość Badań w Toksykologii” (Supraśl k. Białegostoku, czerwiec 1993 r.); „Ocena Działania Toksykologicznego Substancji Chemicznych – Metody i Strategie Postępowania” (w ramach VI Zjazdu PTT w Nałęczowie, wrzesień 1996 r.).

Metody alternatywne w toksykologii

Trzeba w tym miejscu wyraźnie podkreślić, że bardzo często metody alternatywne mylnie utożsamia się z technikami *in vitro*, podczas gdy jest to bardzo ważne lecz tylko jedno z możliwych rozwiązań (tab. 1).

Tab. 1. Cechy metod alternatywnych

1. zmniejszające liczbę zwierząt w eksperymencie
2. zmniejszające lub znoszące ból
3. zastępujące badanie na zwierzętach poprzez:
– badania epidemiologiczne
– badanie zależności struktura–aktywność
– modelowanie toksykokinetyczne
– bazy danych i analizę danych archiwalnych
– metody <i>in vitro</i> : z użyciem hodowli komórkowych, tkankowych i narządowych, zarodków ssaków i organizmów niższych

Spośród trzech możliwości jakie oferują metody alternatywne (3R), najłatwiejsze do natychmiastowej realizacji wydają się być metody uwzględniające zmniejszenie cierpienia zwierząt w doświadczeniu i umożliwiające zredukowanie liczby zwierząt użytych do badania, bez pomniejszenia wartości uzyskanych wyników i osiągnięcia założonego celu (33, 38). Przykładem może być badanie toksyczności ostrej doustnej. W metodzie klasycznej oznaczenie DL_{50} dla jednego związku chemicznego wymagało użycia 40–60 zwierząt (25) lub przy zastosowaniu zmodyfikowanej wersji badania 20–30 zwierząt (26). Obecnie dostępne są trzy metody oznaczania toksyczności ostrej doustnej:

1. Metoda ustalonej dawki – ang. Fixed Dose Procedure (FDP)

2. Metoda klasy toksyczności ostrej – ang. Acute Toxic Class (ATC)

3. Metoda dawki skokowej – ang. Up and Down.

Metody te zapewniają znaczne ograniczenie liczby zwierząt (nawet do 6 w metodzie UP and Down), obniżenie dawki granicznej z 5000 do 2000 mg/kg m.c. i rezygnację z określania ostrej toksyczności opartej na śmiertelności w metodzie FDP (dzięki wprowadzeniu klasyfikacji opartej na dawkach wywołujących ewidentne efekty toksyczne). Dane odnośnie wykonania tych metod można znaleźć w szczegółowych opracowaniach (27, 28, 29).

O wiele trudniejsza, a w niektórych przypadkach niemożliwa, jest realizacja zasady trzeciego R (replacement). W chwili obecnej całkowite wyeliminowanie zwierząt z doświadczeń i zastąpienie ich modelami *in vitro* nie jest możliwe głównie z powodu braku uwierzytelnionych (zwalidowanych) metod (2, 16, 35). Na podstawie dotychczasowej wiedzy ocenia się, że po to aby nowa metoda mogła być zaakceptowana (aby wyniki uzyskane przy jej użyciu spełniały zakładane cele tak jak to ma miejsce w przypadku badań *in vivo*) potrzeba około 10 lat (33). Jest to zarazem okres jaki musi upłynąć od pierwszej publikacji metody do umieszczenia wśród metod OECD (tab. 2).

Tab. 2. Rozwój nowej metody – wymagane etapy badań przed umieszczeniem jej wśród metod OECD (33)

Etap	Lata										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Opracowywanie metody	→										
Ocena wstępna			→								
Walidacja część 1					→						
Walidacja część 2						→					
Ocena niezależna								→			
Zatwierdzenie metody									→		

Tab. 3. Prawdopodobieństwo powodzenia zastąpienia badań na zwierzętach metodami *in vitro* (37)

Rodzaj badania	Ocena: jakościowa/ilościowa
Toksyczność ostra p.o.	małe/małe
Toksyczność ostra (narażenie przez skórę)	duże/małe
Toksyczność ostra (narażenie inhalacyjne)	b. małe/małe
Działanie drażniące na oko	b. duże/duże
Działanie drażniące na skórę	duże/duże
Działanie żrące na skórę	b. duże/b. duże
Działanie uczulające	b. duże/duże
Toksyczność (28 dni)	małe/b. małe
Działanie teratogenne	duże/małe
Badania wielopokoleniowe	małe/b. małe
Toksyczność podchron. (90 dni)	b. małe/b. małe
Toksyczność przewlekła	b. małe/b. małe
Działanie kancerogenne	b. małe/duże
Wchłanianie przez skórę	/b. duże
Metabolizm	b. duże/duże

Najbardziej pożądane byłoby wyeliminowanie lub zastąpienie innymi drastycznych testów toksykologicznych sprawiających szczególne cierpienie zwierzętom. Przykładem może być metoda oceny działania drażniącego i żrącego na skórę i oko królika (6). Nowe wytyczne OECD zakładają nawet zaniechanie testów *in vivo* jeśli działanie żrące substancji jest udowodnione lub może być zbadane za pomocą dobrze do-

kumentowanego testu alternatywnego lub przewidziane na podstawie zależności budowa–toksyczność. Potwierdzającą próbę *in vivo* wykonuje się już tylko na pojedynczych królikach, tylko ze związkami, dla których w ww. testach uzyskano wyniki negatywne (38).

Istnieją także duże szanse zastąpienia metodami alternatywnymi takich testów toksykologicznych jak badanie metabolizmu, wchłaniania przez skórę, działania uczulającego oraz niektórych rodzajów toksyczności ostrej (17, 33, 37, 38).

Z oczywistych powodów nie do zastąpienia są badania, w których mechanizm toksycznego działania jest niespecyficzny i wielokierunkowy (toksyczność przewlekła, podchroniczna, badania wielopokoleniowe i toksyczność powtarzana – 28 dni) (tab. 3).

Wiele kontrowersji wzbudzają próby zastąpienia metod *in vivo* w ocenie toksyczności reprodukcyjnej (5, 22). Na podstawie istniejącej wiedzy wiadomo jest, że czynnik toksyczny zależnie od fazy rozwoju prenatalnego może być przyczyną określonych zaburzeń (gametotoksyczność, embriotoksyczność, teratogenność, fetotoksyczność i zaburzenia funkcjonalne). W ostatnich 20 latach opracowano dla celów badania teratogenności około 30 testów z użyciem różnych modeli doświadczalnych, które obejmują pierwotne lub ustalone linie komórkowe, hodowle tkankowe, hodowle zarodków ssaków (tab. 4). Jak dotąd główny wkład tych metod polega na dostarczaniu informacji o mechanizmach działania prowadzących do zaburzenia rozwoju prenatalnego.

Niektóre testy mogą spełniać rolę przesiewowych i w ten sposób poprzez eliminację związków najbardziej niebezpiecznych zmniejsza się liczba związków przeznaczonych do badań embriotoksycznych i teratogennych na zwierzętach (14).

W tym miejscu trzeba dodać, że w odróżnieniu od medycyny, gdzie dominuje problem teratogennego działania leków i ksenobiotyków, w weterynarii bardziej istotne (głównie z powodów ekonomicznych) wydaje się być wykrywanie czynników środowiskowych będących przyczyną zwiększonej obumieralności zarodków (20). Wiadomo jest, że mimo intensywnych badań wiedza nt. przyczyn wysokiej śmiertelności zwierząt hodowlanych, zwłaszcza w okresie przedimplantacyjnym, jest ciągle fragmentaryczna. Możliwość taką stwarza, jak się wydaje, metoda hodowli *in vitro* ko-

mórek pozyskanych z blastocysty – ESC (ang. embryonic stem cells) (18).

Podsumowanie

Potrzeba rozwoju i wprowadzenia metod alternatywnych do badań na zwierzętach w toksykologii jest bardzo pilna. Jednakże brak specyficznych oddziaływań w niektórych rodzajach toksyczności sprawia, że z wielu badań *in vivo* nie można zrezygnować. W związku z powyższym proces ten jest wolniejszy niż w innych badaniach biomedycznych aczkolwiek modyfikacje istniejących metod badań pozwalają na znaczne zmniejszenie liczby używanych zwierząt. Niektóre, choć nieliczne jeszcze metody *in vitro*, dostarczają nowych możliwości, których nie można było osiągnąć w badaniach *in vivo*.

Piśmiennictwo

- Annett B.: ATLA 23, 19, 1995.
- Balls M., Blaauboer B. J., Fentem J. H., Bruner L., Combes R. D., Ekwall B., Fiedler R. J., Guillozo A., Lewis R. W., Lovel D. P., Reinhardt C. A., Repetto G., Śladowski D., Spielmann H., Zucco F.: ECVAM Workshop Report 5. ATLA 23, 129, 1995.
- Balls M., Goldberg A. M., Fentem J. H., Broadhead, Burch R. L., Festing M. F. W., Frazier J. M., Hendriksen C. F. M., Jennings M., Van der Kamp M. D. O., Morton D. B., Rowan A. N., Russell W. M. S., Spielmann H., Stephens M. L., Stokes W. S., Straughan D. W., Yager J. D., Zurlo J., Van Zutphen B. F. M.: ECVAM Workshop Report 11. ATLA 23, 838, 1995.
- Bechter R.: Arch. Toxicol. suppl. 17, 170, 1995.
- Brown N. A., Spielmann H., Bechter R., Flint O. P., Freeman S. J., Jelinek R. J., Koch E., Nau H., Newall D. R., Palmer A. K., Renault J.-Y., Repetto M. F., Vogel R., Wiger R.: The report and recommendations of an ECVAM/ETS Workshop (ECVAM Workshop 12). ATLA 23, 868, 1995.
- Clothier R. H., Atkinson K. A., Garle M. J., Ward R. K., Willshaw A.: ATLA 23, 75, 1995.
- Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official J. of the European Communities L358, 1986.
- Council Directive 93/35/EEC amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of law of the member states relating to cosmetic products. Official Journal of the European Communities L 151, 1993.
- Commission Directive 97/18/EC of 17 April 1997 postponing the date after which animal tests are prohibited for ingredients or combinations of ingredients of cosmetic products. Offic. Journal of the European Communities No L 114/43.
- Czarnomska A.: Nauka 1, 158, 1995.
- Dz. U. nr 42 z 1932, poz. 417. Rozporządzenie Prezydenta RP z 22 marca 1928 r. „O ochronie zwierząt”.
- Dz. U. nr 11 z dnia 16. XI. 1959 r. poz. 452. Rozporządzenie Ministra Szkolnictwa Wyższego w sprawie określenia warunków i sposobu dokonywania doświadczeń na zwierzętach oraz trybu wydawania zezwoleń na przeprowadzanie tych doświadczeń.
- Dz. U. nr 111. z dnia 21 sierpnia 1997 r. poz. 724. Ustawa O ochronie zwierząt.

Tab. 4. Proponowane alternatywne testy w toksykologii rozrodu (4)

Linie komórkowe	Komórki nowotworowe jajnika myszy (MOT)
	Komórki mezenchymalne podniebienia zarodka człowieka
	Komórki nerwiaka niedojrzałego
	Komórki macierzyste zarodka
	Wirus ospy
Pierwotne hodowle komórkowe	Komórki V79
	Komórki zarodka <i>Drosophila</i>
	Komórki tkanki nerwowej
	Komórki zawiązka kończyny
Hodowle narządów	Agregaty komórek mózgowych
	Zawiązek kończyny
Bezkęrowce	Blaszki podniebienia
	Wirki, słuźbie, jeżowce
Zarodki kręgowców	Zarodek krewetki, świerszcza, <i>Drosophila</i>
	Kura (CHEST)
Zarodki ssaków	Ryba, żaba (FETAX)
	Gryzonie i inne

- Faustman E. M.: Mut. Res. 205, 355, 1988.
- Fitko R.: Patol. Pol. 44, 169, 1993.
- Gad S. C.: Toxicology Methods 6, 1, 1996.
- Garle M. J., Fentem J. H., Fry J. R.: Toxic. in Vitro 8, 1303, 1994.
- Laschinski G., Vogel R., Spielmann H.: Reproductive Toxicol. 5, 57, 1991.
- Maciejowski J.: Medycyna Wet. 52, 4, 1994.
- Max A.: Medycyna Wet. 47, 416, 1991.
- Meyer O.: Hum. Exp. Toxicol. 12, 516, 1993.
- Minta M., Włodarczyk B.: Med. Pracy (Suplement 6), 93, 1996.
- Mól H.: Medycyna Wet. 52, 697, 1996.
- Mukerjee M.: Świat Nauki 4, 68, 1997.
- OECD Guideline for the testing of chemicals. No. 401. Acute oral toxicity. Paryż, 1981.
- OECD Guideline for the testing of chemicals. No. 401. Acute oral toxicity. Paryż, 1987.
- OECD Guideline for the testing of chemicals. No. 420. Acute oral toxicity – Fixed dose method. Paryż, 1992.
- OECD Guideline for the testing of chemicals. No. 423. Acute oral toxicity – Acute toxic class method. Paryż, 1996.
- OECD Guideline for the testing of chemicals. No. 425. Acute oral toxicity – Up and down method. Paryż, 1997.
- Pakes S. P.: Fundam Appl Toxicol 15, 17, 1990.
- Prost E. K.: Medycyna Wet. 52, 3, 1996.
- Przepisy i zalecenia dotyczące doświadczeń na zwierzętach stosowane w Uniwersytecie Jagiellońskim. Kraków, 1995.
- Purchase I. F. H.: Toxicology Vitro. 11, 313, 1997.
- Radzikowski Cz.: Nauka 1, 150, 1995.
- Rasmussen E. S.: Hum. Exp. Toxicol. 12, 522, 1993.
- Recommendations for the Harmonisation of International Guidelines for Toxicity Studies. European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre (ECETOC) Monograph No. 7, Brussels, December 1985.
- Rydzynski K., Kuchowicz E.: Med. Pracy (Suplement 6), 51, 1996.
- Rydzynski K.: Med. Pracy (Suplement 6), 17, 1996.
- Trzeciak H. I., Pudelko A.: Acta Pol. Toxicol. 2 (Suplement 1), 31, 1994.
- Van de Sandt J. J. M., Feron V. J.: ATLA 24, 173, 1996.
- Van Zutphen B. F. M., Van der Valk J. B. F.: Proc. 6th EAVPT Congress, Edinburg Scotland, August 1994, s. 145.
- Weiner J.: Nauka 1, 175, 1995.
- Zurlo J., Rudacille D., Goldberg A. M.: Environ. Hlth Perspec. 104, 878, 1996.

Adres autora: dr Maria Minta, ul. Kościuszki 12 m. 5, 24-100 Puławy