

Zasada 3R w praktyce. Poprawa dobrostanu, redukcja liczby zwierząt i doskonalenie metod badawczych w badaniach toksyczności ostrej

© ROBERT SORNAT, © KATARZYNA GRUSZKA, © ANETA POLIŃSKA

Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie,
ul. Doświadczalna 27, 43-200 Pszczyna

Otrzymano 23.07.2021

Zaakceptowano 24.05.2022

Sornat R., Gruszka K., Polińska A.

3R rules in practice. Improvement of welfare, reduction of the number of animals and improvement of test methods in acute toxicity studies

Summary

Research studies in which animals are used contribute to the development and progress of biomedical sciences; however, usage of animals in research has long been the subject of ethical protests. Nevertheless, elimination of this type of research with animals is impossible at the present stage of our knowledge. The controversy of animal usage in laboratory was the beginning of efforts to improve their fate. The 3Rs principle, formulated in the late 1950s, is the ethical foundation for the activities of laboratories using laboratory animals; moreover, it defines the legal framework for animal research. The welfare of laboratory animals is the concern of people working in research centers that perform such tests, including the veterinarians working there, as well as people dealing with legal issues shaping the research market using laboratory animals. The activity of research centers is a kind of compromise ensuring the best conditions for animals, and at the same time ensuring optimal and correct performance of tests in accordance with research standards. The changes in the field of acute toxicity tests in the context of reducing the number of animals, their welfare and the implementation of alternative methods that have occurred in the last few decades can be traced on the example of a center that has been carrying out research in the GLP system since 2000, which is currently the Łukasiewicz Research Network – Institute of Industrial Organic Chemistry Branch Pszczyna (abbreviated Łukasiewicz – IPO), formerly the Institute of Industrial Organic Chemistry Branch Pszczyna.

Keywords: laboratory animals, alternative methods, 3Rs principle

Poprawa dobrostanu zwierząt laboratoryjnych wynika zarówno ze wzrostu społecznej świadomości, z nacisku środowisk walczących o poprawę dobrostanu czy eliminację zwierząt z badań, jak i ze zmieniającego się i ewoluującego prawodawstwa w poszczególnych krajach. Podstawą ewolucji prawa w zakresie dobrostanu zwierząt jest Światowa Deklaracja Praw Zwierząt przyjęta w Paryżu w 1977 r. (7). Deklaracja ta miała niewiążący charakter, ale w znacznym stopniu przyczyniła się do wyznaczenia humanitarnych kierunków rozwoju ochrony zwierząt w prawie międzynarodowym.

Sporządzona dnia 18 marca 1986 r. w Strasburgu Europejska Konwencja w sprawie ochrony zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych była pierwszym międzynarodowym aktem, który wprowadził istotne ograniczania w wykorzystaniu zwierząt dla celów na-

ukowych. Dokument ten wraz z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych wprowadził obowiązujące obecnie w Europie standardy doświadczeń na zwierzętach (7).

W Polsce pierwszym aktem prawnym regulującym kwestie przeprowadzania doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt było Rozporządzenie Prezydenta RP z dnia 22 marca 1928 r. o ochronie zwierząt. Po wojnie rozporządzenie to zostało uzupełnione rozporządzeniem Ministra Szkolnictwa Wyższego z 1959 r. (18). Kolejnymi aktami prawnymi, które jednak nie w pełni dostosowywały polskie prawo do prawodawstwa unijnego były Ustawy: z dnia 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt oraz z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (9). Dopiero Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie

zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych zaimplementowała na rynek polski obowiązujące w Europie standardy doświadczeń na zwierzętach (15). Ustawa reguluje trzy ważne aspekty związane z doświadczeniami na zwierzętach: zasady przeprowadzania doświadczeń, warunki utrzymywania zwierząt oraz zadania i kompetencje komisji etycznych.

Prowadzenie działalności gospodarczej wymaga podejmowania odpowiednich kroków, które często umożliwiają dalszą działalność, szczególnie że przepisy prawa ingerują w wiele obszarów prowadzonej działalności i przy braku działań dostosowawczych mogą stanowić zagrożenie dla jej funkcjonowania, a nawet czasem dla dalszego istnienia (5, 8). W 2017 r. dzięki staraniom kierownictwa ówczesny Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie uzyskał pełną akredytację AAALAC. AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) jest prywatną organizacją non-profit, promującą humanitarne traktowanie zwierząt w nauce poprzez dobrowolne programy akredytacji i oceny. Organizacja ta popiera wykorzystanie zwierząt do postępu medycyny i nauki, gdy nie ma alternatyw niezawierających i gdy odbywa się to w sposób etyczny i humanitarny. Do chwili obecnej ponad 1040 różnych instytucji badawczych w 50 krajach uzyskało akredytację AAALAC. Proces uzyskania akredytacji zbiegł się w czasie ze zmianami, jakie narzuciła ustawa z 2015 r. w obszarze organizacji badań i działania takie były dla Oddziału bardzo korzystne. Z punktu widzenia strategii firmy gwarantowały kontynuację działalności w zgodzie ze zmieniającymi się uwarunkowaniami prawnymi, a przyznana akredytacja zwiększyła prestiż i konkurencyjność na rynku. Spełnienie norm i wymogów, jakie stawia przed laboratoriami AAALAC International, stanowi gwarancję zapewnienia właściwej infrastruktury i przygotowania merytorycznej kadry, a co za tym idzie, zachowania prawidłowego dobrostanu i opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi. Należy oczywiście wspomnieć, że AAALAC International nie jest jedyną organizacją zajmującą się problemem dobrostanu zwierząt. Obok należy wymienić też inne organizacje, jak np.: Animal Welfare Foundation, Laboratory Animals, Understanding Animal Research, Animal Welfare Institute, Institute for Laboratory Animal Research.

Wytyczne OECD oraz zasada 3R a poprawa dobrostanu zwierząt laboratoryjnych

Ciągły rozwój i ewolucja podejścia przez środowiska naukowe do dobrostanu zwierząt i badań z ich wykorzystaniem mają też swoje odzwierciedlenie w permanentnej aktualizacji wytycznych Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) odnoszących się do badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. OECD, skupiająca obecnie 38 wysoko rozwiniętych i demokratycznych państw,

opracowując wspólne zasady i wytyczne, wprowadza podobne normy działania i standardy w poszczególnych dziedzinach gospodarki, w tym też w obszarze badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. Należy podkreślić, że jest to szczególnie ważne dla laboratoriów pracujących w systemie DPL, w którym wytyczne OECD stanowią istotny punkt odniesienia dla stosowanych w badaniach procedur. DPL – Dobra Praktyka Laboratoryjna to system zapewnienia jakości wymaganych prawem nieklinicznych badań laboratoryjnych. W połączeniu z wytycznymi OECD umożliwia zapewnienie podobnych i jednolitych warunków przeprowadzania badań w laboratoriach, a co za tym idzie – powtarzalność i wzajemną uznawalność uzyskiwanych wyników.

Humanitaryzm i odpowiedzialne traktowanie zwierząt w badaniach zapoczątkowała sformułowana pod koniec lat 50. XX wieku zasada 3R, w której zawiera się: Replacement – zastępowanie zwierząt, Reduction – ograniczenie liczby zwierząt i Refinement – udoskonalenie metod polegające na minimalizacji cierpienia i stresu oraz poprawę dobrostanu. Doskonalenie badań z udziałem zwierząt w myśl zasady 3R wyraźnie widać, śledząc zmiany dotyczące wytycznych OECD do badań toksyczności ostrej, które obejmują badania toksyczności ostrej doustnej, toksyczności ostrej skórnej, ostrego drażnienia skóry/działania żrącego i ostrego drażnienia oka/działania żrącego.

Toksyczność ostra doustna i toksyczność ostra skórna

Wytyczną, która określała sposób postępowania w trakcie badania toksyczności ostrej doustnej, była Wytyczna OECD nr 401 (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects-replaced-and-cancelled-test-guidelines.htm>). Pierwsze jej wydanie z 1981 r. zakładało wykorzystanie do wyznaczenia LD50 (Lethal Dose 50 – dawka powodująca zgon połowy narażanych zwierząt) aż 40 zwierząt. W 1987 r. wytyczna ta uległa modyfikacji, dzięki czemu znacząco zredukowano liczbę zwierząt. Zrezygnowano z grupy kontrolnej, a badanie wykonywano na zwierzętach jednej płci, co zmniejszyło liczbę do 15 zwierząt. Dodatkowo wytyczna zakładała rutynowo niewykonywanie badań dla dawek większych niż 2000 mg/kg masy ciała. Przewidywano tzw. test graniczny dla dawki 2000 mg/kg masy ciała, który wykonywano na 10 zwierzętach. Brak śmiertelności w tej dawce kończył badanie.

Głównym założeniem wytycznej 401 było osiągnięcie rosnącej sekwencji dawek w trzech grupach w taki sposób, aby osiągnąć śmiertelność przynajmniej w grupie z najwyższą dawką i na tej podstawie obliczyć odpowiednią metodą LD50. Duża liczba zwierząt oraz śmiertelność jako końcowy parametr, niezbędny do wyliczenia LD50, spowodowały decyzję o ostatecznym wycofaniu Wytycznej 401 od dnia 17 grudnia 2002 r. (2, 4).

Wycofaną wytyczną zastąpiły wytyczne OECD: nr 420 wprowadzona w 1992 r., nr 423 wprowadzona w 1996 r. oraz nr 425 wprowadzona w 1998 r. (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects-replaced-and-cancelled-test-guidelines.htm>). Było to możliwe dzięki opracowaniu nowego podejścia do klasyfikacji substancji chemicznych. Wprowadzony Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania (GHS), który zakładał rezygnację z konieczności wyznaczania LD50, wprowadzając w zamian klasyfikację substancji do odpowiedniej kategorii, umożliwia jej właściwe oznakowanie (11). Wszystkie trzy wytyczne znacząco zmniejszają liczbę wykorzystanych zwierząt w porównaniu z wytyczną 401. W wytycznej 420 punktem końcowym jest wyrażna toksyczność, a nie śmiertelność, a dodatkowo wytyczna wykorzystuje badanie wstępne w celu zminimalizowania liczby zwierząt. Podobnie, zasady ograniczające liczbę wykorzystywanych zwierząt można znaleźć w wytycznej 423, w której badanie opiera się na zasadzie etapowości oraz w wytycznej 425, która zawiera zasadę zatrzymania (https://read.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-acute-oral-toxicity-testing_9789264078413-en#page1). Zasada etapowości wprowadza w badaniu etapy z możliwie najmniejszą liczbą zwierząt i w razie wystąpienia śmiertelności w kolejnym etapie stosuje się niższą dawkę lub kończy badanie, a zasada zatrzymania przerywa badanie dla danej dawki w wypadku wystąpienia śmiertelności.

Najczęściej stosowane były metody 420 oraz 423. Znacząco redukują one liczbę zwierząt w stosunku do metody 401 oraz ograniczają, a nawet całkowicie eliminują śmiertelność jako parametr niezbędny do oceny. W przeciwieństwie do wycofanej metody 401 ściśle definiują poziom dawek, jakimi można narażać zwierzęta. Dla maksymalnego ograniczenia śmiertelności wybór poziomu dawkowania musi być poprzedzony zdobyciem informacji na temat badanej substancji i jej ewentualnej toksyczności (dane fizykochemiczne, testy *in*

vitro i *in vivo*). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na minimalizację ewentualnej śmiertelności jest wspomniana już etapowość postępowania.

Obecnie obowiązująca metoda 420 (<https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>) wyróżnia badanie wstępne, w którym na każdym poziomie dawkowania stosuje się jedno zwierzę. Jeżeli dana dawka jest śmiertelna, to nie wykonuje się eksperymentu dla tej dawki na kolejnych zwierzętach, lecz kontynuuje badanie wstępne, ale dla niższej dawki. Jeżeli badanie wstępne nie daje śmiertelności w danej dawce, to można wykonać badanie właściwe na czterech zwierzętach dla tej dawki.

W metodzie 423 (<https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>) dla minimalizacji śmiertelności, ale zachowania precyzyjnej możliwości klasyfikacji opracowany został inny niż w wytycznej 420 etapowy sposób przeprowadzania badania. W każdym etapie można wykorzystać 3 zwierzęta, przy czym dla poszczególnych dawek można wykorzystać od 3 do 6 zwierząt. W zależności od wyników dla poszczególnych etapów tok postępowania zapewnia użycie minimalnej, niezbędnej do prawidłowej klasyfikacji liczby zwierząt. Przeprowadzenie toku postępowania według wytycznej nr 420 pozwala zaklasyfikować badaną substancję do jednej z sześciu kategorii według klasyfikacji GHS: 1, 2, 3, 4, 5 i 5/niesklasyfikowana. Wytyczna nr 423 jest bardziej precyzyjna i umożliwia określenie, oprócz takich samych, jak wyżej, 6 kategorii według klasyfikacji GHS, także tzw. wartości odciętej LD50, która może wynosić: 5 mg, 25 mg,

Tab. 1. Poszczególne wydania wytycznych dla toksyczności ostrej doustnej i toksyczności ostrej skórnej i stosowane liczby zwierząt

Wytyczna	Rok wydania/aktualizacji	Liczba zwierząt przewidziana w metodzie	Praktyczna liczba zwierząt stosowana w badaniach (na podstawie własnych doświadczeń)
Toksyczność ostra doustna			
OECD nr 401	wydanie 1981	40	nie wykonywano w Łukasiewicz – IPO
	aktualizacja 1987	20	10-20
	wycofanie 2002	–	–
OECD nr 420	wydanie 1992	11-15	11-15
	aktualizacja 2001	7* 1-15	5-6 sporadycznie 2 sporadycznie 7
OECD nr 423	wydanie 1996	7*	6 zazwyczaj dla limit test
	aktualizacja 2001	3-18	rzadko 9 sporadycznie 3 sporadycznie 12
OECD nr 425	wydanie 2008	7*	nie wykonywano w Łukasiewicz – IPO
Toksyczność ostra skórna			
OECD nr 402	wydanie 1981	30	nie wykonywano w Łukasiewicz – IPO
	aktualizacja 1987	15	10 – limit test (sporadycznie 20 dla pełnego badania)
	aktualizacja 2017	9	2-9 dzięki strategii postępowania w oparciu o wytyczne OECD częste odstępianie od badań, wyniki w oparciu o metody szacunkowe bez konieczności wykonania badań na zwierzętach

Objaśnienia: * – liczby podane (średnio w badaniu) w Guidance Document On Acute Oral Toxicity Testing (6)

50 mg, 200 mg, 300 mg, 500 mg, 1000 mg, 2000 mg, 2500 mg, 5000 mg i ponad 5000 mg na kg masy ciała. W obecnie obowiązujących wersjach tych wytycznych dokonano też pewnej korekty poziomów stosowanych dawek, co spowodowało, wraz z innymi zmianami, zredukowanie liczby zwierząt wykorzystywanych w tych badaniach w stosunku do poprzednich wersji wymienionych wytycznych.

Praktyka stosowania w Łukasiewicz – IPO metody 420 z 2001 r. pokazała, że zazwyczaj w doświadczeniu była konieczność wykorzystania od 5 do 6 zwierząt do przeprowadzenia prawidłowej klasyfikacji badanych substancji. W rzadkich przypadkach, przy wysokiej toksyczności badanej substancji wykorzystywano 2 zwierzęta. Sporadycznie też, przy braku jakichkolwiek informacji o możliwej toksyczności badanej substancji, gdy w badaniu wstępnym padły 2 zwierzęta, dla prawidłowej klasyfikacji konieczne było użycie 7 zwierząt łącznie w całym badaniu. W metodzie 423 wykorzystywano od 6 do 9 zwierząt dla prawidłowej klasyfikacji. Stanowi to istotne ograniczenie liczby zwierząt w stosunku do obowiązującej wcześniej metody 401, gdzie konieczne było użycie w pierwotnej wersji wytycznej 40 zwierząt, a po modyfikacji w 1987 r. co najmniej 15 zwierząt. Porównanie liczby zwierząt używanych zgodnie z poszczególnymi wytycznymi w badaniach toksyczności ostrej przedstawiono w tabeli 1.

Wytyczna OECD 402 dotycząca toksyczności ostrej skórnej została wdrożona w 1981 r. Umożliwiała określenie LD₅₀ dla toksyczności skórnej i zakładała wykorzystanie nawet 30 zwierząt. W 1987 r. aktualizacja wytycznej (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects-replaced-and-cancelled-test-guidelines.htm>) zmniejszyła liczbę wymaganych zwierząt, co w sumie umożliwiało wykonanie badania na 15 zwierzętach. Warunkiem koniecznym do obliczenia LD₅₀ było uzyskanie śmiertelności przynajmniej w najwyższej dawce. Dodatkowo wytyczna przewidywała tzw. limit test dla dawki 2000 mg/kg wykonywany na grupie 10 zwierząt. Większość testowanych substancji charakteryzowała się niską toksycznością skórą, dlatego znacząca większość tego rodzaju badań była wykonywana jako limit test. Jeżeli w trakcie badania limit test wystąpiła śmiertelność, to należało przeprowadzić pełne badanie w celu określenia LD₅₀ na zwierzętach płci bardziej wrażliwej. Wymagało to wykorzystania 20 zwierząt, jednak badanie takie wykonywano sporadycznie.

W 2017 r., podobnie jak dla badań toksyczności ostrej doustnej, wytyczna 402 została znowelizowana (<https://doi.org/10.1787/9789264070585-en>). Dawki w badaniu dobrane zostały w oparciu o Globalny Zharmonizowany System (GHS), co odzwierciedla też zmiana nazwy tej wytycznej na: Toksyczność Ostra Skórna: Metoda Ustalanej Dawki. Wyboru dawek dokonuje się pomiędzy wskazanymi przez

wytyczną dawkami, a samo badanie składa się z badania wstępnego i badania głównego. Zmiany i oparcie klasyfikacji na GHS pozwoliło znacząco zredukować liczbę zwierząt od 2 do maksymalnie 9 zwierząt, co jest znaczącą redukcją w porównaniu z poprzednią wersją omawianej wytycznej. Należy również zaznaczyć, że obecnie, po aktualizacji, badanie toksyczności ostrej skórnej często jest wykonywane w oparciu o szacunkowe metody oparte na wynikach uzyskanych z toksyczności ostrej doustnej. Toksyczność ostra doustna powyżej 2000 mg/kg zwalnia z konieczności wykonywania toksyczności ostrej skórnej. Strategia ta opiera się na omówionym w dalszej części artykułu dokumencie OECD pt. „Guidance Document on Considerations for Waiving or Bridging of Mammalian Acute Toxicity Tests Series on Testing & Assessment” (doi.org/10.1787/9789264274754-en). Liczby zwierząt dla pierwotnej wytycznej 402 i po jej aktualizacji przedstawiono w tabeli 1.

Badania drażnienia skóry/działania żrącego, drażnienia oka/działania żrącego

Kolejne dwie wytyczne, w których stosowaniu znacząco zredukowano liczbę zwierząt to wytyczne nr 404 i 405. Obie wytyczne przyjęto w 1981 r.

Wytyczna 404 była aktualizowana w latach 1992, 2002 (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects-replaced-and-cancelled-test-guidelines.htm>) i 2015 (<https://doi.org/10.1787/9789264242678-en>). Na jej podstawie przeprowadza się badanie ostrego drażnienia skóry/działania żrącego na królikach. Pierwsze wydanie wytycznej z 1981 r. przewidywało wykorzystanie trzech królików w badaniu w sposób jednoczesny. W drugim wydaniu z 1992 r., wprowadzono etapowość: najpierw badanie wykonywano na jednym zwierzęciu, a następnie, dla potwierdzenia, na kolejnych dwóch zwierzętach. Wytyczna dawała też możliwość sprawdzenia działania żrącego na 1 zwierzęciu, której to możliwości nie przewidywała już kolejna nowelizacja z 2002 r. Nowelizacja ta wprowadziła test początkowy na 1 zwierzęciu i test potwierdzający na kolejnych 2 zwierzętach. Bardzo istotną zmianą z punktu widzenia dobrostanu zwierząt było zastosowanie w tej wersji wytycznej szczególnej strategii postępowania odnoszącej się do systemu GHS, która pozwalała na podstawie wcześniejszych danych z badań u ludzi lub badań na zwierzętach, na podstawie szacowania właściwości fizycznych i chemicznych czy testów *in vitro*, odstępianie od badań na zwierzętach. Ostatnia aktualizacja z 2015 r., dzięki zintegrowanemu podejściu do testowania i szacowania, zakłada wykonanie testu na zwierzętach jako ostatni krok po wyczerpaniu wszystkich innych możliwości, jeżeli na ich podstawie nie można przeprowadzić klasyfikacji (<https://doi.org/10.1787/9789264274693-en>). Liczby zwierząt dla pierwotnej wytycznej 404 i po jej aktualizacji przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Poszczególne wydania wytycznych dla badania ostrego drażnienia skóry/działania żrącego i ostrego drażnienia/uszkodzenia oka oraz stosowane liczby zwierząt

Wytyczna	Rok wydania/aktualizacji	Liczba zwierząt przewidziana w metodzie	Praktyczna liczba zwierząt stosowana w badaniach (na podstawie własnych doświadczeń)
Ostre drażnienie skóry/działanie żrące			
OECD nr 404	wydanie 1981	3	nie stosowano w Łukasiewicz – IPO
	aktualizacja 1992	1-3	1-3
	aktualizacja 2002 aktualizacja 2015	1-3	test początkowy – 1; test potwierdzający – 2; w 2002 r. – strategia postępowania w odniesieniu do systemu GHS pozwalająca na odstąpienie od badań na zwierzętach, możliwość oparcia klasyfikacji na metodach alternatywnych; w 2015 r. – badanie przeprowadzane w odniesieniu do zintegrowanego podejścia do testowania i szacowania; od 2018 r. w Łukasiewicz – IPO nie przeprowadzono badania drażnienia skóry z wykorzystaniem zwierząt, opierając klasyfikację na metodach alternatywnych
Ostre drażnienie/uszkodzenie oka			
OECD nr 405	wydanie 1981	3/dodatkowo 6	nie stosowano w Łukasiewicz – IPO
	aktualizacja 1987	1-3	1-3
	aktualizacja 2002 aktualizacja 2017 aktualizacja 2020	1-3	test początkowy – 1; test potwierdzający wykonywany sekwencyjnie – 2; w 2002 r. – strategia postępowania w odniesieniu do systemu GHS pozwalająca na odstąpienie od badań na zwierzętach, konieczność oparcia klasyfikacji na metodach alternatywnych, konieczność stosowania środków znieczulających; od 2017 r. – badanie przeprowadzane w odniesieniu do zintegrowanego podejścia do testowania i szacowania; od 2018 r. w Łukasiewicz – IPO nie przeprowadzono badania drażnienia oka z wykorzystaniem zwierząt, opierając klasyfikację na metodach alternatywnych

Wytyczna 405 była aktualizowana w latach 1987, 2002, 2017 (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects-replaced-and-cancelled-test-guidelines.htm>) oraz 2020 (<https://doi.org/10.1787/9789264185333-en>). Na podstawie tej wytycznej przeprowadzane jest badanie ostrego drażnienia oka/działania żrącego na królikach. Pierwsze wydanie wytycznej z 1981 r. przewidywało wykorzystanie trzech królików w badaniu w sposób jednoczesny, przy czym w przypadku substancji drażniących wytyczna dopuszczała wykorzystanie dodatkowych 6 królików, u których stosowano procedurę przepłukiwania oczu. W drugim wydaniu z 1987 r. wytyczna nakazywała analizę fizykochemicznych właściwości, wyniki testów z drażnienia skóry czy zwalidowanych alternatywnych metod, które dawałyby podstawę do odstąpienia od badań w związku z możliwością wywołania uszkodzenia oka. Dodatkowo wytyczna przewidywała wykorzystanie tylko jednego królika w przypadku silnego drażnienia czy uszkodzenia oka, bez konieczności potwierdzania na kolejnym zwierzęciu. Wydanie trzecie z 2002 r. rozdzieliło badanie na test początkowy na jednym zwierzęciu i test potwierdzający wykonywany na dwóch kolejnych zwierzętach, przy czym test potwierdzający należało wykonywać w sposób sekwencyjny, tak aby całe badanie wykonać na 2 królikach, jeśli to było wystarczające dla dokonania klasyfikacji. Zastosowano też, podobnie jak w wytycznej 404, rozbudowaną szczegółową strategię postępowania odnoszącą się do systemu GHS, która pozwalała na podstawie wcześniejszych danych z badań na ludziach

lub badań na zwierzętach, na podstawie szacowania właściwości fizycznych i chemicznych czy testów *in vitro*, odstąpienie od badań na zwierzętach. Ostatnie dwie aktualizacje z r. 2017 oraz z 2020 ([https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2017\)15/REV1%20&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2017)15/REV1%20&doclanguage=en)), dzięki zintegrowanemu podejściu do testowania i szacowania, zakładają wykonanie testu na zwierzętach jako ostatni krok po wyczerpaniu wszystkich innych możliwości, jeżeli na ich podstawie nie można przeprowadzić klasyfikacji. Liczby zwierząt dla pierwotnej wytycznej 405 i po jej aktualizacji przedstawiono w tabeli 2.

Odstąpienie od badań z udziałem zwierząt i zasady pomostowania

Bardzo ważnym dokumentem z punktu widzenia ograniczenia liczby zwierząt w badaniach jest opublikowany w 2016 r. przez OECD dokument pt. „Guidance Document on Considerations for Waiving or Bridging of Mammalian Acute Toxicity Tests”, który szczegółowo rozważa praktyczne możliwości rezygnacji z badań na zwierzętach laboratoryjnych w poszczególnych testach toksyczności ostrej, przy jednoczesnej możliwości klasyfikacji z użyciem różnych metod, w tym również metod alternatywnych (doi.org/10.1787/9789264274754-en). Dokument wprowadza zasady pomostowania (tzw. podejście przekrojowe) zalecające wykorzystywanie istniejącego zbioru danych do scharakteryzowania zagrożenia dla badanej substancji chemicznej, dla której istnieje

niewiele danych na temat jej toksyczności. Badane substancje o nieznanym zagrożeniu mogą być podobne pod względem składu czy formy do innych substancji chemicznych o dokładnie już zdefiniowanej toksyczności i znajomość tego faktu umożliwia skonstruowanie pełnego lub częściowego profilu toksyczności dla badanej substancji z pominięciem badań na zwierzętach. Dokument wskazuje też na konieczność całościowego podejścia i uwzględniania wszystkich dostępnych informacji w procesie klasyfikacji i oznakowania, które to podejście umożliwia minimalizację czy nawet rezygnację z wykorzystywania zwierząt. Podejście takie obejmuje uwzględnianie właściwości fizykochemicznych, rozważenie potencjalnie niewielkiej możliwości lub braku narażenia określoną drogą u ludzi, wykorzystanie istniejących informacji o podobnych lub zbliżonych substancjach, które są już scharakteryzowane pod względem toksykologicznym, a nawet wykorzystanie metod obliczeniowych czy programów symulacyjnych. Nadrzędnym, ogólnym kryterium przemawiającym za odstępniem od badań *in vivo* na zwierzętach jest możliwość pozyskania niezbędnych danych do klasyfikacji zagrożenia dla danej substancji chemicznej drogą zwalidowanych testów *in vitro* lub innych metod alternatywnych. W omawianych tam toksyczności ostrej doustnej i skórnej, drażnienia skóry i oka przewiduje się odstępniem od przeprowadzania badań na zwierzętach, jeżeli badana substancja ma pH mniejsze lub równe 2 lub większe lub równe 11,5 przy jednoczesnej jej wysokiej zdolności buforowania. Wysoka zdolność buforowania przyczynia się do długiego utrzymywania się niskiego czy wysokiego pH przy kontakcie z tkankami, co powoduje oparzenia tkanek. Poza tym dokument szczegółowo określa warunki, dla których należy odstąpić od poszczególnych badań.

Dla toksyczności ostrej doustnej oraz skórnej można odstąpić od badania, jeżeli jest ono technicznie niewykonalne, np. substancja jest parą lub gazem, kształt czy wielkość końcowego produktu zapobiega narażaniu drogą pokarmową czy skórą (np. obrożę dla zwierząt, pułapki czy przynęty, pudełka na przynęty). Nie należy wykonywać badań dla substancji żrących lub silnie drażniących, przy czym określenie takiego działania musi odbyć się na podstawie zwalidowanych i zaakceptowanych metod *in vivo*, *in vitro* lub innych uznanych metod. Od badania można też odstąpić, jeżeli LD₅₀ danej substancji określone na podstawie zaakceptowanych, wystarczająco czułych metod alternatywnych będzie większe od 2000 mg/kg. Odstąpienie można też uwzględnić na podstawie innych badań krótkotrwałych czy badań po podaniu wielokrotnym, gdyż jak pokazuje doświadczenie substancje, u których NOAEL (no observed adverse effect level – poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków) jest równy lub większy od 1000 mg/kg masy ciała na dzień, mają LD₅₀ wyższe od 2000 mg/kg masy ciała.

Ważną przesłankę umożliwiającą odstępniem od badań toksyczności ostrej skórnej dały szczegółowe analizy porównujące klasyfikację toksyczności ostrej doustnej i skórnej. Badanie toksyczności ostrej skórnej sporadycznie daje gorszą klasyfikację niż badanie toksyczności doustnej (4, 13). Zgodnie z tym założeniem, od badania można na przykład odstąpić, jeżeli substancja nie wykazała szkodliwych skutków w badaniu toksyczności ostrej doustnej do 2000 mg/kg masy ciała, ponieważ jest mało prawdopodobne, aby w takim wypadku toksyczność skórna była mniejsza niż 2000 mg/kg masy ciała. Dodatkowym czynnikiem, jaki należy rozważyć, jest stopień wchłaniania danej substancji przez skórę, jednak przy tym podejściu należy dokładnie upewnić się o prawidłowości określania stopnia wchłaniania przez skórę.

Badania działania drażniącego/żrącego na skórę oraz drażniącego/uszkodzenia oka na zwierzętach nie należy przeprowadzać, jeżeli wyniki zaakceptowanych i zwalidowanych metod badań *in vitro* czy *in vivo* pozwalają na właściwą klasyfikację badanej substancji. Podobnie do takiej decyzji upoważnia posiadanie danych z innych badań o działaniu drażniącym czy żrącym, jak np. toksyczność ostra skórna, czy działanie uczulające na skórę. Od badań tych można odstąpić na podstawie danych fizykochemicznych: badaniu temu nie podlegają substancje samoistnie palne w powietrzu lub wodzie w temperaturze pokojowej. Odstąpienie od badań można rozważyć też dla substancji chemicznych, dla których niewykonalne technicznie jest przygotowanie formy dostępnej dla prawidłowego przeprowadzenia badania. Można w takich wypadkach rozważyć badania *in vitro* dla substancji aktywnych lub innych składników, a także dopuszcza się rozpatrzenie potencjalnego zagrożenia za pomocą uznanych metod obliczeniowych. Dla substancji, dla których znana jest też wysoka toksyczność ostra skórna ≤ 200 mg/kg masy ciała (kategoria 1 lub 2 GHS) również można nie wykonywać badania drażnienia skóry, a badania drażnienia oka nie wykonuje się, jeżeli substancja została wcześniej sklasyfikowana jako działająca żrąco na skórę (kategoria 1 GHS) zaakceptowanymi i zwalidowanymi metodami *in vitro* czy *in vivo*.

Badania drażnienia oka nie wykonuje się też dla substancji sklasyfikowanych na podstawie toksyczności ostrej skórnej do kategorii 1 lub 2 w ramach systemu GHS, czyli dla toksyczności ostrej skórnej ≤ 200 mg/kg masy ciała. Dla takich substancji przypisuje się kategorię 1 GHS dla badania uszkodzenia oka.

Najwięcej wymiernych korzyści na polu redukcji liczby zwierząt laboratoryjnych w badaniach toksyczności ostrej dało wprowadzanie metod alternatywnych. Omawiane tu wytyczne OECD do badań toksyczności ostrej już pod koniec lat 90., wraz z opracowaniem systemu GHS, zaczęły odwoływać się do badań alternatywnych, ale początkowo w związku z brakiem wiarygodnych, zwalidowanych i uznanych przez Urzędy Rejestracyjne metod alternatywnych

zapisy te były martwe i badania nadal wykonywano z wykorzystaniem zwierząt, ograniczając jedynie ich liczbę. Dopiero opracowanie i wprowadzenie takich metod dało możliwości realnej redukcji liczby zwierząt czy nawet całkowitej ich eliminacji w badaniach toksyczności ostrej. Alternatywnym badaniem dla badania ostrego drażnienia/działania żrącego skóry na królikach są badania wykonywane według wytycznej OECD nr 430 – „Badanie oporności elektrycznej przez skórę (OES)”, nr 431 – „Metoda badawcza z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka” oraz nr 439 – „Badanie na modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka” (<https://doi.org/10.1787/9789264242739-en>, <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>, <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>).

W oparciu o omówiony wyżej dokument pt. „Guidance Document on Considerations for Waiving or Bridging of Mammalian Acute Toxicity Tests” (doi.org/10.1787/9789264274754-en) oraz w oparciu o strategię postępowania zawartą w aktualnej wytycznej OECD nr 404 do badania ostrego drażnienia/działania żrącego skóry (<https://doi.org/10.1787/9789264242678-en>) nie wolno wykonywać badań na królikach z pominięciem metod alternatywnych. Badanie na królikach jest dopuszczalne dla środków ochrony roślin, dla których test OECD nr 439 jako test klasyfikujący działanie drażniące uznano za nieodpowiedni. Dla wszystkich potencjalnie podlegającym badaniom substancjom nie wykonuje się testów działania żrącego na zwierzętach, gdyż umożliwiają to badania metodami alternatywnymi. Badanie ostrego drażnienia/uszkodzenia oka wykonuje się tylko w wyjątkowych sytuacjach, kiedy nie można sklasyfikować badanej substancji metodami alternatywnymi wykonywanymi zgodnie z wytycznymi OECD: nr 438 – „Badanie na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacyjnych”, nr 491 – „Metoda badawcza *in vitro* krótkiego okresu narażenia do celów identyfikacji” i nr 492 – „Metoda badawcza wykorzystywana w ramach badania na modelu zrekonstruowanego ludzkiego nabłonka przypominającego rogówkę (RhCE) stosowana do identyfikacji substancji chemicznych niewymagających klasyfikacji oznakowania pod względem działania drażniącego na oczy lub poważnych uszkodzeń oczu” (<https://doi.org/10.1787/9789264203860-en>, <https://doi.org/10.1787/9789264242432-en>, <https://doi.org/10.1787/9789264242548-en>).

Metody te zgodnie ze strategią postępowania mają bezwzględne pierwszeństwo przed badaniem na zwierzętach.

Rola personelu w utrzymaniu dobrostanu zwierząt

Ważnym czynnikiem wpływającym na dobrostan zwierząt jest też właściwy dobór personelu pracującego ze zwierzętami laboratoryjnymi. Warunki, jakie muszą spełniać takie osoby, są szczegółowo omówione w ustawie z 2015 r., co stanowi dodatkowy czynnik

zapewniający prawidłowe i humanitarne traktowanie zwierząt.

Należy też wspomnieć o kluczowej dla osób pracujących ze zwierzętami laboratoryjnymi pozycji opublikowanej przez OECD pt.: „Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as human end points of experimental animals used in safety evaluation” (<https://doi.org/10.1787/9789264078376-en>). Dokument ten określa precyzyjnie okoliczności, w jakich należy przeprowadzić eutanazję ze względów humanitarnych. Zwierzęta będące w doświadczeniu, u których stwierdza się jednoznacznie wyszczególnione w dokumencie objawy kliniczne lub zmiany w zachowaniu wskazujące na silny ból czy cierpienie podlegają procedurze humanitarnej eutanazji. Istnienie tego dokumentu, z precyzyjnie zdefiniowanymi przypadkami, kiedy należy przeprowadzić procedurę eutanazji stanowi dla kierownika badania ważną merytoryczną podporę, gdyż nie pozostawia pola do powstania sytuacji spornych dotyczących słuszności podjętej decyzji. Zwierzę, które podlega w trakcie eksperymentu procedurze eutanazji ze względów humanitarnych, jest traktowane jako zwierzę padłe w trakcie eksperymentu i postępowanie takie jest przejawem realizacji zasady udoskonalenia. Brak takich zapisów stwarzałby pole do stawiania zarzutów personelowi podjęcia niewłaściwej i subiektywnej decyzji. Dokument ten przyczynia się więc do bezspornej minimalizacji cierpienia zwierząt, jeżeli takie cierpienie wystąpi w trakcie badania.

Oczywiście, dobrostan zwierząt nie ogranicza się wyłącznie do zapewnienia odpowiednich klatek i minimalizacji cierpienia zwierząt w trakcie eksperymentów. Od kilkunastu lat wielką wagę przywiązuje się do bezpośredniego środowiska zwierząt i zapewnienia im zaspokajania naturalnych potrzeb, takich jak ciekawość czy instynkt stadny. Klatki obowiązkowo uzupełnia się np. o materiał gniazdowy, zabawki, tunele, drewniane klocki i inne elementy wzbogacające środowisko. Tam gdzie jest to tylko możliwe, stosuje się zasadę przetrzymywania zwierząt w grupach. Zwierzęta przetrzymuje się indywidualnie tylko w uzasadnionych przypadkach, np. specyfika i wymogi eksperymentu, nadmierna agresja i wzajemne okaleczanie (samce). Konieczność odpowiedniego wzbogacania środowiska zwierzętom reguluje szereg dokumentów (1, 3, 16), w których można znaleźć szczegółowe wytyczne, jakimi podlegają elementy wzbogacające środowisko (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>).

Podsumowanie

Zmieniające się przepisy prawa i wytyczne OECD, ale przede wszystkim znaczący rozwój metod alternatywnych przyczyniły się w ciągu ostatnich lat do znaczącej redukcji liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach toksyczności ostrej doustnej i toksyczności ostrej skórnej. Kilkanaście lat temu liczby

te sięgały w Łukasiewicz – IPO od kilkudziesięciu do nawet kilkuset szczurów rocznie i sukcesywnie malały wraz ze zmianą wytycznych, pojawieniem się klasyfikacji GHS czy doskonaleniem strategii postępowania. Jeszcze wyraźniej obrazują to liczby wykorzystywanych w badaniach ostrych drażnienia skóry czy oka królików. Przed pojawieniem się metod alternatywnych w badaniach wykorzystywano rocznie w Łukasiewicz – IPO od kilkunastu nawet do kilkudziesięciu królików w badaniach ostrego drażnienia. Od blisko 4 lat konieczną klasyfikację wykonuje się przede wszystkim w oparciu o metody alternatywne.

Najwięcej metod alternatywnych zastępuje zwierzęta w badaniach toksyczności ostrej, ale nieustannie trwają prace nad metodami alternatywnymi dla innych badań (17). Istnieje duże prawdopodobieństwo, że metody alternatywne będą w przyszłości sukcesywnie wypierać klasyczne badania. Zwierzęta laboratoryjne stanowią nieoceniony model badawczy, ale należy mieć nadzieję, że ciągle poszukiwanie i rozwój metod alternatywnych oraz nowe metody szacunkowe i obliczeniowe pozwolą na dalszą redukcję liczby zwierząt także w badaniach przewlekłych. W chwili obecnej rutynowo stosuje się już alternatywne metody dla działania uczulającego skóry. Klasyczne badanie, wykorzystujące żywe zwierzęta, wykonywane na świnkach morskich zastąpiono z powodzeniem kilkoma metodami OECD: nr 442B – „Badanie lokalnych węzłów chłonnych”, nr 442C – „Bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (DPRA)”, nr 442D – „Metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2” czy nr 442E – „Badanie aktywacji ludzkich linii komórkowych (h-CLAT)”. Metodami alternatywnymi są też próby zastępowania i wprowadzania do badań zwierząt ewolucyjnie niższych. Z powodzeniem stosuje się w laboratoriach ryby, np. danio pręgowane, które już od kilkunastu lat wykorzystywane jest w różnego rodzaju badaniach (6, 14) czy np. *Hydra attenuata*, która do laboratoriów zawitała już w latach 80. (10). Próby opracowania metody alternatywnej dla badań toksyczności rozwoju przedporodowego podejmowane są także w ramach własnej działalności w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytutu Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie (12).

Piśmiennictwo

1. Baumann V.: Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits and Research. Enrichment Strategies for Laboratory Animals ILAR J. 2005, 46, 162-170, doi: 10.1093/ilar.46.2.162.
2. Botham P. A.: Acute Systemic Toxicity. ILAR J. 2002, 43, Issue Suppl. 1, 27-30, doi: 10.1093/ilar.43.Suppl_1.S27.
3. Caring Hands. Animal Welfare Institute, 2010.
4. Creton S., Dewhurst I. C., Earl L. K., Gehen S. C., Guest R. L., Hotchkiss J. A., Indans I., Woolhiser M. R., Billington R.: Acute toxicity testing of chemicals – Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. Crit. Rev. Toxicol. 2010, 40, 50-83, doi: 10.3109/10408440903401511.
5. Grzenkowicz N., Kowalczyk J., Kusak A., Podgórski Z., Ambroziak M.: Podstawy funkcjonowania Przedsiębiorstw. Wydawnictwo Naukowe Wydziału Zarządzania Uniwersytetu Warszawskiego, Dom Wydawniczy ELIPSA, Warszawa 2008, s. 27.
6. McGrath P.: Zebrafish, Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity. Wiley, New Jersey 2012.

7. Micińska-Bojarek M.: Europejski standard doświadczeń na zwierzętach. Aspekty humanitarno-prawne. Przegląd Prawa Ochrony Środowiska 2012, 112-127, doi: 10.12775/PPOS.2012.016.
8. Piotr-Krajecka L.: Czy prawo stanowi zagrożenie dla przedsiębiorstw? Barometr Regionalny 2007, nr 2, 73-76.
9. Poznański P., Niedźwiecki S.: Wybrane prawne uwarunkowania przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach w Polsce. Polim. Med. 2014, 44, 4, 203-208.
10. Quinn B., Gagne F., Blaise Ch.: Hydra, a model system of environmental studies. Internat. J. Develop. Biol. 2012, 56, 613-625, doi: 10.1387/ijdb.113469bq.
11. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r.
12. Sornat R., Krakowian D., Napora-Rutkowska M., Faron J., Gruszka K., Wolany M., Mrzyk I., Kropidło A., Paleczny M., Rzedeczko H.: Use of tests on *Hydra attenuata* and *Brachydanio rerio* for teratogenic tests. Abstracts of the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018) Toxicology Out Of The Box Brussels, Belgium 2nd-5th of September 2018, Toxicology Letters, 79-80, doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.547.
13. Thomas H. D., Dewhurst I.: What does a dermal acute toxicity study add to the information on a plant protection pesticide? Toxicology 2007, 231, 114-115, doi: 10.1016/j.tox.2006.11.040.
14. Tylzanowski P., Łańcut M., Wiweger M., Esguerra K.: 1st workshop of the Polish Zebrafish Society – principles of zebrafish model in toxicology and behavioural studies. Experimental Medicine Center, Uniwersytet Medyczny (OMD), Lublin 2017, 20-21 April.
15. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, Dz. U. 2015, poz. 266.
16. Variables, refinement and environmental enrichment for Rodents and Rabbits kept in research institutions. Animal Welfare Institute 2005.
17. Worth A., Barroso J., Bremer S., Burton J., Casati S., Coecke S., Corvi R., Desprez B., Dumont C., Gouliarmou V., Goumenou M., Gräpel R., Griesinger C., Halder M., Janusch R. A., Kienzler A., Madia F., Munn S., Nepelska N., Paini A., Price A., Prieto P., Rolaki A., Schäffer M., Triebe J., Whelan M., Wittwehr C., Zuang V.: Alternative methods for regulatory toxicology – a state-of-the-art review. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2014, 264-275, doi: 10.2788/11111.
18. Żukowski Ł.: Etyczne i prawne aspekty dopuszczalności przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach. Acta Universitatis Wratislaviensis. Przegląd Prawa i Administracji 108, T. CVIII, Prawna ochrona zwierząt 2017, doi: 10.19195/0137-1134.108.11.

Adres autora: lek. wet. Robert Sornat, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie, ul. Doświadczalna 27, 43-200 Pszczyna; e-mail: robert.sornat@ipo.lukasiewicz.gov.pl