

З. С. КЛЕСТОВА, доктор ветеринарних наук,

А. М. ГОЛОВКО, академік НААН, професор, доктор ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Київ-151, Україна, вул.Донецька,30

E-mail: zklestova@yandex.ru

АЛЬТЕРНАТИВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ *IN VITRO* – ЕЛЕМЕНТ В СИСТЕМІ БІОБЕЗПЕКИ ДЕРЖАВИ

Автори привертаять увагу необхідності впровадження альтернативних методів досліджень in vitro, спираючись на світовий досвід. Вилючення тварин з експериментів та замінення валідованих методів досліджень альтернативними застосовуваними методиками сприятиме запровадженню етичних принципів, зміцнює ьню біобезпеки для підприємств, що проводять дослід з інфекційним матеріалом особливо небезпечних захворювань, здешевить процес досліджень, слугуватиме інтеграційним процесам у науковій сфері та призведе до міжнародного визнання результатів досліджень, а також відкриє шлях на міжнародні ринки ветеринарної, фармакологічної, харчової та іншої продукції.

Ключові слова: біобезпека, альтернативні методи досліджень in vitro

Тварини, як моделі, широко використовували в дослідженнях та при доказі безпечності і ефективності нових ветеринарних, фармакологічних, косметичних, харчових та інших продуктів. Однак, багато аспектів негативної дії цих продуктів на людину все ж виникало, що спонукало до розробки нових методів тестування, яких терміново потребує суспільство.

В якості нового бачення і вирішення проблеми в Європі наводять приклад глобальної місії щодо принципів 3Rs, яку виконують в рамках Інноваційних Ініціатив в Медицині (ІМІ), найбільшого приватно-державного партнерства (PPP) у сфері наук про життя (іншими словами- у медико-біологічній сфері).

ІМІ є співробітництво між Європейською Комісією і членами фармацевтичної індустрії Європейської Федерації фармакологічних індустрій і асоціацій (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations)- (EFPIA). ІМІ була розпочата у 2008 році в Європейському Союзі і EFPIA із загальним бюджетом у 2 біліони євро, які були виділені на семирічний період, що зробило ІМІ найбільшим партнерським проектом в науках про життя. Європейський Союз підтримує і інших членів цього консорціуму таких як команди академічних дослідників, малих і середніх підприємств, спілок пацієнтів, регуляторних органів, а також неприбуткових організацій. ІМІ збирала відкриті ініціативи у фармакологічних та біомедичних наукових дослідженнях, які через співпрацю із індустріальним сектором сприяють змінам в суспільстві, вповаджуючи платформу для регулювання щодо питань здоров'я, досліджень і черговості введення в дію законодавчих регуляторних актів. Результатом став прогрес в переосмисленні ролі експериментальних тварин при застосуванні у фармакологічних та біомедичних дослідженнях.

В еру економічної кризи, за якої зростає економічний пресинг на систему охорони здоров'я і фармакологічну індустрію, PPP відкриває унікальні можливості для подолання перешкод, які заважали розробці ефективних та безпечних лікарських (в тому числі і ветеринарних) засобів для оздоровлення пацієнтів, які страждають від виснажливих хвороб. Це важливо також і при вирішенні проблем, що виникали в медицині стосовно екстраполяції даних експериментів, проведених на тваринах, оскільки існує видова різниця між організмом тварин і людини. Це неминуче обмежувало цінність досліджень, що були проведені із використанням тварин для передбачення дії лікарських засобів на організм людини.

У 2010 році Європейський Союз адаптував Директиву 2010/63/EU для захисту тварин, застосовуваних у наукових цілях. Метою Директиви було посилити законодавчо і поліпшити благополуччя тих тварин, що ще залишились необхідними для експериментів і тестування безпечності, також як і жорстке введення в законодавство ЄС запроваджених принципів 3Rs і режимів використання тварин.

Директива 2010/63/EU повністю почала діяти з 1 січня 2013 року. Європейська Комісія рішуче підтримує зусилля пошуку альтернативних методів тестування замість тварин. В тих випадках, коли це зовсім не можливо, кількість тварин, задіяних в експерименті обмежують або методи тестування поліпшують таким чином, щоб у випадку застосування тварин їм нанести найменшу шкоду.

Оскільки тестування на тваринах в Європейському Союзі було заборонено у 2004 році для тестування косметичних засобів, а з 2009 року – також і для тестування інгредієнтів, то великі косметичні компанії створили свої дослідницькі центри з розвитку альтернативних методів *in vitro* і зараз стають лідерами у розробці нових методологій, які замінюють тестування на тваринах. І вже з 11 березня 2013 року Європейський Союз жорстко відслідковує компанії, яким заборонено виходити на європейський ринок, продукція яких, або коли інгредієнти цієї продукції тестувались на тваринах. Це є фінальною стадією десятирічних процесів, які вилучили тварин з процесу тестування. Приклад косметологічних компаній наслідують фармацевтичні, яким слідує крім європейських країн і США, та інші країни. Так, в Індії і Китаї, як і в країнах Південно-Східної Азії швидкими темпами проходять реформування в галузі тестування токсикантів на тваринах. Процес розвитку альтернативних методів *in vitro* швидкими темпами набирає обертів. І недарма, всі питання, пов'язані із заміною тварин в експериментах підтримані світовою науковою спільнотою, що зібралась на дев'ятому Світовому Конгресі з альтернатив і застосування тварин в сфері наук про життя (9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences), який пройшов у Чехії 24-28 2014 року.

Мета даної статті – привернути увагу до проблеми визнання результатів наукових та лабораторних досліджень, проведених у вітчизняних організаціях ветеринарного профілю та необхідності здійснення системи валідації з альтернативних методів *in vitro*.

Результати і обговорення.

Термін «альтернативний» виник після публікації книги Рассела і Берча у 1959 році «Принципи гуманної експериментальної методики» [1]. Згідно до визначень цих авторів, коректна організація експерименту повинна базуватись на удосконалених методах, які знижують больові і стресові впливи, зменшують кількість тварин, необхідних для певного тесту чи заміняють їх моделями, наприклад, клітинними культурами *in vitro*. Концепція удосконалення, зменшення і заміни (**Refinement, Reduction and Replacement**) зараз відома як **“Three R” (3Rs)** і методи, що використовують цю концепцію, називають альтернативними.

Сильним стимулом до розвитку концепції 3Rs і альтернативного тестування став світовий рух за права тварин. Він має метою попередити жорстокість, погане поводження з тваринами та зменшення їх страждань, а також експлуатацію тварин для потреб людини. Суспільна думка категорично проти експериментування на тваринах.

Розроблена угода проведення тест-процедур з визначення дії токсикантів як для науковців, так і для регуляторних відомств.

Організація економічного співробітництва і розвитку (ОЕСД) і Міжвідомчий координаційний комітет із затвердження альтернативних методів (ICCVAM) розробили і запропонували критерії замінюючих технологій. Вже стало загальноприйнятим використання *in vitro* тестів при оцінці безпеки, розробки ліків і нових продуктів. Деякі великі міжнародні компанії широко використовують альтернативні методи. Наприклад, в Європі та деяких країнах заборонено тестування косметичних засобів на тваринах.

Оскільки необхідно використати новітні наукові інструменти для доказу безпеки і ефективності нових продуктів у краткі терміни, з великою надійністю і меншими затратами, тому клітини *in vitro* є засобом, що забезпечив подальший розвиток цього напрямку.

У 1990 році Центр США з альтернатив тестування на тваринах (US Center for Alternatives to Animal Testing, СААТ) рекомендував нову токсикологічну парадигму, яка в даний час є рутинною, та мінімізує тестування на тваринах.

Експериментальні клітинні системи *in vitro* мають виключну цінність для вивчення механізмів дії. Вони ідеально підходять для досліджень молекулярних, клітинних і фізіологічних механізмів хімічно індукованої токсичності. Зараз з використанням систем *in vitro* покращують знання про механізми активності токсикантів, а також при використанні клітин і тканин людини для виявлення токсичних ефектів, специфічних саме для цього виду організмів. Одним із альтернативних методів досліджень є метод комет "Comet assay", в якому обробка ДНК проводиться після лізису клітин [2].

У відповідності до принципів «3R» експерименти на тваринах повинні скорочуватись з різних міркувань, в тому числі і етичних.

Але, стандартні експерименти *in vivo* в деяких країнах застосовуються, а в деяких медико-біологічних дослідженнях залишаються незамінними.

Наприклад, у деяких країнах необхідність повноцінного доклінічного вивчення токсичних властивостей нових комбінацій лікарських засобів обумовлюють тим, що комбінований препарат слід розглядати як оригінальну комплексну сполуку, яка володіє унікальними фармакологічними, фармакокінетичними і токсичними властивостями. Як відомо, рекомендована стандартна програма токсикологічних досліджень включає вивчення загальної токсичної дії (в гострому і субгострому експерименті) і специфічних видів токсичності комбінації лікарських засобів (ЛЗ) і окремих компонентів комбінації ЛЗ, що дозволяє виявити і оцінити ефекти токсикологічної взаємодії.

Вважали, що для токсикологічних досліджень лікарських засобів недоліком систем *in vitro* є те, що в них відсутні шляхи і механізми досліджень гомеостазу, функціонуючих в організмі тварин. Крім того, в *in vitro* моделях часто представлені гострі та короткотермінові ефекти токсикантів, тоді як в системі *in vivo* можливо виявити ефекти довготривалої експозиції впливу біологічної інтеграції на рівні організму [3]. Також відмічали, що системи організму і клітинної культури різняться між собою в тому, як речовина доставляється у клітину, як вона розподіляється, метаболізується і виводиться. Тому, тестування *in vitro* повинно супроводжуватись експериментами на тваринах, а результати, отримані *in vitro*, повинні використовувати в якості прогностичних для зменшення числа як експериментів *in vivo*, так і числа використовуваних тварин.

Але, при проведенні досліджень з виявлення токсикологічної взаємодії багатокомпонентних лікарських засобів з використанням методів *in vitro* можливо забезпечити всі принципово важливі умови для досліджень лікарських взаємодій, до яких слід віднести можливість оцінки: 1). Характеру та динаміки ефекту; 2). Залежності токсичного ефекту від дози/ концентрації; 3). зворотності виявлених ефектів; 4). характеру взаємодії; 5). статистичну достовірність даних і обрахованих на їх основі кардинальних параметрів, таких як «інгібуєча концентрація» (ІК50) та інші. Останніми роками відмічений суттєвий прогрес у розвитку і затвердженні (валідації) 3Rs альтернатив для проведення токсикологічних тестів.

Вигоди від застосування токсикологічних методів досліджень *in vitro*

1) Висока продуктивність та придатність для використання в скринінгових експериментальних програмах, що дозволяють проводити тестування великих масивів комбінацій ЛЗ;

2) практично необмежені можливості тестування багатокомпонентних лікарських форм препаратів;

3) оцінка прямого токсичного впливу ЛЗ на клітину (мішень) дозволяє використовувати отримані дані для аналізу механізму токсичних ефектів;

4) загальні недоліки і можливі технічні проблеми експериментів *in vitro*, як правило, пов'язані із оцінкою відносної екстраполяційної адекватності їх умов в порівнянні із умовами експерименту *in vivo*, а також із ступенем розчинності досліджених речовин.

Навіть вимушена необхідність використання альтернативних методів досліджень *in vitro* наразі необхідна і тоді, коли громіздкий дизайн досліджень *in vivo* дуже затратний, як за часом, так і фінансово.

Альтернативна токсикологія *in vitro* розвиває високопродуктивні тести на клітинах і лініях тканин людини, застосовує курячі ембріони та хімічні тест-системи та інші- віртуальні моделі, що створені за допомогою комп'ютерних систем, які безумовно витісняють тести на тваринах.

В Україні існує проблема оцінки біоризиків і виявлення біологічної активності нових хімічних речовин, потенційних лікарських засобів, ветеринарних препаратів, інфекційних агентів, харчових добавок, забруднювачів довкілля і т. інш.

В Україні стан інфраструктури науки незадовільний. Для її розвитку потрібен час, інвестиції для створення умов досліджень *in vitro*, які будуть валідовані і відповідати міжнародним стандартам і вимогам належної лабораторної практики (Good Laboratory Practice) [4], а також належної практики культур клітин (Good Cell Culture Practice) [5].

У нашій країні повільно робляться кроки в науці і освіті з використанням в медико-ветеринарно-біологічній сфері принципів 3Rs. Зараз ми маємо шанс побудувати наші дослідження за міжнародними стандартами і розповсюдити принципи 3Rs в науковому суспільстві. Першим кроком необхідно зменшити кількість тварин в біомедичних дослідках.

У Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штабів мікроорганізмів розпочато роботу з розробки як нових альтернативних методів контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів, так і для проведення швидких тестів моніторингових досліджень з виявлення небезпечних інфекційних хвороб тварин.

Висновок. Розвиток альтернативних методів досліджень є необхідним для прийняття міжнародним науковим співтовариством результатів лабораторних досліджень українських вчених, особливо при розвитку процесів інтегрування України в європейський науковий простір, що неминуче повстане після вступу в дію імплементаційної Угоди між Україною і ЄС.

Список використаної літератури:

1. Proceedings. Human Science in the 21st Century//Abstracts of the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. Springer.-2014, 24-28 August.-320p.
2. Russel W.M.S., Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique.-London.-UK: Methuen and Co. Ltd.-1959.
3. Kasamatsu T., Kohda K., Kawazoe Y. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay// Mutat. Res.-1996.-369.-P.1-6.
4. Гаспарян Г.О.Б Григорян Р.М., Саркисян Н.К. и др. Альтернативная *in vitro* токсикология: настоящее и будущее в Армении//

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ IN VITRO – ЭЛЕМЕНТ В СИСТЕМЕ БИОБЕЗОПАСНОСТИ СТРАНЫ/

З. С. Клестова, А. М. Головки.

Авторы привлекают внимание необходимости внедрения альтернативных методов исследований in vitro, опираясь на мировой опыт. Изъятие животных из экспериментов и замена валидированных методов исследований альтернативными применяемым методикам будет способствовать внедрению этических принципов, укреплению биобезопасности для предприятий, использующих опыты с инфекционным материалом особо опасных заболеваний, удешевит процесс исследований, послужит интеграционным процессам в научной сфере и приведет к международному признанию результатов исследований, а также откроет путь на международные рынки ветеринарной, фармакологической, пищевой и другой продукции.

Ключевые слова: биобезопасность, альтернативные методы исследования in vitro

ALTERNATIVE METHODS OF RESEARCH IN VITRO - ELEMENT IN THE COUNTRY BIOSAFETY/

Z. S. Klestova, A. M. Golovko

Animals as a model widely used in research and in proving the safety and efficacy of new veterinary, pharmaceutical, cosmetic, food and other products. However, many aspects of the negative impact of these products on humans yet occurred that led to development of new testing methods, which urgently needs the society.

As a new vision and resolve of problems in European Union the example of a global mission to the principles of 3Rs, performed under Initiation Innovation in Medicine (IMI), the largest public-private partnership (PPP) in the life sciences (in the biomedical field).

IMI is a collaboration between the European Commission and members of the European Federation of Pharmaceutical Industry and associations (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations) - (EFPIA). IMI launched in 2008 in the EU and EFPIA with a total budget of EUR 2 billion Euro that were allocated to seven-year period, had the largest IMI partnership project in the life sciences of EU supports and other members of the consortium. Such a team of academic researchers, SMEs, associations of patients, regulatory agencies, and nonprofit organizations. IMI has collected public initiatives in pharmaceutical and biomedical research that through cooperation with industrial sector contribute to changes in society, developing platform for regulation of health issues in research and regulation of priority regulations. The result has been progress in rethinking of the role of experimental animals in the application in pharmaceutical and biomedical research. In an era of economic crisis, in which the growing economic pressure on the health care system and in pharmacological industry, PPP provides a unique opportunity to overcome the obstacles that hinder the development of effective and safe medical (including veterinary) means for rehabilitation of patients suffering from debilitating diseases. It is important also in solving of problems encountered in medicine regarding extrapolation of these experiments. Carried out on animals, as there is specific difference between animals and humans. This inevitably limited the value of studies that have been conducted using animals to predict the action of drugs on the human body.

In 2010, the European Union has adapted Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. The aim of the Directive was to strengthen the law and improve the welfare of animals that are still needed for experimentation and testing of safety, as well as for entry into EU legislation introduced 3Rs principles and modes of use of animals.

Directive 2010/63/EU fully began operations on January 1, 2013. The Commission strongly supports efforts to find alternative methods of testing instead of animals. In cases where this is not possible, the number of animals involved in the experiment or test methods limit so that if using of animals they cause the least harm.

As animal testing in the European Union was banned in 2004 for testing cosmetics, and since 2009 - for testing ingredients, the big cosmetic companies set up their research centers on the development of alternative in vitro and are now leaders in the development of new methodologies that replace animal testing. And on March 11, 2013 The European Union severely tracking companies are not allowed to enter the European market, whose products or ingredients of these products tested on animals. This is the final stage of 10 years activity that exclude of animals with the testing process. Example cosmetic pharmaceutical companies followed by European countries except the United States and other countries. For example, in India and China, as well as in South-East Asia are rapidly reform the toxicant testing on animals. The development of alternative in vitro rapidly gaining momentum. No wonder, all the questions associated with the replacement of animals in experiments supported by the World scientific community who gathered to 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences which took place in the Czech Republic 24-28, 2014.

Key words: biosafety, alternative methods of research in vitro.

Рецензент – Кандидат ветеринарных наук М. В. Бабкін