

Ж.В. РОМАНОВА¹, А.Т. ДУШПАНОВА¹, К.С. АБСАТАРОВА¹,
А.Е. УАЛИЕВА¹, Н.Ж. КУСАЙНОВА², Д.К. АСТАЕВА², И.Е. БИШИМОВА³

¹Казахский Национальный университет им. аль-Фараби
Кафедра биомедстатистики и доказательной медицины

²РГП на ПХВ «Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» КЗПП МНЭ РК

³АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»

СОВРЕМЕННЫЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ В ТОКСИКОЛОГИИ, ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ, ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ В КАЗАХСТАНЕ

Статья содержит обзор и сравнительную характеристику альтернативных методов исследования в токсикологии, разработанных и валидированных в странах Европейского союза и Республике Казахстан. Обоснована актуальность внедрения альтернативных методов в практическую деятельность испытательных центров в связи с интеграцией Казахстана в европейские экономические структуры (ВТО) и гармонизации национальных нормативно-законодательных и иных актов с европейскими.

Ключевые слова: токсичность химических веществ и композиций, альтернативные методы исследования в токсикологии, гармонизация национальных нормативно-правовых актов с европейскими документами, технические регламенты Таможенного союза.

Современные альтернативные методы тестирования веществ химического и биологического происхождения должны послужит заменой общепринятым в токсикологии опытам, проводимым на лабораторных животных. В странах европейского сообщества альтернативные методы исследования находят широкое применение и значительный круг сторонников. Неправительственные медицинские организации (Всемирная организация здравоохранения, Европейская медицинская ассоциация и др.) выступают за сокращение опытов на животных и использование для исследовательских целей альтернативных моделей [1]. По данным Британского общества по защите животных ежегодно в экспериментах используются 115 млн лабораторных животных [2]. При этом некоторые опыты обладают значительным раздражающим и травмирующим действием на организм животных (тест Драйза и др.): "Ежегодно в одной Великобритании миллионы животных страдают и умирают в научно-исследовательских лабораториях. Их обжигают, ошпаривают, отравляют и замаривают голодом, подвергают электрическим разрядам и приучают к наркотикам; их подвергают воздействию низких температур, близких к точке замерзания, содержат в полной темноте с рождения и вызывают у них такие заболевания, как артрит, рак, диабет, инфекции ротовой полости, язвы желудка, сифилис, герпес и СПИД. У них хирургически удаляются глаза, им наносят повреждения мозга и вызывают переломы костей. В ходе военных исследований животных отравляют газом, цианистыми соединениями, расстреливают пластиковыми пулями и наносят им раны снарядами, движущимися с большой скоростью" [3].

Использование негуманных экспериментов, оказывающих значительное травмирующее действие на животных, послужило основной предпосылкой для разработки альтернативных методов определения токсичности химических веществ.

Альтернативный метод может быть использован для замены либо сокращения экспериментов на животных в биомедицинских исследованиях и при тестировании продукции с целью подтверждения ее соответствия требованиям действующей нормативной документации.

Впервые в 1959 г. британские ученые Рассел и Берч [4] предложили концепцию "трех R" ("The three Rs"), которая включает три составляющие: replacement - замена, reduction - уменьшение и refinement - повышение качества.

Принцип «замена» (replacement) предполагает замену животных альтернативными моделями (культуры клеток тканей, компьютерные модели, изолированные органы и другие).

Принцип «уменьшение» (reduction) подразумевает использование в экспериментах *in vivo* минимального количества животных. Этого можно достигнуть путем правильного планирования эксперимента [5], использования здоровых животных нужного стандарта по экологическому и генетическому статусам.

Принцип «повышение качества» (refinement) предполагает использование наиболее гуманных методик, позволяющих снизить травмирующее действие на животное – применение новых хирургических методов, выполнение манипуляций квалифицированными специалистами с использованием качественной анестезии, обеспечение ухода за животными в период до и после хирургических вмешательств. Усыпление опытных животных после экспериментов также следует проводить гуманными методами, способными минимизировать страдания животных [6].

Сегодня принцип «3R» является общепринятым мировым стандартом, позволившим получить новый научный опыт в области создания альтернатив и в значительной степени сократить количество используемых лабораторных животных.

Вокруг концепции «3R» объединяются современные европейские сторонники альтернативных методов, наиболее прогрессивные из которых уже сейчас предлагают идею «1R» (Replacement/замещение), то есть абсолютный переход к тестированию химических веществ без участия животных.

В настоящее время в мире создан ряд центров по разработке и валидации альтернатив экспериментам на животных - Европейский центр по утверждению альтернативных методов (The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)), Интернациональный комитет центра по утверждению альтернативных методов (ICCVAM), Европейское сообщество токсикологов *in vitro* (ISTIV) и другие. В прошлом все новые химические вещества, появляющиеся в промышленности, должны были проходить ряд тестов на лабораторных животных, тогда как по новому законодательству «REACH» (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals – регистрация, оценка и

разрешение химических веществ) такой экспертизе подвергаются лишь те новые химические вещества, которые производятся в объеме свыше 10 тонн, а методы *in vitro* включены в перечень обязательных методов оценки потенциальной опасности химических веществ для здоровья человека и окружающей среды [7].

В 1986г. в Европейском Союзе была принята Директива 86/609/ЕЕС по защите животных, использующихся для экспериментальных и других научных целей [8]. В 2003г. была одобрена 7-ая поправка к Косметической Директиве 76/768/ЕЕС [9], которая предусматривает переход к полному запрету опытов на животных, начиная с 2009г. В странах Европейского союза с 2013 года введен полный запрет на оборот (продажу в странах ЕС) парфюмерно-косметической продукции, тестируемой на животных.

В этой связи существует реальная угроза того, что производители парфюмерно-косметической продукции, не перешедшие на альтернативные методы исследования, не смогут поставлять свой товар в страны Европейского Союза. Это относится, в том числе, и к Казахстану, так как в общем объеме токсикологических исследований различных объектов окружающей среды, химических веществ и товаров народного потребления, опыты на лабораторных животных в нашей стране составляют незначительную долю. Переход на альтернативные методы (без использования животных) тестирования парфюмерно-косметической продукции позволит оценивать токсичность препаратов для человека, сохраняя жизни животных, а также избавит отечественных производителей от проблем на европейском рынке.

В качестве альтернативы животным могут использоваться одноклеточные организмы, куриные эмбрионы, бактерии, физико-химические модели, культуры клеток, компьютерные модели. Причем некоторые специалисты утверждают, что эти методы более дешевые, эффективные, требуют меньше времени и позволяют выявлять токсичность испытываемых препаратов на более глубинном уровне - клеточном, а иногда и субклеточном [10].

В перечень аттестованных альтернативных методик в странах ЕС и Америки входят методы определения острой токсичности, разрушения кожи, раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаза, резорбтивных свойств (на свиной коже), мутагенности, фотомутагенности и эмбриотоксичности и некоторые другие.

Наиболее распространенными являются опыты на реконструированных моделях эпидермиса, одна из которых получила название *Episkin* [11]. Ее можно будет применять в испытаниях косметических средств на выявление кожных раздражений. Для создания *Episkin* учёные выращивают слои кожи на коллагене, используя кожные клетки под названием кератоциты. Принцип испытания косметики при помощи *Episkin* заключается в измерении соотношения погибших и живых клеток после помещения заменителя натуральной кожи в исследуемый образец и добавления в него индикаторного вещества. В случае присутствия живой ткани в образце индикатор изменяет цвет с желтого на синий. Таким образом, данная методика позволяет отказаться от использования животных при проведении подобных исследований.

В наши дни исследователи научились культивировать клетки самых различных органов и тканей - кожи, легких, глаз, мышц и т.д. Более того, они могут создавать трехмерные конструкции из специализированных клеток - искусственные ткани, с успехом использующиеся для тестирования вместо животных [12].

Определение раздражающего действия на слизистую оболочку глаза *in vitro* определяется на глазном яблоке, взятом у погибшего животного или на скотобойне. Также в тестах на токсичность вместо роговицы глаза используется тонкая пленка, отделяющая желток куриного яйца от белка.

Вместе с тем следует отметить, что наряду с явными преимуществами альтернативных методов с биоэтической точки зрения, существуют и некоторые ограничения в их использовании. Так, при создании культур клеток необходима питательная среда, в качестве которой используют дорогостоящую эмбриональную телячью сыворотку [13]. Более дешевые сыворотки — новорожденных телят и взрослых животных — пригодны для культивирования лишь некоторых типов клеток. Кроме того, физиология клетки в культуре и в живом организме не идентичны. На физиологию клетки в живом организме влияют находящиеся в непосредственной близости клетки различных типов, молекулы внеклеточного матрикса, сигнальные молекулы, секретируемые окружающими клетками, специфические механические воздействия и многие другие факторы. Некоторые исследователи считают очевидным то, что воспроизвести столь сложную регуляцию в культуре клеток невозможно [13]. Проблематичным также является моделирование заболеваний сложной этиологии в культуре клеток (диабет, злокачественные новообразования и др.).

Кроме того многие химические вещества и их комбинации могут обладать отдаленными последствиями, проявляющимися не только у нынеживущего поколения, но и у его потомства. В этой связи возникает необходимость разработки методики, позволяющей оценить вероятность возникновения отдаленных последствий на организм при использовании только альтернативных моделей [13]. На сегодняшний день не существует полностью лицензированных альтернативных методов определения токсичности химических веществ, способных заменить собой классические методы [14].

Лабораторные мыши принимают участие во всех важнейших научных программах, направленных на улучшение жизни человека. Мыши подвита C57Bl, известные так же как «Черные-6», играют важную роль в поисках лекарственных средств от рака и болезни Альцгеймера. Как утверждают исследователи, именно этот подвид мышей стал первым живым существом, геном которого был полностью расшифрован в 2002 году, в результате чего установлено, что у человека и мыши совпадают до 80 процентов генов, а 99 процентов можно назвать очень похожими. При этом длина генетического кода мыши (2,5 миллиарда пар нуклеотидов) лишь немного отстает от человеческой (2,9 миллиарда пар) [15].

Таким образом, в настоящее время переход на исключительно альтернативные методы определения токсичности веществ является преждевременным.

Однако актуальность данных методов, а также вступление Казахстана во Всемирную торговую организацию и Евразийский экономический союз обуславливает необходимость гармонизации национальных нормативно-правовых актов с аналогичными европейскими законодательными актами, ограничивающими использование животных для токсикологических испытаний. Это приводит к активизации работы по разработке и внедрению альтернативных методов, имеющих высокую токсиколого-гигиеническую значимость, доступных и удобных в применении на практике.

В Казахстане альтернативные методы токсикологических исследований только начинают внедряться. Доступными с технической точки зрения являются методы определения токсичности химических веществ при помощи люминесцентных бактерий, тестирование на бычьих сперматозоидах, метод доплерографии.

Суспензия сперматозоидов быка – стандартный, доступный и дешевый биологический материал. Замороженные клетки хранятся в жидком азоте в сосудах Дьюара. Это обеспечивает неограниченный срок хранения и существенно сокращает время, необходимое для подготовки эксперимента. При использовании суспензии сперматозоидов нет необходимости субкультивирования клеток с целью поддержания культуры и получения необходимых количеств исходной суспензии, используемой для выращивания монослоя клеток. Подвижность суспензии сперматозоидов используется в качестве тест-функции. Чувствительности этой культуры достаточно для оценки общей токсичности и местно-раздражающего действия материалов и изделий самого широкого спектра. Стоимость одного испытания на кратковременной суспензионной культуре подвижных клеток более чем в двести раз ниже, чем на других, используемых для этих целей культурах клеток млекопитающих. Совокупность достоинств кратковременной суспензионной культуры подвижных клеток позволило бы распространить этот метод на уровень лабораторий санитарно-эпидемиологического профиля, заводских контрольных лабораторий медицинской промышленности, частных испытательных лабораторий, тогда как методы, использующие другие культуры пока не вышли за пределы научно-исследовательских центров [16].

Метод доплерографии позволит проводить скрининговую оценку раздражающего действия на сосудах хорионаллантоисной оболочки куриного эмбриона *ex vivo* с использованием доплерографа ультразвукового компьютеризированного ММ-Д-К «Минимакс-Допплер-К». Однако на сегодняшний день в Казахстане отсутствуют испытательные центры, оснащенные данным прибором для определения токсичности веществ и имеющие подготовленных специалистов [17].

Основными проблемами при использовании в токсикологии альтернативных методов в Казахстане являются: невозможность расчета неопределенностей, отсутствие единого подхода к интерпретации результатов в различных странах, невозможность учета повторного воздействия доз химических веществ на организм, отсутствие в республике учебных заведений по повышению квалификации токсикологов и др.

В условиях невозможности полного отказа от исследований на лабораторных животных для развития альтернативных методов в Казахстане перспективными направлениями деятельности являются:

1. Оптимизация опытов на лабораторных (сокращение числа животных, сокращение опытов, выбор наиболее гуманных методов и т.д.).
2. Изучение опыта внедрения и практического использования альтернативных методов ведущими научными учреждениями стран ближнего и дальнего зарубежья.
3. Изучение баз данных по токсичности и опасности отдельных веществ и их комбинаций.
4. Сбор данных по собственным исследованиям альтернативными методами.
5. Освоение и внедрение в практическую деятельность отечественными лабораториями альтернативных методов определения токсичности химических веществ, получивших валидацию в странах ЕС.
6. Обучение специалистов на базах исследовательских учреждений стран ближнего и дальнего зарубежья, имеющих опыт по внедрению альтернативных методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Дядищев Н.Р., Рыбалкин С.П., Марченко А.И. Биологические модели *in vitro* в токсикологии. // В кн: 1-ый съезд токсикологов России. Тезисы докладов. - М.: 1988. - С. 299-302.
- 2 Gericke C. Was Sie Schon immer uber Tierversuche wissen wollten. Ein Blick hinter die Kulissen. 2 Auflage // Gottingen: Echo Verlag, 2011. - 128 S.
- 3 Sharpe R., The Cruel Deception. Thorsons Publishing group, 1988. "СМ.: Singer P. Animal Liberation. A New Ethics formour Treatment of Animais // Avon Books. - New York: 1975. – P. 52-56.
- 4 Russell, W.M.S. and Burch, R.L., The Principles of Humane Experimental Technique // Methuen. – London: 1959. – P. 88-91.
- 5 Дмитренко Д.С., Ващенко Е.В., Жукова А.В. Алгоритм проведения экспериментов для определения токсикокинетики вредных веществ. Инженерная Школа, Школа Биомедицины, Дальневосточный Федеральный Университет. – Владивосток: 2001. – 128 с.
- 6 The Three Rs concept & progress with implementing non-animal alternatives ib biomedical research & testing, R.D. Combes (FRAME)// "Биоэтика на пороге III тысячелетия". Международный симпозиум. - 2000; Харьков): Тезисы докладов:/Редкол.: А.И. Божков. - Х.: Издательство ХНУ им.В.Н.Каразина, 2000. – 195 с.
- 7 European Commision-Enterprise and Industry-REACH – Overview-FAG. Web page: http://eu.europa.eu/enterprise/reach/fag_en.htm.
- 8 EEC (1986). Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 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 Journal of the European Communities, L358, 1–29.
- 9 [Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. OJEC L262 of 1976-09-27, pp. 169–200.](#)
- 10 Rowan, A. Replacement alternatives and the concept of alternatives. In The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing (Alternative Methods in Toxicology) (ed. A.M. Goldberg, L.F.M. van Zutphen & M.L. Principe), pp. 1–10. New Rochelle, NY, USA; Mary Ann Liebert. 1993.
- 11 Дмитруха Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях. Киев. Medix anti-aging, № 3 (33) / 2013.

- 12 Balls, Michael; Goldberg, Alan M.; Fentem, Julia H.; Broadhead, Caren L.; Burch, Rex L.; Festing, Michael F.W.; Frazier, John M.; Hendriksen, Coenraad F.M.; Jennings, Margaret; van der Kamp, Margot D.O.; Morton, David B.; Rowan, Andrew N.; Russell, Claire; Russell, William M.S.; Spielmann, Horst; Stephens, Martin L.; Stokes, William S.; Straughan, Donald W.; Yager, James D.; Zurlo, Joanne; van Zutphen, Bert F.M. The Three Rs: The way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 11. ATLA: Alternatives to Laboratory Animals. 1995 Nov-Dec; 23(6): 838-866.
- 13 Эксперименты на животных и гуманизм, коллектив авторов «ALF in Russia...help yourself...», 2013, электронный ресурс - MolBiol.ru: <http://molbiol.ru>.
- 14 Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии//Биомедицина.- 2006.- №4.-С.5-23.
- 15 Расшифрован геном мыши: отличие от человека – не более процента, 2012, электронный ресурс – Медпортал: <http://medportal.ru/mednovosti/news>.
- 16 Еськов А.П. Токсикологические испытания. Альтернативные методы / А. П. Еськов, Р. И. Каюмов, А. Е. Соколов // Токсикологический вестник. - 2003. - № 5. - С. 25-29. - Библиогр.: с. 28-29 (16 назв.). - АКУНБ. Аннотация: Токсикологические испытания на клетках млекопитающих.
- 17 МР 1.2. 0025-11 «Оценка раздражающего действия методом ультразвуковой доплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона ex vivo».

**Ж.В.РОМАНОВА¹, А.Т.ДУШПАНОВА¹, К.С.АБСАТАРОВА¹,
А.Е. УАЛИЕВА¹, Н.Ж.КУСАЙНОВА², Д.К.АСТАЕВА²,
И.Е.БИШИМОВА³**

*¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті
Биомедстатистикажәне дәлелді медицина кафедрасы*

ҚР ҰЭМ ТҚҚК "Санитариялық-эпидемиологиялық сараптама және мониторинг ғылыми-практикалық орталығы" РМҚК

³«Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы» АҚ

ТОКСИКОЛОГИЯДАҒЫ АЛЬТЕРНАТИВТЫ ЗАМАНАУИ ТЕСТІЛЕУ ӘДІСТЕРІ, ОЛАРДЫҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ МЕН КЕМШІЛЕКТЕРІ, ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ КЕЛЕШЕКТЕГІ ДАМУ КӨРІНІСТЕРІ

Түйін: Мақалада токсикологияда қолданылатын Европа одақтастығында және Қазақстан Республикасында құрастырылған және валидациядан өткізілген альтернативті зерттеу әдістеріне шолу жүргізілген. Қазақстанның еуропалық экономикалық құрылымдарға (ДСҰ) интеграциясы мен ұлттық нормативтік-құқықтық және тағы басқа акттердің еуропалық акттермен гармонизациясына байланысты сынақ орталықтарының тәжірибелік жұмысына альтернативті әдістерді енгізу өзектілігі негізделген.

Түйінді сөздер: химиялық заттектердің және композициялардың ұйыттылығы, токсикологиядағы альтернативті зерттеу әдістері, ұлттық нормативтік-құқықтық акттердің еуропалық акттермен гармонизациясы, Кедендік одақтың техникалық регламенттері.

**ZH. ROMANOVA¹, A.DUSHPANOVA¹, K. ABSATAROVA¹,
A.UALIYEVA¹, N.KUSAYNOVA², D.ASTAEVA², I. BISHIMOVA³**

¹al-Farabi Kazakh National University

Department of the biomedical statistics and evidence-based medicine

²Scientific - practical center for sanitary - epidemiological expertise and monitoring

³«Scientific Center for Anti-infective Drugs» JSC

MODERN ALTERNATIVE TOXICITY TEST METHODS, ADVANTAGES AND DISADVANTAGES, PROSPECTS OF DEVELOPMENT IN KAZAKHSTAN

Resume: This article contains an overview and comparative characteristics of alternative test toxicology methods, which were developed and validated in the European Union and in the Republic of Kazakhstan. Review describes relevance of introducing of alternative methods into the practice of test centers in connection with the integration of Kazakhstan into the World Trade Organization (WTO) and the harmonization of Regulation National Law Act and other acts with Europe Union Regulations.

Keywords: toxicity of chemical compositions, alternative toxicity test methods, harmonization of Regulation National Law Act with Europe Union Regulations, technical regulation of the Customs Union.