

Казакова Е.Ф., биолог
Ган Е.А., ведущий ветеринарный врач
Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук
Бурко А.Н., научный сотрудник
Барсукова М.В., лаборант 1 категории

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск

МЕТОДЫ, АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАМ НА ЖИВОТНЫХ, В НАУЧНОЙ И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР)

Резюме

В настоящей статье дан обзор методов исследований in vitro, альтернативных экспериментам in vivo. Рассмотрены проблемы опытов на животных. Показано, что в настоящее время альтернативные методы широко используются в научной практике для определения токсичности веществ.

Summary

This article provides an overview of in vitro research methods that are alternative to in vivo experiments. The problems of animal experiments are considered. It is shown that alternative methods are widely used in scientific practice to determine the toxicity of substances.

Поступила в редакцию 11.05.2020 г.

Опыты над животными – возможно, один из самых спорных вопросов современной науки. Ежегодно в мире более 100 млн жизней лабораторных животных уносят болезненные эксперименты. Долгое время такие исследования считались единственным источником получения знаний в биологии, медицине, ветеринарии, косметической промышленности. Но из-за анатомо-физиологических различий человека и животных тестирование лекарств и новых методов лечения на животных неэффективно и даже опасно: современная медицина насчитывает до 150 препаратов, прошедших испытания на животных и оказавшихся опасными для человека. Например, результатом использования успокоительного препарата для беременных женщин талидомида стало рождение 10000 детей с отсутствием конечностей и уродствами. До этого препарат успешно прошёл испытания на животных и не показал никакой токсичности [14].

Ученые экспериментируют над братьями нашими меньшими в различных целях, среди которых фундаментальные ис-

следования функционирования организмов, разработка потенциальных методик лечения болезней человека, а также проверка на безопасность и качество лекарств, устройств и других объектов.

История эксперимента в медицине чудовищна. Нельзя без содрогания читать о том, как проводились опыты над животными даже во времена не столь отдаленные. Обезболивающие средства были открыты лишь в 19 веке, до этого животных столетиями сжигали, отравляли, кололи, резали без анестезии [14].

Имя физиолога К. Бернара известно каждому студенту-медику. Но ни в одном учебнике не описывается методика проведения его опытов по изучению влияния температуры на теплокровных животных, когда обреченных животных (собак, кошек, кроликов, голубей) помещали в печь при температуре плюс 90 ± 100 °C [14].

В лаборатории профессора В.В. Пашутина животному покрывали кожу водонепроницаемым лаком, затем ее сдирали заживо, «дабы не затемнить результаты научного исследования» [14]. Можно

вспомнить и выдающегося русского ученого И.П. Павлова. Множество собак погибло в его лаборатории при постановке различного рода экспериментов. Жестокость своих опытов он оправдывал тем, что «чем полнее будет проделан опыт на животных, тем менее часто больным придется быть в положении опытных объектов, со всеми печальными последствиями этого» [14].

Историю о правовых аспектах использования животных можно начать с 1822 г., когда в Великобритании был принят закон, направленный против жестокого обращения с домашними животными. Великобритания стала первой страной в мире, принявшей такой закон, а в 1824 г. здесь начинает действовать и первое в мире общество по защите животных.

Важнейшими требованиями современного законодательства на любом уровне являются тщательное планирование эксперимента с целью минимизации числа погибших животных, а также использование альтернатив везде, где это возможно. Концепция альтернативных методов известна как «три R»: редукция (*reduction*), или снижение количества животных, используемых в опытах; рафинирование (*refinement*) – улучшение методики с целью облегчения страданий подопытных животных; замена (*replacement*) болезненных для животных экспериментов опытами, не причиняющими страданий. Методика «три R» была описана в книге, опубликованной в 1959 г. W.M.S. Russell и Rex Burch, двумя учеными из Великобритании, под названием «Принципы гуманных экспериментальных методов» («The Principles of Humane Experimental Technique») [14]. Они высказали мнение, что получить достоверные научные результаты можно лишь путем проведения опытов, основанных на гуманном отношении к животным. Они считали необходимым выработать такие методы, чтобы снижать количество используемых животных и, в конечном итоге, полностью заменить их. Так, например, применение правила «три R» на практике ведет и к пересмотру системы обучения в учебных за-

ведениях биомедицинского и ветеринарного профиля. Процесс обучения должен строиться так, чтобы живые животные использовались только в самых необходимых случаях.

Следует учитывать, что опыты на животных обходятся очень дорого. Животных надо закупать, содержать, кормить, за ними надо ухаживать. На это требуется много денег и времени. Поэтому предприятия химической и фармацевтической промышленности, а также учебные заведения крайне заинтересованы в том, чтобы заменить эксперименты на животных альтернативными методами тестирования [1, 2].

Выражение «альтернатива» подразумевает, что исследование на животных заменяется чем-то другим. На самом деле методы исследования без использования животных – это не просто замена: они имеют преимущества перед экспериментами на животных. В научных кругах термин «альтернатива» часто употребляется применительно к методам, которые не заменят опыты на животных [14, 6].

На сегодняшний день учеными всего мира разработано более 500 альтернатив экспериментам на животных. Многие опыты можно ставить, используя биологические модели – бактерии, культуры клеток, а также компьютерное моделирование, интерактивные видеофильмы, манекены лабораторных животных и человека [6]. К сожалению, эти и другие прогрессивные и гораздо более экономичные методы еще не получили должного распространения. По мнению Галины Червонской [13], известного вирусолога, члена комитета по биоэтике РАН, уже сейчас три четверти опытов на животных и в наших лабораториях можно было бы заменить экспериментами с использованием культур клеток: «Эти методы эффективны, точны и требуют меньших финансовых затрат. Более того, альтернативы позволяют выявить токсичность испытываемых препаратов на более глубинном уровне – клеточном, а иногда и субклеточном». Системы *in vitro* реагируют на токсичное воздействие гораздо более точно, чем животные.

Изучение биологической активности веществ, независимо от последующей цели их использования, как правило, на первом этапе предполагает оценку их токсичности.

Для оценки потенциально токсичных биологических и химических веществ в настоящее время широко используют метод клеточной биоиндикации взамен общепринятой модели *in vivo*.

Методы оценки токсичности, альтернативные классическим тестам на экспериментальных животных, а именно модели с использованием культур клеток, находят все более широкое применение в биохимикотоксикологических исследованиях [4, 5, 8].

Определение потенциальной токсичности антигенов возбудителей опасных инфекционных заболеваний *in vitro* на модели перевиваемых клеточных линий – чувствительный, простой в исполнении и информативный тест, который можно использовать на этапах лабораторного анализа различных внеклеточных или ассоциированных с клеточными структурами биополимеров. Установлено, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [7, 9, 13, 15] и позволяют, помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых химических препаратов, прежде всего на стадии их доклинических испытаний (исследование *in vitro* дает результат по прошествии какого-то количества часов или дней, в то время как исследования на животных могут длиться неделями, месяцами и даже годами). Один из распространенных тестов цитотоксичности *in vitro* – это нейтрально красный анализ. Он проводится на клеточной культуре, причем культура поддерживается в культуральных 96-луночных планшетах. При такой методике опыта можно использовать различные концентрации тестируемого химического вещества, а также обеспечить положительные и отрицательные контрольные группы. Другим относительно

простым анализом цитотоксичности является тест МТТ. Он служит для обнаружения общих цитотоксических соединений, а также агентов, для которых митохондрии являются специфическими мишенями. Измерение активности лактатдегидрогеназы (LDH) также используется как основа различных опытов для определения цитотоксичности. Этот фермент обычно присутствует в цитоплазме живых клеток и выделяется в среду клеточной культуры через протечки в мембранах мертвых или умирающих клеток, поврежденных в результате воздействия токсического агента [13].

Еще одно преимущество моделей *in vitro* заключается в возможности работы непосредственно на культурах клеток человека и животных, что делает полученные данные более адекватными при проекции на организм человека. Кроме того, использование культур клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне и учесть сложные синергические и разнонаправленные эффекты смесей химических соединений.

При работе с системой *in vitro*, в ходе, например, токсикологических исследований, можно изучать параллельно большое количество фармацевтических препаратов или химических веществ, а в системах, предусматривающих эксперименты на животных, такие возможности ограничены. Альтернативные методы *in vitro* очень надежны, так как работа с клеточными и тканевыми культурами дает хорошо воспроизводимые и четкие результаты, и таким образом можно изучать специфические воздействия исследуемого агента и изменения, возникающие в результате этого воздействия на клеточном уровне. Между тем, при исследованиях на животных оценивают лишь общий процесс, например отравления.

Одним из важнейших преимуществ применения клеточных культур является возможность наблюдения за результатами взаимодействия компонентов сложных антигенных комплексов бактерий с клетками-мишенями и оценки результатов такого

тестирования по изменению морфофункциональных параметров клеток под действием потенциально токсических веществ прижизненно, а не *post factum* [7, 12]. В мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требованиям биоэтики [7].

Одной из альтернатив стала бионическая эпидермальная ткань EPI TRI, созданная учеными из Института индустриально-технологических исследований (ITRI) Тайваня [14]. С помощью EPI TRI можно оценивать коррозирующее и раздражающее действие косметических субстанций на кожу. EPI TRI является абсолютным эквивалентом эпидермального слоя клеток кожи человека. С помощью EPI TRI возможно проводить тестирование косметики и бытовой химии. ITRI также разработал Melano-EPI TRI [14] – это модель кожи человека, клетки которой содержат меланоциты, поэтому Melano-EPI TRI можно использовать для проверки на безопасность средств для загара. EPI TRI – это первые искусственно выращенные клетки кожи, выпущенные в массовое производство на Тайване. Технология поможет производителям разрабатывать новые продукты, соответствующие международным нормам, а также проводить безопасные и гуманные опыты.

Одним из жестоких методов тестирования токсичности на животных является тест Драйзе на раздражение глаз, проводимый на кроликах [12, 16, 17]. Активный поиск альтернативных методов привел к разработке теста HET-CAM, который используется как предварительная стадия к тесту с кроликом [10, 12]. Тест проводят на развивающемся курином эмбрионе, на 10–14-й день развития. На мембрану, пронизанную кровеносными сосудами, наносят вещество. Затем учитывают кровоизлияния и изменения кровеносных сосудов. Изменения физиологии и биохимии клеток в результате воздействия химического вещества можно оценить и на культурах клеток эпителия роговицы глаза человека. В каче-

стве альтернативы исследователи также изучали целые или рассеченные глазные яблоки свиней, крупного рогатого скота и цыплят, полученные на бойнях. Многие конечные точки, измеренные в культурах целых органов, аналогичны тем, что измерены в опытах *in vivo*, например помутнение и опухоль роговицы [10, 17].

Для выявления веществ с сильным раздражающим действием на глаза используют методы на культурах клеток NRU. При методе NRU (выявляет степень повреждения мембраны клеток) используются человеческие эпителиальные клетки, а также клетки мышей (фибробласты 3T3) и кроликов. Существует также анализ, который может прогнозировать повреждение и восстановление роговицы, он подходит и для тестирования продукции для волос. Это метод распространения флуоресценции (модель на основе культуры клеток почки собаки) [3].

В токсикологических исследованиях все шире используются срезы культур высокой точности, которые часто делают из органов животных. При этом для получения нужного органа либо убивают животное, либо используют отходы бойни. Срезы тканей имеют ряд преимуществ по сравнению с системами клеточных культур, которые заключаются в том, что в них присутствуют все виды клеток органа, сохраняя архитектуру *in vivo* и межклеточные коммуникации. Таким образом, исследования *in vitro* могут проводиться для определения вида клетки-мишени внутри органа, а также для изучения токсичности конкретных органов-мишеней. Недостатком срезов является их быстрая дегенерация после первых 24 часов пребывания в культуре. Также используют уплощенные ткани для изучения краткосрочной токсичности, включая раздражение и разъедание кожи, попадания асбеста в трахею и нейротоксичности мозговой ткани [3, 16].

На изолированных органах можно тестировать действие химического вещества или потенциального лекарства. Чтобы получить орган, убивают животных.

Органы сохраняют свою естественную функцию вне организма в течение какого-то времени. Продукты бойни могут использоваться для решения некоторых проблем. Так, на свиных легких можно изучать принципы работы легких, а также влияние загрязнения окружающей среды, курения или наночастиц.

Существует компьютерный метод выявления токсичности химических веществ. Команда американских ученых при помощи данных о химических веществах и их смесях, собранных Европейским химическим агентством, создала базу из 866 тыс. свойств и указаний на токсичность всех проанализированных препаратов (данные были получены в ходе многолетних опытов на животных). На основе расчета коэффициентов сходства ученые научили искусственный интеллект оценивать вероятность опасных свойств химических веществ. Точность такого анализа составляет 87 %, в то время как точность единичного опыта на животных – 57 %, повторного – 81 % [3, 16].

В настоящее время известно, что в основе комплекса защитных реакций клеток, которые обеспечивают адаптацию к меняющимся условиям в ответ на воздействие различных неблагоприятных факторов, в том числе и токсических агентов, лежат единые фундаментальные механизмы, приводящие к сходным изменениям на морфологическом и молекулярном уровнях [11, 7]. Такой универсальный характер стрессовых реакций на клеточном уровне в ответ на разнообразные внешние воздействия делает перспективным применение моделей *in vitro* и стандартных биохимических критериев оценки жизнеспособности и метаболических изменений клеток не только при действии химических препаратов, но и физических (электромагнитных полей различной частоты и интенсивности), а также биологических факторов (вирусов, тканевых жидкостей от больных с различными типами патологии).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Испытания на лабораторных животных – это неотъемлемая часть медицины. Эксперименты на животных очень важны, однако они являются дорогостоящими и трудоемкими, приводят к травмам и гибели подопытных.

Современная наука с помощью альтернативных технологий исследования позволяет сократить и даже свести к минимуму использование подопытных животных в современных доклинических исследованиях и научных испытаниях, что позволяет не только избежать массовой гибели лабораторных животных, но и значительно удешевить и сократить сроки исследований. Одним из альтернативных методов являются опыты на культуре клеток *in vitro*, где возможно использование органов и тканей, полученных из этических источников. Быстрое развитие технологий *in vitro* и их применение для научных целей может заменить использование лабораторных животных. Во всем мире набирает силу движение, направленное на замещение использования животных.

В настоящее время РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» располагает специалистами, обладающими опытом работы и необходимыми знаниями в области культивирования клеток, методами забора биоматериала с целью разработки альтернативных методов технологий *in vitro*. В отделе культур клеток и питательных сред имеется возможность культивировать широкий спектр клеток из разных органов, тканей и видов. Кроме того, использование культур клеток позволяет установить характер биологической активности соединений непосредственно на клеточном уровне, что может также минимизировать проблемы различий между видами.

Клетки *in vitro* являются средством, обеспечивающим дальнейшее развитие в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биоэтика. Альтернативы экспериментам на животных / А. С. Лукьянов [и др.]. – М. : Изд-во МГУ, 1996. – 253 с.
2. Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станция, лаборатория, учебных заведениях, а также питомниках: постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mshp.gov.by/documents/technical-acts/cb5d27ea51a49bea.html>. – Дата доступа: 23.04.2020.
3. Гильдеева, Г. Н. Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной *In vitro*-токсикологии / Г. Н. Гильдеева. – М., 2017. – С. 17–30.
4. Дмитруха, Н. Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях / Н. Н. Дмитруха. – Киев : Medix anti-aging, 2013. – № 3 (33). – 168 с.
5. Дядищев, Н. Р. Биологические модели *in vitro* в токсикологии / Н. Р. Дядищев; С. П. Рыбалкин, А. И. Марченко: тезисы докладов 1-го съезда токсикологов России. – М., 1988. – С. 299–302.
6. Еропкин, М. Ю. Культуры клеток как модельная система в биохимико-токсикологических исследованиях: дис. ... д-ра биол. наук / М. Ю. Еропкин. – СПб., 2004. – 354 с.
7. Еропкин, М. Ю. Модели, альтернативные использованию лабораторных животных в токсикологии. Достижения и проблемы / М. Ю. Еропкин // Токсикологический вестник. – 1999. – № 5. – С. 7.
8. Еськов, А. П. Токсикологические испытания. Альтернативные методы / А. П. Еськов // Токсикологический вестник. – 2003. – № 5. – С. 25–29.
9. Каркищенко, Н. Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии / Н. Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2006. – № 4. – С. 5–23.
10. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. *In vitro* 3T3 NRU тест на фототоксичность: ГОСТ 32372-2013. – Введ. 01.08.14. – М. – С. 4–8.
11. Пименова, Е. В. Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур: дис. ... канд. мед. наук / Е. В. Пименова. – Волгоград, 2016. – 18 с.
12. Современные альтернативные методы исследования, используемые для оценки безопасности продукции / Е. В. Зарицкая [и др.] // Экология человека. – 2017. – № 3. – С. 2.
13. Червонская, Г. П. Этика медицинского эксперимента в доклинических испытаниях / Г. П. Червонская // Биоэтика: принципы, правила, проблемы / отв. ред. и сост. Б. Г. Юдин. – М. : Эдиториал-УРСС, 1998. – 472 с.
14. Яскевич, Я. С. Основы биоэтики: учеб. пособие / Я. С. Яскевич, С. Д. Денисов. – Минск : Вышэйшая школа, 2009. – С. 291–307.
15. Burden, N. Testing Chemical Safety: What Is Needed to Ensure the Widespread Application of Non-animal Approaches / N. Burden, F. Sewell, K. Chapman // PLOS Biology. – 2015. – Vol. 13(5): e1002156.
16. Glossblatt, N. Toxicity Testing in the 21st Century: A vision and a Strategy; ed. : M. Karalic-Loncarevic. – Washington: National Academy Press, 2007. – 196 p.
17. Carbone, Larry. What Animals Want: Expertise and Advocacy in Laboratory Animal Welfare Policy. – New York: Oxford University Press, 2004. – 63 p.