



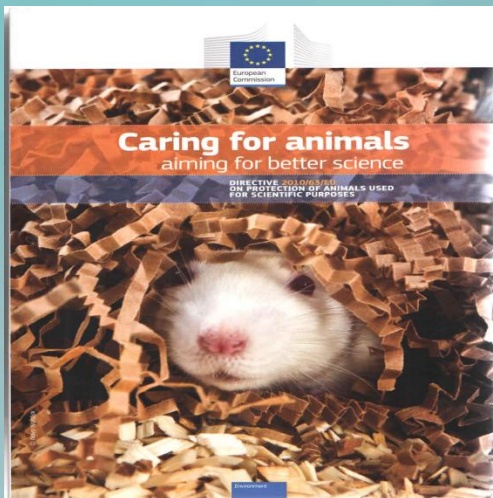
РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ IN VITRO У ПІДВИЩЕННІ ЕФЕКТИВНОСТІ СИСТЕМИ БІОБЕЗПЕКИ

КЛЕСТОВА З.С.

заступник директора з наукової роботи
ДНКІБШМ, доктор ветеринарних наук, с.н.с.

Е-mail: zklestova@yandex.ru

Київ, 5 жовтня 2014 р.



Джерела біологічної небезпеки в Україні

- ❑ мікробіологічні лабораторії різних відомств (діагностичні, науково-дослідні);
- ❑ суб'єкти підприємницької діяльності з виробництва біопрепаратів (державні біофабрики, науково-дослідні установи, приватні фірми);
- ❑ колекції штамів мікроорганізмів у наукових установах Національної академії аграрних наук та Державного комітету ветеринарної медицини України
- ❑ антропоургічні резервуари збудників інфекцій (11 тисяч худобомогильників);
- ❑ міграційні шляхи птахів (Поліський широтний, Дніпровський, Азово-Чорноморський);
- ❑ особливості географічного розташування.

Найбільш поширені джерела можливого зараження в біологічній лабораторії

- - Контакт з інфікованими тваринами (небезпеки: покуси, подряпини, маніпуляції, вскриття);
- - Маніпуляції з живими патогенами;
- - Забруднене обладнання, яке персонал вважає “Чистим”;
- - Підтримання належного стану лабораторій (прибирання, особливо персоналом, який не працював з патогенами, або погано навчений).

Створення концепції 3 Rs-1959 рік:

- Refinement alternatives – удосконалення
 - Reduction alternatives – зменшення
 - Replacement alternatives - заміна
-
- *Russel W.M.S., Burch R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London.*

Застосування альтернативних методів досліджень *in vitro*:

- Сприяє:
- - гуманному поводженню з тваринами;
- - підвищенню біобезпеки;
- - здешевленню продукції фарміндустрії, косметичної промисловості, нових харчових технологій, продукції санітарно-гігієнічної групи, наукових розробок і та інш.

1986:ЕС Директива про захист тварин, застосованих для наукових цілей

- Директива 2010/63 (з 2013, оновлена Директива ЄС 86/609).
- **Стаття 4.1.** Держави-члени ЄС повинні забезпечити науково задовільні методи або стратегію тестування, яка не використовуватиме живої тварини (в наукових цілях);
- **Стаття 1.3.1.** Держави-члени ЄС повинні гарантувати, що досліди не проводяться, якщо для отримання результату не шукається інший метод або стратегія тестування, які б виключали застосування живої тварини, що визнається відповідно до законодавства ЄС;
- **Стаття 4.7.** Єврокомісія та Держави-члени повинні сприяти розвитку та перевірці альтернатив методів, які забезпечать такі ж або більш високі рівні отриманих результатів за інформативністю, як і ті, що одержані в дослідгах на тваринах, але які не передбачають використання тварин, призводять до зменшення їх кількості в тестах, сприяють менш болючим процедурам. Ці органи зобов'язані прийняти заходи для заохочення досліджень в цій галузі.

Референс-лабораторія ЕС альтернатив у тестуванні на тваринах з Європейським

Центром валідації альтернативних методів

• (створена в 1994 році за Директивою ЕС 86/609)

- - Координує та сприяє використанню альтернативних процедур;**
- - Координує валідацію альтернативних підходів;**
- - Діє як центральний пункт обміну інформацією з альтернативних підходів;**
- Управляє загальнодоступною базою даних з інформаційних систем щодо альтернативних підходів;**
- Сприяє діалогу з розвитку, перевірки, регулювання, міжнародного визнання та застосування альтернативних підходів.**

Законодавча база альтернативних методів in vitro

- Директива 2010/63/EU (захист тварин, що використовують з науковою метою;
- Регламент (ЕС) № 1907/2006 (REACH) – з тестування хімічних сполук;
- Регламент № 440/2008/EC –OECD TG-ISO-INVITOX
- European Pharmacopoeia, June 2012

ВАЛІДАЦІЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ IN VITRO

- **1995: ECLAM принципи валідації, ALTA 23,129-147.**
- **2004: Modular Approach to Validation**
- **2005: OECD Регуляторні документи з валідації та міжнародного сприйняття нових або оновлених методів тестування для оцінки біологічної небезпеки (підписали 31 країна та ще більше країн погодили)**

МІЖНАРОЖНІ ВАЛІДАЦІЙНІ ЦЕНТРИ

- **2000 – США, ICCVAM-NICEATM,**
- **2005 - Японський Центр з Валідації Альтернативних Методів (JaCVAM),**
- **2009 – Міжнародна Кооперація з Альтернативних Методів тестування (ICATM): ECVAM, ICCVAM-NICEATM, JaCVAM, Ytalth Canada,**
- **2009 – Корейський Центр з Валідації Альтернативних Методів,**
- **2011 – Бразильський Центр з Валідації Альтернативних Методів (BraCVAM).**

In vitro методи Регламенту № 440/2008/EC- OECD TG-ISO-ESAC

- Токсичність для шкіри (Skin irritation): B.40 EpiSkin/EpiDerm models of epidermis (OECD 430);
- Подразнення шкіри (Skin irritation): B.46 EpiDerm, SkinEthic RHE models (OECD 439);
- Фототоксичність (Phototoxicity): B.41 3T3 NRU test (OECD 432), 3D skin models;
- Проникнення через шкіру (Skin absorption/penetration): B.45 (OECD 428) ex vivo porcine skin
- Подразнення (токсичність для очей) (Eye irritation): Cytotoxicity test-3T3 NRR, Organotypic model HET-CAM, 3D cornea models: EpiOcular, HCE SkinEthic;

In vitro методи Регламенту № 440/2008/EC-OECD TG-ISO-ESAC

- Генотоксичність/мутагенність:
 - В.13/14 Тест на зворотні мутації у бактерій (Ames test) (OECD 471)
 - В.10 Хромосомні аберації in vitro (OECD 473).
- Мікроядерний тест in vitro (OECD 487);
- Гостра токсичність: тест на цитотоксичність за визначенням LD50 (>2000 mg/kg);
- Цитотоксичний тест: EN ISO 10993-5

П Р И К Л А Д И

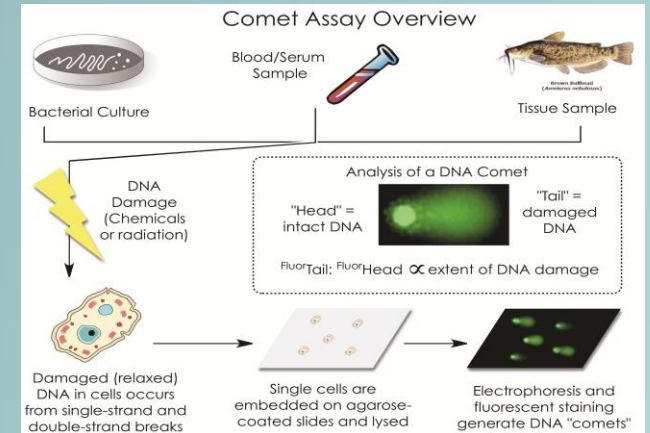
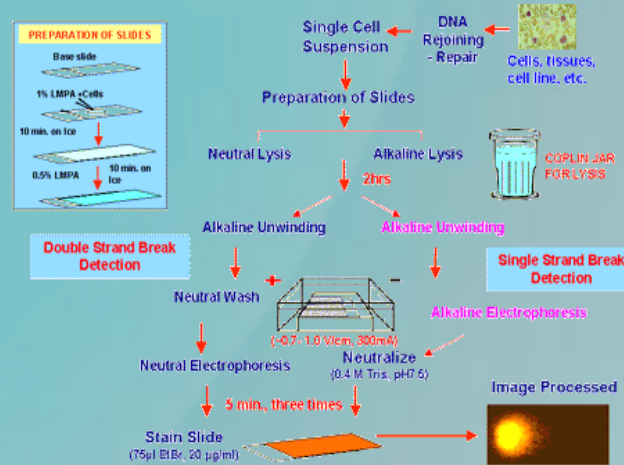
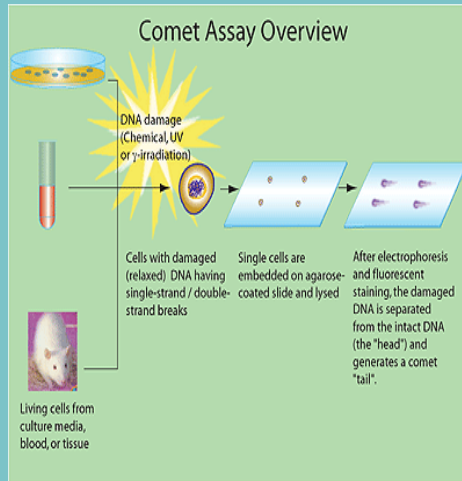
застосованих альтернативних методів



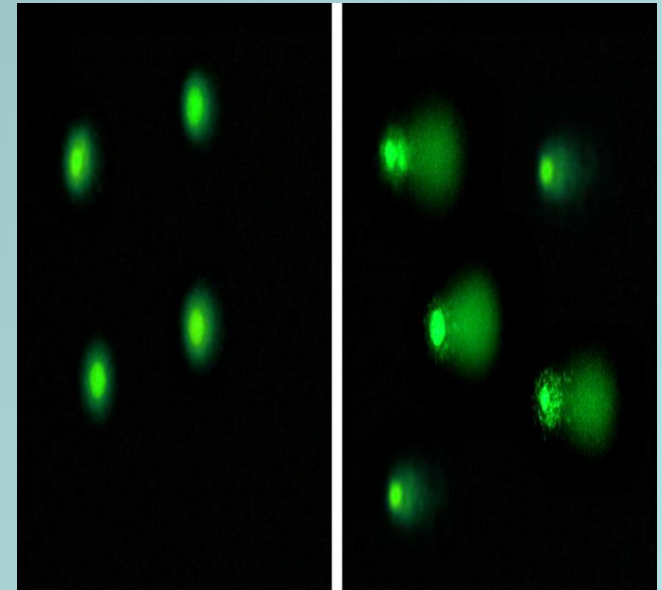
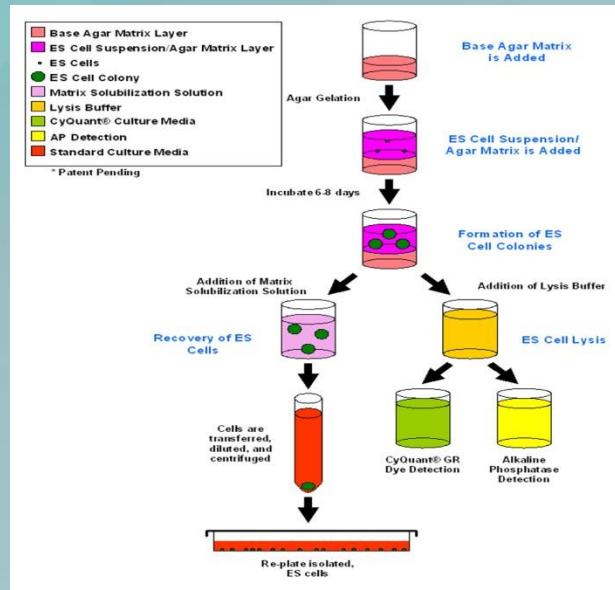
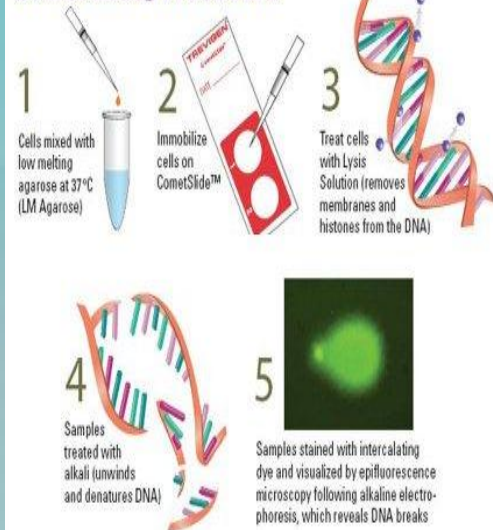
Найбільш вживані альтернативні методи in vitro

- **Метод комет (Comet assay) - метод реєстрації пошкоджень ДНК і дослідження репарації на рівні одиночних клітин (метод досліджень генотоксичності);**
- **Метод визначення токсичності на курячих ембріонах (замість Eye irritation testing, HET-CFM Assay, що існували з 1938 р. - методи визначення місцево-подразнюючої дії на кон'юнктиві очей кролів) ;**
 - **Метод токсичності для шкіри – Skin Corrosion Testing (CORROSITEX- Corrositex Membrane Barrier Test Method) - замість методів визначення місцево-подразнюючої дії та методу визначення токсичності на шкірі (кролів, білих мишей, мурчаків, собак);**
- **Метод визначення токсичності у 3 D культурі клітин шкіри (замість проби токсичності на шкірі тварин (dermal toxicity)) .**

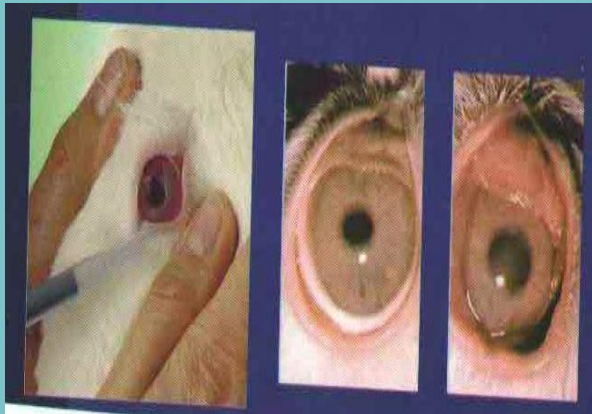
Метод комет (Comet assay)



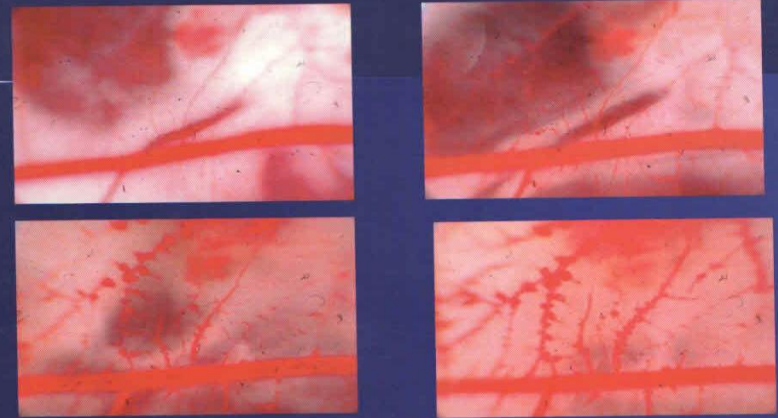
Comet Assay Procedure



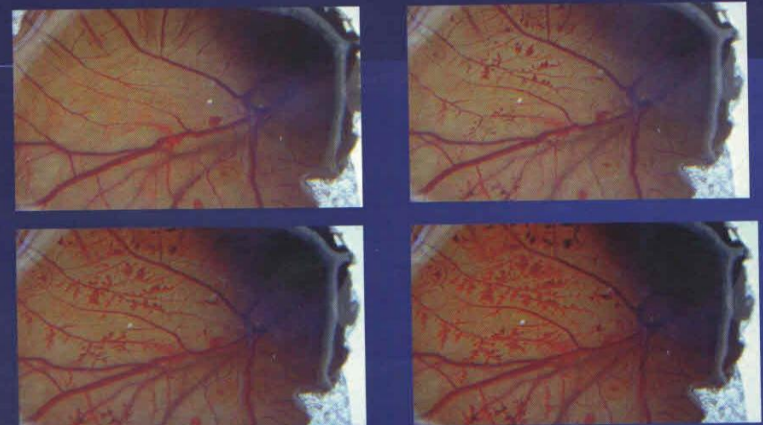
Метод визначення токсичності на курячих ембріонах



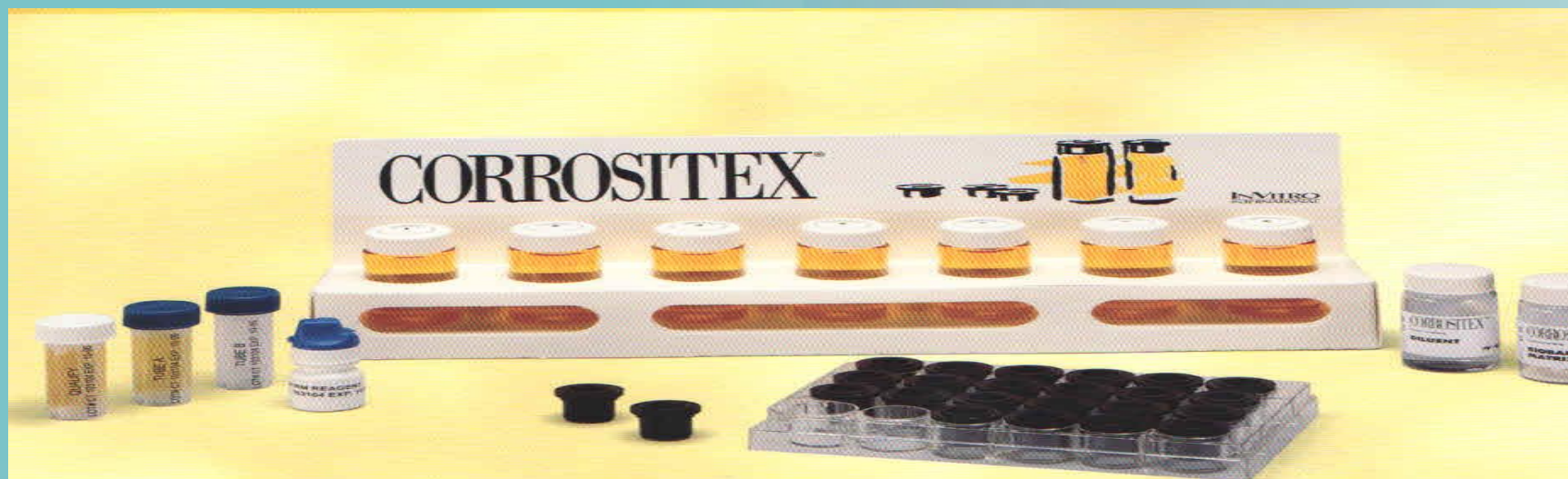
Eyelash glue 0-5 min - severe irritant



Strong irritant with typical haemorrhage



CORROSITEX



CORROSITEX can be purchased and performed on-site, or you may send your samples off-site to a private laboratory for testing. For more information on how CORROSITEX can benefit your company, contact InVitro International at **1-800-2-INVITRO**.

InVitro International's CUSTOMIZED TECHNOLOGY SERVICES is dedicated to ensuring that our products and services meet your specific requirements.

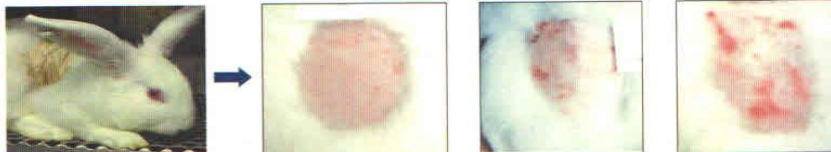
WE FULLY GUARANTEE YOUR SATISFACTION.

Визначення токсичності речовин для шкіри

OECD TG 404 (the in vivo test that is still used in some cases):

A dose of 0,5 ml of liquid or 0,5 g of solid is applied to approximately 6 cm² of skin and covered with a gauze patch, which is held in place with non-irritating tape.

- exposure times are usually 3 min, 1 hour and 4 hours.
- liquid substances usually undiluted
- solid substances mixed with minimal amount of water and applied with a patch.



Picture Source: Kumar A. et al. (2007) International Journal of Pharmaceutics, Volume 345, Issues 1–2, 163–171.

Corrosive reactions in vivo are typified by:

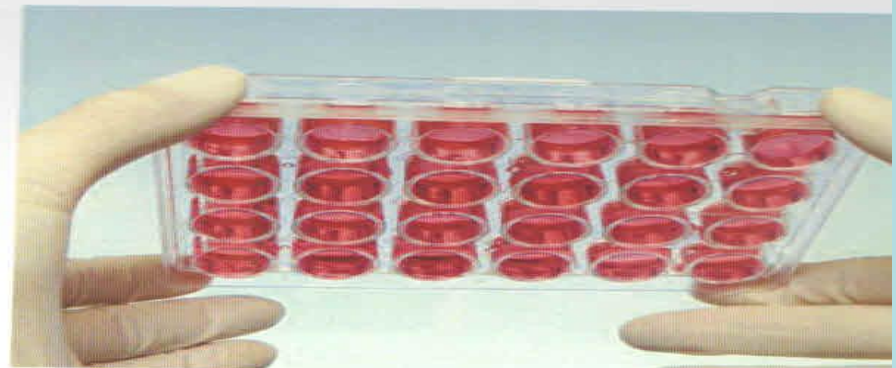
ulcers, bleeding, bloody scabs and at the end of observation by discoloration, complete areas of alopecia and scars.

Irritating reactions in vivo are typified by:

erythema and oedema formation, scoring scale: 0–4

Helena Kandarova and Silvia Letasiova, WC9 Training Course, Prague 2014

Introducing the in vitro 3D models techn



Kandarova and Silvia Letasiova, WC9 Training Course, Prague 2014

Приклад застосування альтернативних методів для тестування ВІЗ

- Заміна тесту безпечності на цільових видах тварин (TABST) при тестуванні всіх ветеринарних вакцин (контролю кінцевого продукту) почалась в червні 2012 на користь 3Rs принципів
- **Приклади:**
- **Вакцину проти актинобацильозу свиней (інактивовану), Вакцину проти атрофічного риніту свиней (інактивовану) –замість тестування 2 доз вакцин на тваринах замінили тестом “Випробування залишкової токсичності”, також як і при тестуванні Вакцини проти правця для ветеринарного використання замість застосування мурчаків при визначенні безпечності замінили тим самим тестом.**
- А після 1.04.2013 власники РС повинні надати варіанти скасування TABST тесту іншими методами і для других вакцин
- *(Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures-Veterinary (CMDv), UK, 26.11.2012) Адаптовано до Європейської Фармакопеї квітень 2012 р.*

ДНКІБШМ у розвитку альтернативних методологій наукових досліджень і контролю ВІЗ

- Атестація за ISO/IEC 17025:2006 та ISO/IEC 1724:2012;
- Розробка нових методів детекції патогенів без використання тварин;
- Розробка нових методів та валідація європейських методик тестування токсикантів *in vitro* (в тому числі залишкових кількостей хімічних речовин у ВІЗ, генотоксичність і т. інш);
- Прогнозування біоризиків та створення додаткових методологій зміцнення системи біобезпеки ветеринарної медицини.



Дякую за увагу!