

# Badania toksykologiczne

## – alternatywne metody w kosmetologii

Joanna Organiściak

### W świetle polskiego prawa

Podstawowym aktem prawnym regulującym kwestie wymagań dotyczących składu, oznakowania kosmetyków oraz warunków ich obrotu w Polsce jest **Ustawa o kosmetykach z dnia 30 marca 2001 r.** [Dz. U. 2001 Nr 42 poz. 473] wraz z późniejszymi zmianami: Ustawa z dnia 30 października 2003 r. o zmianie ustawy o kosmetykach [Dz. U. 2003 Nr 208 poz. 2019] oraz Ustawa z dnia 27 sierpnia 2004 r. o zmianie ustawy o kosmetykach [Dz. U. 2004 Nr 213 poz.2158].

W myśl Art.2.1. kosmetykiem jest każda substancja lub preparat przeznaczone do zewnętrznego kontaktu z ciałem człowieka: skórą, włosami, wargami, paznokciami, zewnętrznymi narządami płciowymi, zębami i błonami śluzowymi jamy ustnej, których wyłącznym lub podstawowym celem jest utrzymanie ich w czystości, pielęgnowanie, ochrona, perfumowanie, zmiana wyglądu ciała lub ulepszenie jego zapachu.

Na podstawie Art. 8 Ustawy o Kosmetykach z dnia 30 marca 2001 r., został powołany do życia Krajowy System Informowania o Kosmetykach (KSIOK), prowadzony z ramienia Głównego Inspektora Sanitarnego przez Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi.

Działalność statutowa Krajowego Systemu polega nie tylko na gromadzeniu danych o kosmetykach wprowadzonych do obrotu na terenie Polski, lecz również na gromadzeniu informacji o przypadkach zachorowań spowodowanych użyciem kosmetyku.

Z tego powodu każdy producent/importer przed wprowadzeniem kosmetyku do obrotu na polski rynek zobowiązany jest do zgłoszenia go do Krajowego Systemu Informowania o Kosmetykach (KSIOK).

Art.11. ust. 1. Ustawy określa z kolei jaki rodzaj dokumentacji powinien posiadać każdy kosmetyk. W myśl tego przepisu są to informacje obejmujące:

- 1) ilościowy i jakościowy skład kosmetyku, a w przypadku kompozycji zapachowych i aromatycznych jej nazwę lub numer kompozycji oraz imię i nazwisko lub nazwę oraz adres dostawcy poszczególnych składników kosmetyku,
- 2) specyfikację fizykochemiczną i mikrobiologiczną surowców i gotowego kosmetyku oraz kryteria kontroli czystości mikrobiologicznej kosmetyku,

- 3) opis metody produkcji zgodnej z dobrą praktyką produkcji,
- 4) **ocenę wpływu kosmetyku na bezpieczeństwo zdrowia ludzi, przygotowaną z uwzględnieniem charakterystyki toksykologicznej składników, ich struktury chemicznej i stopnia kontaktu z ciałem człowieka, a także nazwisko i adres osoby odpowiedzialnej za tę ocenę,**
- 5) istniejące dane o niepożądanych skutkach dla zdrowia ludzi powstałych w następstwie stosowania kosmetyku,
- 6) udokumentowane wyniki badań działania kosmetyku, jeżeli jest to uzasadnione deklarowanym rodzajem działania kosmetyku.

**Art.11 ust. 2** podkreśla, że ocena wpływu kosmetyku na bezpieczeństwo zdrowia ludzi, powinna być sporządzona zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej, pod kierunkiem osoby posiadającej wyższe wykształcenie w dziedzinie farmacji, toksykologii, medycyny lub dziedzinach pokrewnych.

Zasady dobrej praktyki produkcji kosmetyku z uwzględnieniem w szczególności ogólnych wymagań dotyczących prowadzenia i stosowania systemów zapewnienia jakości na wszystkich etapach produkcji kosmetyku, mogących mieć wpływ na jego jakość, w celu wyeliminowania nieprawidłowości mogących stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi, Minister właściwy do spraw zdrowia określa, w drodze rozporządzenia.

Nadzór nad przestrzeganiem przepisów ustawy sprawuje na zasadach i w trybie określonym w odrębnych przepisach Państwowa Inspekcja Sanitarna oraz w zakresie znakowania, załączników i prawidłowości obrotu Inspekcja Handlowa

Kwestie testowania kosmetyków na zwierzętach określone są w następujących punktach Ustawy [Dz. U. 2004 Nr 213 poz.2158]:

- „Art. 4a.1.** Zakazuje się, w celu spełnienia wymagań niniejszej ustawy, przeprowadzania testów kosmetyków na zwierzętach.
2. Zakazuje się, w celu spełnienia wymagań niniejszej ustawy:
    - 1) wprowadzania do obrotu kosmetyków:
      - a) testowanych na zwierzętach,
      - b) zawierających składniki lub ich kombinacje testowane na zwierzętach,

- 2) przeprowadzania na zwierzętach testów składników kosmetyków lub kombinacji tych składników.
3. Zakaz, o którym mowa w ust. 2 pkt. 1 lit. b i pkt. 2, obowiązuje od momentu zastąpienia testów na zwierzętach przez jedną lub więcej uznanych i przyjętych w Unii Europejskiej metod alternatywnych.
4. Minister właściwy do spraw zdrowia w porozumieniu z ministrem właściwym do spraw nauki może określić, w drodze rozporządzenia, procedury przeprowadzania testów kosmetyków, składników kosmetyków lub ich kombinacji, mając na uwadze postęp nauki w rozwoju metod alternatywnych."

**Art. 11 ust. 1, pkt. 4:**

„4) ocenę wpływu kosmetyku na bezpieczeństwo zdrowia ludzi, przygotowaną z uwzględnieniem charakterystyki toksykologicznej składników, ich struktury chemicznej i stopnia kontaktu z ciałem człowieka, a także nazwisko i adres osoby odpowiedzialnej za tę ocenę; ocena ta uwzględnia cechy miejsc, w których kosmetyk będzie stosowany lub grupę odbiorców, dla których jest on przeznaczony, ze szczególnym uwzględnieniem kosmetyków przeznaczonych wyłącznie do zewnętrznej higieny intymnej oraz dla dzieci poniżej trzeciego roku życia,”

„7) dane dotyczące wszelkich testów na zwierzętach przeprowadzonych przez producenta, jego przedstawicieli lub dostawców w czasie opracowywania lub dokonywania oceny wpływu kosmetyku lub jego składnika na bezpieczeństwo zdrowia ludzi; wymóg ten dotyczy również testów przeprowadzanych w celu spełnienia wymogów państw niebędących członkami Unii Europejskiej.”

Art. 4 ust. 5 **Ustawy o ochronie zwierząt z 21 sierpnia 1997 r.** definiuje metody alternatywne w zakresie przeprowadzania doświadczeń jako nowoczesne metody badawcze, nie wymagające przeprowadzania doświadczeń na żywym zwierzęciu.

Art. 28 ust.1 Ustawy o ochronie zwierząt mówi zaś „Doświadczenia i testy na zwierzętach są dopuszczalne tylko wtedy, gdy są konieczne do badań naukowych, dydaktyki w szkołach wyższych lub ochrony zdrowia ludzi bądź zwierząt, jeżeli celów tych nie można osiągnąć w inny sposób z powodu braku

odpowiednich metod alternatywnych. Osoba, która ma przeprowadzać doświadczenia i testy na zwierzętach, ma obowiązek korzystać z międzynarodowej informacji w danej dziedzinie nauki, by wyeliminować powtarzalność doświadczeń, jeżeli nie są one konieczne.”

**Rzeczywistość**

Zgodnie ze zmianami Ustawy o kosmetykach [Dz. U. 2004 Nr 213 poz. 2158], 15.10.2004 wszedł w życie przepis zakazujący wprowadzania do obrotu kosmetyków testowanych na zwierzętach.

Odpowiedzią na zmieniające się prawo i nowe wymagania miało być powstanie Polskiej Platformy Porozumienia ds. Rozwoju Metod Alternatywnych do Badań Na Zwierzętach [POLCOPA], mającej wejść w skład niedochodowej organizacji ECOPA [European Consensus Platform on 3-Rs Alternatives, <http://www.ecopa.eu/>] zrzeszającej podobne organizacje z innych krajów Europy.

Ogólnym zamierzeniem ECOPA jest stworzenie paneuropejskiego, swoistego związku 4 grup, przedstawicieli: przemysłu, nauki, rządu i ochrony zwierząt, który zajmowałby się harmonijnym wprowadzeniem idei 3R's (reduction, refinement, replacement) w badaniach na zwierzętach. Zgodnie z doświadczeniami twórców ECOPA, tylko połączone działania i interesy reprezentantów tych 4 środowisk odniosą sukces i przyczynią się do rozwoju metod alternatywnych ograniczających testowanie na zwierzętach. Aby sprostać ogromnemu naciskowi i zapotrzebowaniu na rozwój tych metod, ECOPA nawiązała bardzo ścisłe kontakty m. in. z ECVAM [European Centre for the Validation of Alternative Methods], ICCVAM [The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods] i OECD [The Organization for Economic Cooperation and Development].

Niewątpliwym wyróżnieniem było wystosowanie przez działaczy ECOPA zaproszenia do współpracy naukowców z Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi.

Podjęte przez Instytut działania miały na celu stworzenie polskiej platformy, w której składzie, zgodnie z założeniami, znaleźli się następujący przedstawiciele:

REKLAMA

Interplast

Producent  
opakowań  
z tworzyw  
sztucznych.



PL 62-020 Gortatowo, ul. Fabryczna 4  
E-mail: [biuro@interplastpn.pl](mailto:biuro@interplastpn.pl)

tel. +48 (61) 817 33 16  
tel./fax +48 (61) 817 25 25

[www.interplastpn.pl](http://www.interplastpn.pl)

**1. Nauki:**

- Krajowe Centrum Metod Alternatywnych Do Oceny Toksyczności działające przy Instytucie Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi [Dr M. Stępnik].
- Instytut Fizjologii i Żywnienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnii [Prof. B. Pastuszewska].

**2. Przemysłu:**

- Centrum Naukowo-Badawcze Instytutu Dr Ireny Eris [Dr R. Dębowska]
- Procter & Gamble [Dr M. Józefowicz]

**3. Rządu:**

- Krajowa Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach [Dr D. Śladowski] przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

**4. Ochrony Zwierząt:**

- Towarzystwo Opieki Nad Zwierzętami w Polsce [W. Muża]
- Stowarzyszenie Ochrony Zwierząt GAJA [P. Grzybowski]

Do głównych zadań Polskiej Platformy zalicza się:

- identyfikację ogólnokrajowych potrzeb w zakresie stosowania metod alternatywnych w różnych dziedzinach badań naukowych (testowanie substancji chemicznych w tym kosmetyków, szczepionek i preparatów medycznych, itd.),
- opracowanie i wdrożenie ogólnokrajowego programu edukacyjno-informacyjnego promującego metody alternatywne (seminaria, kursy praktyczne, wykłady, prezentacje multimedialne) obejmującego również pomoc przy implementacji tych metod w zainteresowanych laboratoriach,
- współpracę i merytoryczne wsparcie dla organów odpowiedzialnych za aspekty prawne dotyczące eksperymentów na zwierzętach (m.in. przy dostosowywaniu polskiego ustawodawstwa w tym zakresie do ustawodawstwa EU),
- promocję i udział polskich placówek badawczych w międzynarodowych programach dotyczących rozwoju i walidacji nowych metod alternatywnych (np. w ramach programu naukowego ECOPA tzw. eSI (ECOPA Sciencelntiative),
- ściśłą współpracę naukową z platformami z innych krajów europejskich, z ECOPA, jak również z ECVAM.

Obecnie POLCOPA, czyli Polska Platforma d/s Metod Alternatywnych jest stowarzyszonym, lecz nie pełnoprawnym członkiem organizacji ECOPA.

**Zasada 3R**

Podstawę zastosowania metod alternatywnych w badaniach toksykologicznych opisuje Zasada „3R”. Po raz pierwszy została ona określona w 1959 roku w opracowaniu „Zasady ludzkich technik eksperymentalnych” autorstwa W.M.S. Russell i R.L. Burch. Zgodnie z definicją, Zasada „3R”, a tym samym metody alternatywne mają na celu:

- **REDUCE**, czyli zmniejszyć liczbę zwierząt wykorzystanych do uzyskania określonej ilości informacji za pomocą badań,
- **REFINE**, czyli udoskonalić badania toksykologiczne, w celu zmniejszenia cierpienia zwierząt lub stresującego oddziaływania, lub,
- **REPLACE**, czyli zastąpić zwierzęta metodami bez ich udziału (in vitro, ex vivo lub in silico - za pomocą analizy komputerowej).

Zgodnie z powyższą definicją metody alternatywne to nie tylko metody in vitro, ale również ulepszone, zmodyfikowane metody in vivo. Te trzy rodzaje postępowania alternatywnych, nie wykluczają siebie nawzajem i na przykład badania in vitro mogą służyć jako częściowe zastąpienie badań na zwierzętach w odniesieniu do niektórych rodzajów badanych substancji, czy też szczególnego typu i / lub zakresu zagrożenia toksykologicznego. Jeżeli zaś testy in vitro zostały użyte w kontekście wielopoziomowej strategii badań, może to również służyć jako ograniczenie i udoskonalenie metod alternatywnych (np. może zmniejszyć liczbę substancji testowanych na zwierzętach, a szczególnie ilość toksycznych substancji).

Zasady „3 R” wyznaczają strategię dla racjonalnego i etapowego podejścia do minimalizacji wykorzystywania zwierząt w eksperymentach i ich cierpienia, bez uszczerbku dla naukowej jakości podejmowanych prac.

**Rys historyczny**

Od momentu opublikowania Zasad „3R” w 1959, opracowano szereg przydatnych metod alternatywnych służących ocenie potencjalnych efektów toksycznych substancji i produktów chemicznych. Wciąż jednak wprowadzenie metod alternatywnych w toksykologii do oficjalnego wykazu trwa wiele lat.

Od 1986 roku Koncepcja „3R” uzyskała wsparcie prawa UE, które wymaga od naukowców i badaczy korzystania z dostępnych metod alternatywnych przed przeprowadzeniem eksperymentów in vivo.

Bolońska Deklaracja „3R”, przyjęta w 1999 r. przez Trzeci Światowy Kongres Metod Alternatywnych i Wykorzystania Zwierząt w Naukach Biologicznych, szczególnie silnie potwierdziła potrzebę wprowadzenia w życie Zasady „3R”. Dzisiaj, **Redukcja, Udoskonalenie i Zastąpienie** to podstawowe założenia badań prowadzonych w UE ograniczające wykorzystanie zwierząt w badaniach naukowych i eksperymentach.

Dyrektywa Rady 86/609/EWG w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i naukowych w artykule 7.2 mówi:

„Eksperymentu nie przeprowadza się, jeżeli istnieje inna, racjonalnie i praktycznie dostępna, naukowo zadowolająca metoda uzyskania odpowiednich wyników, niewymagająca wykorzystania zwierząt.”

Artykuł 23 z kolei precyzuje:

Komisja i państwa członkowskie powinny zachęcać do badań nad rozwojem i walidacją metod alternatywnych, które mogą zapewnić ten sam poziom informacji jak te otrzymane w doświadczeniach z wykorzystaniem zwierząt, ale które dotyczą mniejszej liczby zwierząt lub które pociągają za sobą mniej bolesne procedury oraz podejmują inne działania, jakie uznają za stosowne do wspierania badań w tej dziedzinie. Komisja i państwa członkowskie powinny monitorować trendy w metodach doświadczalnych”.

W odpowiedzi na powyższe artykuły 7 i 23 dyrektywy Rady 86/609/ EWG, w 1991 roku utworzono Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods). Główne zadania ECVAM to:

- naukowa ocena i walidacja metod alternatywnych,
- działalność o charakterze centrum informacyjnego, oraz,
- prowadzenie bazy danych badań in vitro oraz metod zwalidowanych.

ECVAM monitoruje również projekty badawcze finansowane przez Komisję Europejską, utrzymuje kontakty z platformami typu ECOPA i stowarzyszeniami opartymi na eliminacji zwierząt wykorzystanych do celów naukowych i regulacyjnych.

Wg danych European Commission (2010). Report from the Commission to the Council and the European Parliament: Sixth report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the Member States of the European Union. SEC (2010) 1107 **w 2008 roku w 27 krajach UE użyto do badań naukowych 12 milionów zwierząt.**

Siódma poprawka Dyrektywy Kosmetycznej przewiduje zakończenie procesu zastępowania badań z udziałem zwierząt metodami alternatywnymi do 11 marca 2013 r. Wówczas wejdzie w życie całkowity zakaz wykonywania testów substancji chemicznych na zwierzętach [toksyczność dawki powtórzonej, toksyczny wpływ na zdolności reprodukcyjne, toksykokinetyka] pod warunkiem, że dostępne będą odpowiednie metody alternatywne.

Niewątpliwą przeszkodą w całkowitym zastąpieniu badań na zwierzętach jest brak zatwierdzenia wielu metod w ECVAM oraz długotrwały proces walidacji i rejestracji

W chwili obecnej większość wymaganych prawem parametrów toksykologicznych, a więc:

- toksyczność ostrej,
  - własności żrących i drażniących (skórę i oczy),
  - własności uczulających skórę,
  - absorpcji przez skórę oraz,
  - mutagenności/genotoksyczności,
- oraz dodatkowych, dotyczących:
- toksyczności przewlekłej,
  - fototoksyczności,
  - działania kancerogennego,
  - toksycznego wpływu na rozród oraz,
  - toksykokinetyki,

można określić tylko po wykonaniu testów na zwierzętach.

Obserwując kierunek zmian prawa EU w zarządzaniu substancjami chemicznymi, m. in. REACH- Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals, Dyrektywę Kosmetyczną 76/768/EWG (VII Poprawka: Nie dla zwierząt z 2009 r.), czy też Klasyfikację i Oznakowanie Chemikaliów oraz Przepisy Transportowe, można wnioskować, iż rozwój metod alternatywnych zastępujących testowanie na zwierzętach nabiera coraz większego znaczenia.

## Walidacja metod alternatywnych

Aby metoda alternatywna, opracowana przez akademickich i przemysłowych naukowców, została wprowadzona jako swoisty zamiennik badania na zwierzęciu, musi przejść skomplikowany proces walidacji oraz rejestracji, prowadzony przez Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM).

Obecnie stosowane kryteria walidacji nowych metod badań toksykologicznych zostały opracowane wspólnym wysiłkiem naukowców

## Twój partner w badaniach i rozwoju



Wysokiej jakości, kompleksowe i innowacyjne rozwiązania dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego

PozLab sp. z o.o.  
ul. Parkowa 2  
60-775 Poznań

[www.pozlab.pl](http://www.pozlab.pl)  
[pozlab@pozlab.pl](mailto:pozlab@pozlab.pl)



## Wiedza, doświadczenie i profesjonalizm w działaniu



### Oferujemy:

- ✓ Kompleksowe badania preformulacyjne
- ✓ Opracowywanie receptur produktów kosmetycznych i kosmeceutyków
- ✓ Wytwarzanie kontraktowe produktów w skali laboratoryjnej
- ✓ Rozwój i walidację metod analitycznych składników aktywnych, zanieczyszczeń i konserwantów
- ✓ Badania mikrobiologiczne, w tym testy konserwacji
- ✓ Testy przechowalnicze
- ✓ Analizy zgodności produktu z opakowaniem bezpośrednim

[www.pozlab.pl](http://www.pozlab.pl)  
[pozlab@pozlab.pl](mailto:pozlab@pozlab.pl)

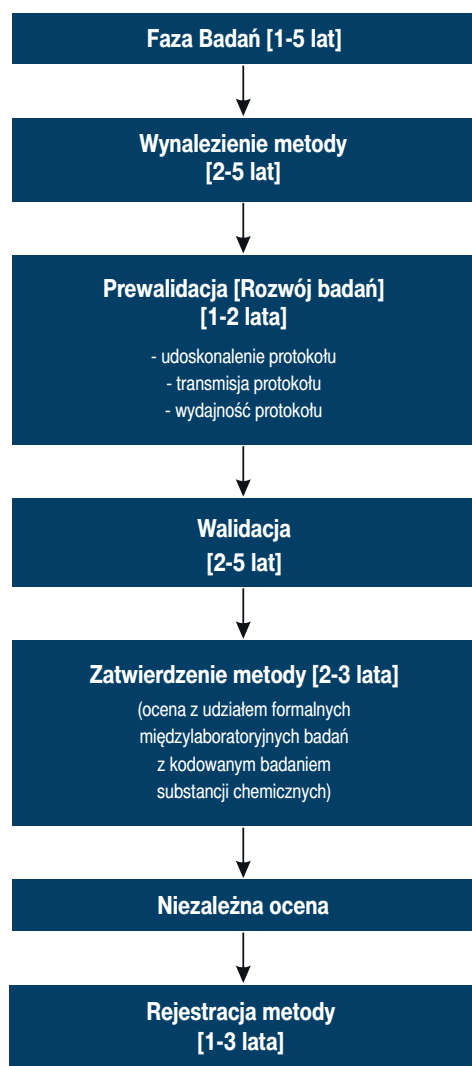


z obu grup in vivo i in vitro, specjalistów w dziedzinie rejestracji oraz innych ekspertów z początku lat 80-tych. Ostateczny kształt tych kryteriów, szczególnie opisanych w dokumencie OECD Guidance 34, jest wynikiem współpracy:

- Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM - the European Centre for the Validation of Alternative Methods),
- Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD - the Organization for Economic Cooperation and Development),
- Komitetu Koordynacyjnego ds. Weryfikacji Metod Alternatywnych (ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Współpraca tych międzynarodowych organizacji z krajowymi i zewnętrznymi ekspertami oraz organizacjami, takimi jak RAM, ZEBET i CAAT w zakresie ujednoczenia kryteriów walidacji, pozwala uniknąć zasadniczych różnic między badaniami pomiędzy krajami i kontynentami.

Proces walidacji jest wieloetapowy [schemat 1]. Badanie uznaje się za zatwierdzone, gdy charakterystyka jego działania, korzyści i ograniczenia zostały odpowiednio określone dla konkretnego celu. Zarówno, pomiary wiarygodności jak i przydatności metody badania są niezależnymi etapami walidacji nowej metody badania i obie są wymagane.



Schemat 1. Etapy walidacji metody alternatywnej

Proces walidacji potwierdza istotność naukową metody alternatywnej pod kątem klasyfikacji i oznakowania, zatwierdzenia produktu lub badania bezpieczeństwa.

W szczególności w trakcie walidacji określone są:

- wiarygodność i przydatność poszczególnych badań,
  - przystępność metody lub procesu badawczego,
  - niezawodność metody zdefiniowana jako zakres powtarzalności wyników w czasie badań w ramach jednego laboratorium i pomiędzy laboratoriami, gdy wykonywane są przy użyciu tego samego standardowego protokołu,
  - trafność metody badania, która opisuje zależność między badaniem a jego wynikami u gatunków docelowych oraz czy metoda badania jest znacząca i przydatna do określonego celu, wraz ze zidentyfikowanymi ograniczeniami.
- W skrócie, jest to zakres, w którym pomiary stosowaną metodą są prawidłowe lub przewidują (biologiczny) efekt.

Przewidywalność i niezawodność testu toksyczności określają:

- **czułość**, czyli procent pozytywnych (toksycznych) chemikaliów prawidłowo zidentyfikowanych,
- **specyficzność**, czyli procent substancji chemicznych negatywnych (nietoksycznych) prawidłowo rozpoznawanych,
- **przewidywalność**, czyli procent prognozy dla poszczególnych klasyfikacji, które były prawidłowe,
- **dokładność**, czyli ogólny odsetek poprawnych klasyfikacji.

Inne parametry oceniane przez biostatystyków podczas walidacji:

- **powtarzalność wyników** pomiędzy laboratoriami, czyli zgodność klasyfikacji między laboratoriami,
- **powtarzalność w laboratoriach**, czyli zgodność klasyfikacji między trzema i większą ilością niezależnych działań w jednym laboratorium,
- **prawdopodobieństwo** poprawności klasyfikacji.

Przegląd zwalidowanych alternatywnych metod badań toksyczności zgodnych z międzynarodowymi standardami oraz zatwierdzonych przez ECVAM, ICCVAM OECD, jest dostępny na stronie internetowej AltTox [[www.alttox.org](http://www.alttox.org)].

## Zastępowanie zwierząt w eksperymentach toksykologicznych

Do częściowego lub całkowitego zastąpienia zwierząt w eksperymentach toksykologicznych mogą być stosowane następujące systemy:

- metody in vitro: hodowle komórkowe, zrekonstruowane tkanki, systemy co-cultur
- ex vivo: wyizolowane zwierzęce tkanki i organy,
- in silico: symulacje komputerowe i modele matematyczne, np. QSAR

Podstawowymi zaletami badań in vitro są: brak skutków ubocznych dla innych organów, kontrolowane warunki badań oraz możliwy do

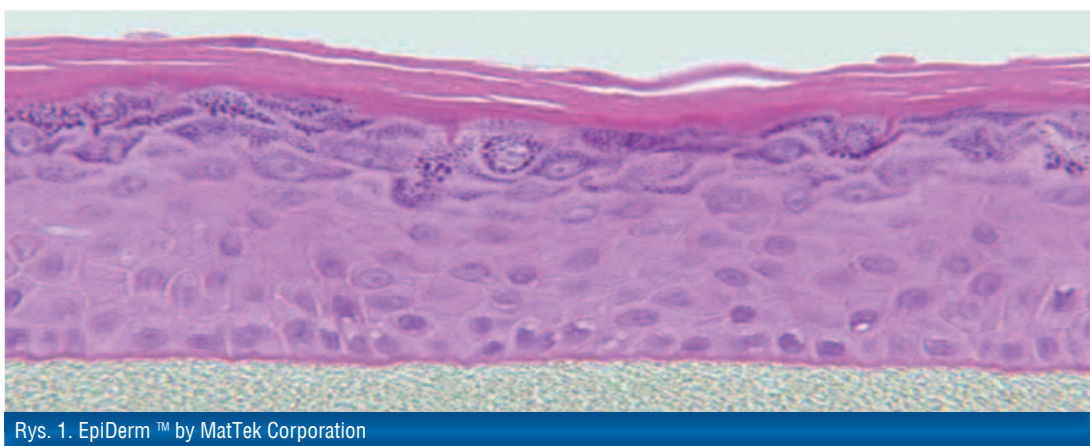
osiągnięcia wysoki poziom standaryzacji badań, co przekłada się na zmniejszenie różnic w wynikach badań pomiędzy doświadczeniami. W większości przypadków badanie jest szybkie i niedrogi, wymaga użycia niewielkiej ilości materiału do badania, a przy tym, co istotne wytwarza ograniczoną ilość toksycznych odpadów. W badaniach in vitro można wykorzystać do badań komórki i tkanki ludzkie oraz transgeniczne komórki niosące ludzkie geny, a ponadto ograniczyć badania z udziałem zwierząt.

Jak każda metoda badań, in vitro posiadają pewne ograniczenia jak np. to, że nie dają możliwości testowania interakcji między tkankami i narzędziami, nie można też ocenić działania ogólnoustrojowego, farmakokinetyki oraz przewlekłych skutków stosowania. Osobną kwestię stanowią ograniczenia techniczne: jak rozpuszczalność, reakcje z tworzywami sztucznymi, czy też brak właściwości bariery in vivo-podobnej.

Niewątpliwie jednak prawidłowo wybrane metody in vitro w zależności od celu badania, w połączeniu z dogłębną wiedzą na temat badanego

narzędzia do całkowitego lub częściowego zastępowania zwierząt w badaniach.

Nic dziwnego, że wsparcie ze wszystkich segmentów wspólnoty praw zwierząt jest ważne w rozwoju koncepcji 3R, w szczególności, w rozszerzeniu wykorzystania ludzkich komórek in vitro w modelach 3D, zwłaszcza w porównaniu do innych testów, które wykorzystują rozpoznawalne części ciała zwierzęcia. Przykładem jest, np. izolowana rogówka bydła w teście na integralność nabłonka [BCOP - Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay] do oceny działania drażniącego na oko, oraz test spływowych węzłów chłonnych na myszach (LLNA - Local Lymph Node Assay) do pomiaru uczulenia skóry. W wyraźnym kontraście pozostają zaś, organotypowe modele oparte na komórkach ludzkich, takie jak **EpiDerm™** zrekonstruowany ludzki naskórek [RHE Reconstructed Human Epidermis] [Rys 1, 2] i **EpiOcular™** model ludzkiego oka [Rys. 3], produkowane z normalnych ludzkich komórek uzyskanych z etycznych źródeł.



Rys. 1. EpiDerm™ by MatTek Corporation

związku (uzyskaną np. z baz danych lub symulacji komputerowych /QSAR, chemii analitycznej) mogą być bardziej trafne dla niektórych obszarów niż ich odpowiedniki z udziałem żywych zwierząt.

Do zbudowania modelu in vitro można wykorzystać:

- pierwotne kultury komórkowe,
- ustalone linie komórkowe,
- ciągłe linie komórkowe,
- trójwymiarowe zrekonstruowane tkanki

Na szczególną uwagę zasługują trójwymiarowe modele tkanek z komórek ludzkich. Geneza ich powstania jest ściśle związana z unikalnym procesem obróbki tworzywa sztucznego, przez co można wpłynąć na jego właściwość przylegania do komórek.

### Zasada „3R” a modele tkanek ludzkich „3D”

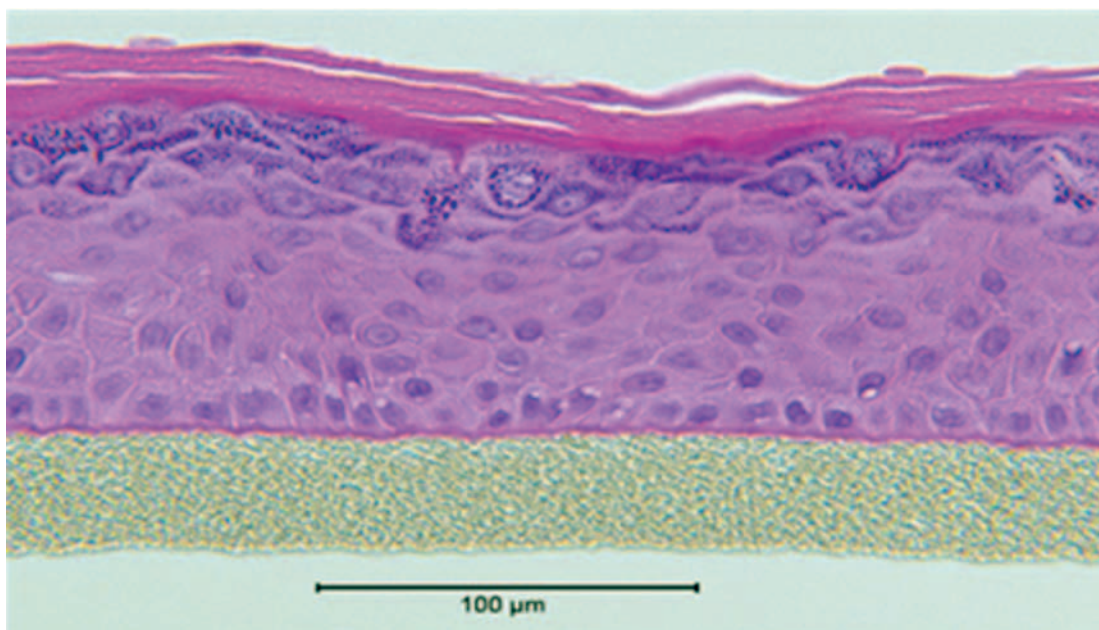
Od 1997 roku, zrekonstruowane modele tkankowe zostały zawarte w kilku międzynarodowych walidacjach i próbach walidacji, a ponadto zostały zaakceptowane przez Unię Europejską (UE) i amerykańskie organy regulacyjne, jak również przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), jako zatwierdzone

Trójwymiarowe modele in vitro są stosowane nie tylko ze względów humanitarnych, ale także dlatego, że dostarczają bardziej „fizjologicznych” danych naukowych. Ludzkie kultury tkankowe nie tylko lepiej reprezentują badaną właściwość, lecz również nie wprowadzają dodatkowych mechanizmów metabolizmu i detoksykacji występujących tylko u ssaków, co mogłyby uczynić eksperyment pozbawionym znaczenia.

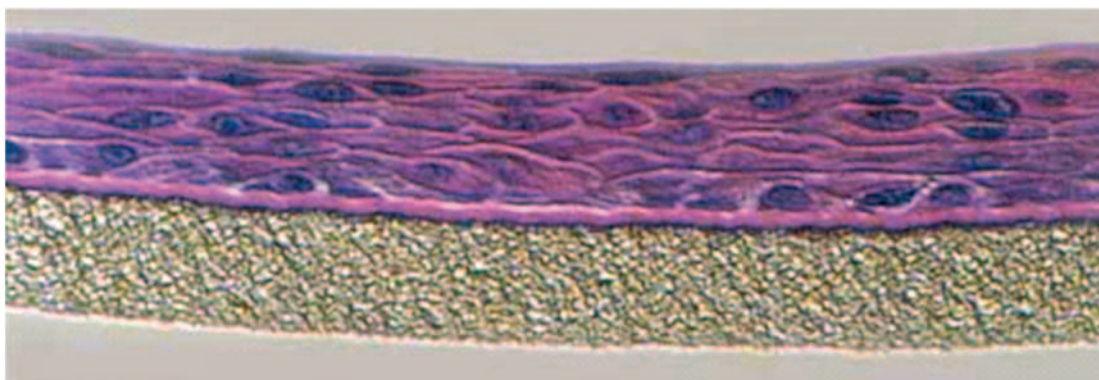
Metody badań oparte na ludzkich komórkach in vitro bazujące na trójwymiarowych modelach tkanek mają dodatkową zaletę – dostarczają więcej wyników badań in vivo. Na przykład w badaniu porównującym 4-godzinny test **Human Patch Test** i model **EpiDerm** używane w połączeniu z MTT, zgodności między tymi dwiema metodami wynosiła 76%.

Zgodność testu skórniego **Rabbit Draize** z **Human Patch Test** wyniosła tylko 56%.

Innym przykładem zwycięstwa zarówno dla obrońców praw zwierząt jak i badaczy, jest wykorzystanie tkanek **EpiOcular** [Rys. 3] przez przemysł, ponieważ wyniki badań lepiej odzwierciedlają rzeczywiste wykorzystanie na świecie i ludzkie oceny okulistyczne.



Rys. 2. EpiDerm™ by MatTek Corporation



Rys. 3. EpiOcular by MatTek Corporation

Choć formalna ocena i walidacja każdej metody *in vitro* może trwać ponad pięć lat, wartość i potencjał alternatywnych metod badawczych w oparciu o trójwymiarowe modele tkanek ludzkich *in vitro* jest rozpoznawana na długo przed formalnym potwierdzeniem. Dlatego zdarza się, że metoda badania może być przyjęta do powszechnego użycia bez formalnej walidacji.

Przykładem jest badanie podrażnienia oczu *in vitro* przy użyciu **EpiOcular** [trójwymiarowy model tkanki rogówki człowieka *in vitro*]. Badanie nie jest jeszcze formalnie zatwierdzone jako pełne zastępstwo *in vitro* dla Draize Eye Test Rabbit Irritation, jednakże wielu producentów kosmetyków i produktów do pielęgnacji w badaniach rozwojowych nowych produktów, rutynowo zastępuje test Draize systemem EpiOcular. Większa czułość badania z udziałem EpiOcular w stosunku do testu Draize'a, daje wyniki badania podrażnienia poniżej wartości uzyskanych z testu Draize'a, co pozwala na tworzenie możliwie najłagodniejszych produktów. Kolejnym powodem chętnego stosowania systemu EpiOcular są ilościowe, nie jakościowe wyniki badań w porównaniu z testem Draize, co dostarcza naukowcom bardziej wiarygodnych i powtarzalnych wyników badań. Ponieważ EpiOcular jest produkowany z komórek ludzkich, wyniki testu podrażnienia bardziej odpowiadają potencjałowi ludzkiego podrażnienia

oczu niż wyniki badań uzyskane z udziałem królików. Niewątpliwą korzyścią zastosowania systemu EpiOcular jest niższy koszt badania w porównaniu z badaniami przeprowadzanymi z udziałem zwierząt. Ostatnim zaś i najważniejszym argumentem przemawiającym na korzyść EpiOcular, jest eliminacja oraz znaczne ograniczenie wykorzystania zwierząt w badaniach rozwojowych nowych formuł.

## Wnioski

W wielu międzynarodowych walidacjach potwierdzono, że metody alternatywne posiadają ogromny potencjał w eliminacji bądź ograniczeniu udziału zwierząt w badaniach, szczególnie w badaniach bezpieczeństwa.

Dotychczas formalnie zarejestrowane, zwalidowane bądź częściowo ocenione metody alternatywne, pozwalają ograniczyć udział zwierząt w badaniach:

- genotoksyczności,
- miejscowego działania drażniącego i toksycznego [działanie żrące na skórę],
- kontroli jakości preparatów biologicznych,
- produkcji przeciwciał monoklonalnych,
- bezpieczeństwa finalnych produktów kosmetycznych.

Badania na zwierzętach mają z założenia przewidzieć potencjalne skutki zastosowania substancji u człowieka. Zdolności przewidujące tradycyjnych metod z udziałem zwierząt powinny być poddane ponownej analizie. Te rozważania znacznie zwiększą zdolność do wytwarzania odpowiednich i wiarygodnych metod alternatywnych rzeczywiście przewidujących oddziaływanie na zdrowie człowieka.

Według danych Europejskiego Stowarzyszenia Kosmetycznego [COLIPA – The European Cosmetics Association] przedstawione poniżej 4 typy badań toksyczności mogą być ocenione przy użyciu metod in vitro zastępujących badania z udziałem zwierząt. [Tabela 1].

#### Źródła

- Ustawa o kosmetykach z dnia 30 marca 2001 r. [Dz. U. 2001 Nr 42 poz. 473] wraz z późniejszymi zmianami: [Dz. U. 2003 Nr 208 poz. 2019, Dz. U. 2004 Nr 213 poz.2158].
- Ustawy o ochronie zwierząt z 21 sierpnia 1997
- Sheasgreen, J., Klausner, M., Kandárová, H. and Ingalls, D. (2009).The MatTek Story - How the Three Rs Principles Led to 3-D Tissue Success! ATLA 37, 611-622.
- Kandárová, H. and Letašiová, S.(2011). Alternative Methods in Toxicology: Pre-validated and Validated Methods. Interdisciplinary Toxicology, Volume 4(3). In press.
- www.imp.lodz.pl
- European Commission (2010). Report from the Commission to the Council and the European Parliament: Sixth report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the Member States of the European Union. SEC (2010) 1107
- www.colipa.eu
- www.ecvam.com
- www.ecopa.eu

Temat	Opis	Zastąpienie
Działanie żrące na skórę	Nieodwracalne zniszczenie tkanki skórnej przez substancje chemiczne	Test przezskórnej oporności elektrycznej oporności na skórze Modele ludzkiej skóry Epiderm, EpiSkin oraz SkinEthic [wytyczne OECD TG 431, przyjęte w 2004 r.]
Fototoksyczność	Podrażnienie, pojawiające się tylko wtedy, gdy substancja jest narażona na promieniowanie ultrafioletowe (UV)	Test wychwyty czerwieni obojętnej 3T3 [wytyczne OECD TG 432, przyjęte w 2004 r.]
Wchłanianie przez skórę	Wchłanianie substancji przez skórę	Metoda in vitro ** OECD Guidelines TG 428
Podrażnienie skóry	Miejscowe objawy skórne np. zaczerwienienie, pieczenie lub poparzenie	Modele ludzkiej skóry Epiderm, EpiSkin oraz SkinEthic [wytyczne OECD TG 439, przyjęte w 2009 r.]

Tab. 1. Metody alternatywne zwalidowane przez ECVAM

Zostały one opracowane dzięki ogromnemu zaangażowaniu przemysłu kosmetycznego. 4 metody zostały ostatecznie zwalidowane przez ECVAM, natomiast piąta, czyli —test absorpcji przezskórnej in vitro —został oficjalnie zatwierdzony przez OECD.

Obecnie przemysł kosmetyczny skupiony jest na rozwoju metod alternatywnych w czterech strategicznych obszarach:

- działanie drażniące na oko,
- genotoksyczność / mutageność,
- działanie uczulające na skórę,
- toksyczność (w tym toksyczność po podaniu wielokrotnym).

W chwili obecnej kosmetyki zawierające substancje testowane na zwierzętach, objęte są zakazem badań oraz działań marketingowych. Zakaz badań substancji testowanych z udziałem zwierząt istnieje od 2009 roku. Nie obejmuje on jednak grupy substancji, nie posiadających zatwierdzonych i dostępnych metod alternatywnych badań toksykologicznych. Dla tych substancji zakaz zacznie obowiązywać dopiero w 2013 roku, dlatego badanie określające działanie uczulające na skórę wciąż można wykonywać w warunkach in vivo [test splotywojących węzłów chłonnych na myszach – LLNA].

W 2013 r. zacznie jednak obowiązywać całkowity zakaz testowania na zwierzętach wszystkich substancji, bez uwzględnienia obecnych wyjątków. Wiemy jednak, że do tego czasu nie będą dostępne metody alternatywne dla wszystkich substancji.

Przedstawia to ogromny problem dla przemysłu kosmetycznego.

REKLAMA

**BIURO TECHNOLOGICZNO-MARKETINGOWE "TTM"**  
mgr inż. Sławomir Podgajny  
PL-95-060 BRZEZINY, ul. Konopnickiej 20  
tel./fax +48 46 8742813, tel. +46 60 1314947

**ttm**  
od 1989 r.

**zakład konstrukcji maszyn dla małych firm przemysłu**

- kosmetycznego
- chemicznego
- farmaceutycznego
- spożywczego

**produkujemy maszyny i urządzenia z materiałów AISI 304/316**

beczki, zbiorniki, mieszalniki (w tym próżniowe, wielopłaszczkowe), miazdła, miazdła na kolumnach podnośnikowych, homogenizatory, pompy, młynki korundowe, młynki koloidalne, płuczki opakowań, przenośniki płytkowe, rolkowe, taśmowe, dozowniki półautomatyczne i automatyczne (liniowe), napełniarki próżniowe, napełniarki ciśnieniowe, zakręcarki, etykietarki, aplikatory, zgrzewarki indukcyjne plomb, stoły, pakowarki w folię termokurczliwą, urządzenia obkurczające etykiety termokurczliwe, zgrzewarki, wykrywacze metali, stelaże wspomagające rozładunek kanistrów i innych opakowań

**machines, equipment, food production technologies, packaging machines**

ttm@ttm.pl  
**www.ttm.pl**