

Etika i alternativni modeli u toksikološkim istraživanjima

Roller, Morana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:022324>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2021.

Morana Roller

894/MB

**ETIKA I ALTERNATIVNI
MODELI U TOKSIKOLOŠKIM
ISTRAŽIVANJIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Ivane Kmetič te uz pomoć doc. dr. sc. Teute Murati i asistentice Marine Miletić, mag. ing.



Ovaj rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta *"Bolničke zaštitne tekstilije,"* UIP-2017-05-8780.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ETIKA I ALTERNATIVNI MODELI U TOKSIKOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

Morana Roller, 894/MB

Sažetak: Korištenje pokusnih životinja, embrija, humanog i animalnog tkiva, kultura stanica i fetalnog seruma u toksikološkim istraživanjima smatra se etički upitnim te je ograničeno zakonima, pravilnicima i praksama. Razmatranjem načina kojima bi se nehumanost mogla izbjeći, došlo je do razvoja 3R modela - akronim za tri pristupa koji bi se trebala provoditi po ovom načelu pri istraživanjima na pokusnim životinjama, a to su: smanjenje (engl. *Reduction*), zamjena (engl. *Replacement*) i poboljšanje (engl. *Refinement*). Kod ispitivanja dermalne toksičnosti moguća je zamjena *in vivo* testova alternativnim metodama. Kožne reakcije preosjetljivosti su česte i nužno je ispitati potencijal izazivanja takvih reakcija za sastojke kozmetičkih proizvoda. Kako bi se izbjeglo ispitivanje na životinjama zbog zakonskih ograničenja, razvijeni su i evaluirani mnogi alternativni testovi. *In vitro* metode (npr. KeratinoSens i LuSens testovi) omogućuju predviđanje kožne preosjetljivosti ispitivanjem učinaka na uzgojene kulture stanica. *In chemico* testovi ne koriste stanice, nego prate vezanje tvari na sintetske peptide strukturno slične proteinima u koži. Integriranim pristupom moguće je ispitati potencijal kožne preosjetljivosti isključivo alternativnim metodama.

Ključne riječi: *alternativni testovi toksičnosti, bioetika, dermalna toksičnost, in vitro toksikologija, pokusne životinje*

Rad sadrži: 72 stranice, 8 slika, 3 tablice, 106 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: doc. dr.sc. Teuta Murati

Marina Miletić, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Teuta Murati
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
3. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
4. Prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević (zamjena)

Datum obrane: 5. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ETHICS AND ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY STUDIES

Morana Roller, 894/MB

Abstract: Using animals, embryo, human and animal tissues, cell cultures and fetal serum in toxicology testing is considered ethically questionable and is restricted by laws, policies and practices. Considering the principles of inhumanity avoidance, 3R model was developed - an acronym for reduction, replacement and refinement, the three basic rules that should be applied in animal testing. Replacement of animal testing with an alternative could be possible for dermal toxicity studies. Skin sensitivity is a common condition and skin-sensitizing capacity of cosmetic products needs to be determined. To avoid animal testing for cosmetics due to legal restrictions, many alternative tests have been developed and evaluated. *In vitro* methods, such as KeratinoSens™ and LuSens can determine skin-sensitizing potential of chemicals by capturing key events in skin sensitivity on cell lines. *In chemico* tests are cell-free tests that determine skin-sensitization potential by measuring depletion of synthetic peptides. Integrated approach can determine skin-sensitization potential using only non-animal methods.

Keywords: *alternative toxicity testing, bioethics, dermal toxicity, in vitro toxicology, test animals*

Thesis contains: 72 pages, 8 figures, 3 tables, 106 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor

Technical support and assistance: PhD. Teuta Murati, Assistant Professor

BSc. Marina Miletić, Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. Teuta Murati, Assistant professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
3. PhD. Igor Slivac, Associate professor
4. PhD. Irena Landeka Jurčević, Full professor (substitute)

Thesis defended: February 5th, 2021

Sadržaj.....	stranica
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ETIKA U TOKSIKOLOŠIM ISTRAŽIVANJIMA.....	2
2.1.1. Razvoj misli o etici u znanstvenim istraživanjima.....	3
2.1.2. Stav javnosti prema istraživanjima na životinjama.....	4
2.1.3. Etička pitanja kod primjene testova toksičnosti.....	5
2.1.4. Korištenje ljudi i ljudskog materijala za istraživanja.....	9
2.1.5. Dobivanje biološkog materijala ljudskog podrijetla i matičnih stanica.....	9
2.1.5.1. Korištenje životinjskih i ljudskih embrija.....	10
2.1.6. 3R načelo u zaštiti dobrobiti pokusnih životinja.....	11
2.1.7. Korištenje životinja u svrhe istraživanja u svijetu i Europskoj uniji.....	12
2.1.8. Smanjenje broja životinja koje se koriste za eksperimente.....	15
2.1.9. Relativna i apsolutna zamjena životinjskih modela u istraživanjima.....	16
2.1.10. Pобоljšanje životnih uvjeta i briga o pokusnim životinjama.....	19
2.1.11. Zakonska regulativa u testiranju na životinjama u Europi i svijetu.....	21
2.1.12. Procjena etičke prihvatljivosti istraživanja.....	24
2.2. TESTOVI TOKSIČNOSTI.....	26
2.2.1. <i>In vivo</i> testovi toksičnosti.....	27
2.2.2. Mikrodoziranje.....	28
2.2.3. <i>In vitro</i> testovi toksičnosti.....	30
2.2.3.1. Kulture stanica i tkiva u <i>in vitro</i> ispitivanjima toksičnosti.....	32
2.2.3.2. Serum životinjskog podrijetla.....	33
2.2.3.3. Dobra praksa za uzgoj životinjskih stanica.....	34
2.2.4. <i>In silico</i> modeli.....	37
2.2.5. Ograničenja alternativnih testova toksičnosti.....	39
2.3. ISPITIVANJE DERMALNE TOKSIČNOSTI I KOŽNE PREOSJETLJIVOSTI TRADICIONALNIM I ALTERNATIVNIM METODAMA.....	40
2.3.1. Akutna dermalna toksičnost i klasifikacija dermalnih toksikanata.....	41
2.3.2. Testiranje dermalne toksičnosti.....	42
2.3.3. <i>In vivo</i> testiranje dermalne toksičnosti.....	42
2.3.4. Testiranje kožne preosjetljivosti.....	43
2.3.4.1. <i>In vivo</i> testovi kožne preosjetljivosti.....	45
2.3.4.2. Alternativni testovi za testiranje kožne preosjetljivosti.....	47
2.3.5. Kulture stanica u ispitivanju dermalne toksičnosti.....	48
2.3.5.1. 2D kulture stanica.....	48
2.3.5.2. 3D konstrukti.....	50
2.3.6. <i>In silico</i> modeli u ispitivanju preosjetljivosti kože i integrirane mikrofluidičke platforme.....	51
2.3.7. Ispitivanje mjesta vezanja proteina.....	52
2.3.8. Usporedba ekvivalenata kože i kože kao organa.....	53
2.3.9. Integrirani pristup.....	53
2.3.10. Zakonska regulativa u testiranju kozmetičkih proizvoda na životinjama u EU i ostatku svijeta.....	57
2.3.11. Provođenje smjernica o zabrani ispitivanja na životinjama i problemi sa zabranom testiranja.....	59
3. ZAKLJUČCI.....	60
4. LITERATURA.....	62
5. PRILOZI	
5.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA	

1. UVOD

U svim se ljudskim djelatnostima, pa tako i u znanstvenim istraživanjima, potrebno ponašati u skladu s moralnim načelima zajednice u kojoj živimo. Unazad nekoliko desetaka godina, korištenje pokusnih životinja u znanstvenim istraživanjima jedno je od najčešće diskutiranih etičkih pitanja, kako u znanstvenim krugovima tako i u javnosti.

Toksikologija kao interdisciplinarno znanstveno područje nužno uključuje mnoga testiranja na životinjama koje služe kao modeli za ispitivanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti različitih tvari. Korištenju životinja u toksikološkim i drugim sličnim istraživanjima protive se mnogi znanstvenici, tvrdeći da ih je potrebno ukinuti, zamijeniti alternativnim metodama i/ili unaprijediti. Tema ovog rada je provjera mogućnosti korištenja zamjenskih testova i njihove dostupnosti, kao i pregled postojećih metoda te razrada njihove uspješnosti u cilju smanjenja korištenja životinja. Ispitivanje kožne preosjetljivosti jedan je od testova u kojem je korištenje životinja bilo visoko zastupljeno, a koža je organ kojega je moguće jednostavnije rekonstruirati *in vitro* od složenijih sustava unutrašnjih organa. Zbog toga je tema ovog rada i pitanje etičnosti u ispitivanju dermalne toksičnosti i kožne preosjetljivosti. Istražit će se potencijal zamjene testova koji koriste laboratorijske životinje alternativnim testovima kao i razvoj te unaprjeđenje alternativnih testova za ispitivanje kožne preosjetljivosti.

Etika u toksikologiji, kao i u drugim znanostima, postavlja društvena i politička pitanja s ciljem unapređenja društva u cjelini. U radu će se istražiti u kojoj mjeri zakoni pridonose napretku u razvoju alternativnih testova i smanjenju korištenja životinja, posebice na razini Europske unije. Osim ispitivanja na životinjama, postoji i niz drugih etičkih pitanja u toksikološkim istraživanjima. Ona se odnose na korištenje embrija životinja i ljudi, provedbu ispitivanja na ljudima, korištenje tkiva i stanica ljudskog podrijetla, embrionalnih matičnih stanica i fetalnog seruma.

U ovom diplomskom radu obuhvaćen je pregled literature na temu etike u znanstvenim istraživanjima, posebice u onih ispitivanja koja uključuju primjenu pokusnih životinja u toksikologiji. Dan je uvid u alternativne testove toksičnosti te pregled zakona i pravilnika koji imaju utjecaj na ispitivanja na životinjama. Razrađena su neka etička načela u toksikološkim istraživanjima koja se najčešće dovode u pitanje. Objasnjeni su postupci koji se smatraju problematičnima, postupci koji im služe kao zamjena, primjerenost i potencijal zamjene te zakonska regulativa koja ima za zadaću maksimalno smanjiti provođenje etički upitnih postupaka u ispitivanju toksičnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ETIKA U TOKSIKOLOŠIM ISTRAŽIVANJIMA

Izraz etika dolazi od grčke riječi *ἠθικός* (moralan, ćudoredan) i koristi se za opis tri pojma: skup načela moralnog ponašanja, znanost o moralu i disciplina unutar filozofije (Hrvatska enciklopedija, 2020a).

Pojam etika se u slobodnom govoru najčešće odnosi na skup načela moralnog ponašanja koji obuhvaća sva moralna ponašanja nekog društva ili društvene skupine. Načela moralnog ponašanja se zasnivaju na temeljnim društvenim vrijednostima poput poštenja, dobrote i ljudskosti. Etika proučava moral kao društveni fenomen u kontekstu konkretnih ljudskih postupaka u okviru maksima (osnovno načelo kojeg se ćovjek pridržava u životu) i civilizacijskih pravila u društvu. Znanost etika može biti i filozofska disciplina koja ispituje zasnovanosti i izvor morala, odnosno filozofija morala. Filozofija morala je filozofska disciplina koja proučava temeljne kriterije za vrednovanje te ciljeve i smisao moralnih htijenja i djelovanja. Izvor morala može biti izvan ćovjeka ili imanentan ćovjeku, odnosno sastavni dio njegove biti (Hrvatska enciklopedija, 2020a).

U prirodnim je znanostima nužno obratiti pozornost na etičnost istraživanja, odnosno pripaziti da postupci u obavljanju znanstvenih djelatnosti budu u skladu s etičkim načelima vremena i kulture u kojoj živimo. To se najviše odnosi na istraživanja za ćije je provođenje potrebno uključiti druga živa bića ili kada tijekom istraživanja ima na njih utjecaj. Druga živaća bića mogu biti uključena direktno kao testni subjekti. To se događa primjerice kod ispitivanja utjecaja neke tvari na živo biće, životinju ili ćovjeka. Ukljućenje u procese znanstvenih istraživanja može biti i indirektno, primjerice kao subjekte pokazatelje zagađenja okoliša uslijed neke ekološke katastrofe, kao i korištenje ljudi i životinja za dobivanje biološkog materijala (tkiva, stanica, seruma) za znanstvena ispitivanja. Znanstveno ispitivanje na ljudima provodi se dobrovoljno, a subjekti se tretiraju određenim dozama lijeka ili cjepiva tijekom klinićkih ispitivanja. Serum, tkiva, stanice i embriji humanog podrijetla također se dobivaju od dobrovoljnih darivatelja, odnosno embrija preostalih nakon *in vitro* oplodnje (Sills i sur., 2005; Cheluvappa i sur., 2017).

Ukljućivanje životinja u znanstvena istraživanja etićki je problematićno zbog pretpostavke da životinje osjećaju bol, nelagodu i patnju tijekom istraživanja, kao i zbog mogućnosti smrti životinja. Jedan od primjera za to je vivisekcija, odnosno anatomska sekcija ili izvođenje kirurškoga postupka na živom organizmu za potrebe znanstvenog istraživanja iz područja animalne fiziologije, kirurgije ili farmakologije. Može se provoditi na ljudima ili životinjama

(Hrvatska enciklopedija, 2020b). Toksikološka istraživanja su po ovom pitanju posebice problematična jer uključuju korištenje biološkog materijala životinjskog ili ljudskog podrijetla. Prema antropocentričkoj ideologiji, čovjek je jedino biće koje ima razum i slobodnu volju te zbog toga zaslužuje posebno mjesto u svijetu. S druge strane, neantropocentrizam je proširenje etike po kojem i priroda i životinje imaju vlastitu vrijednost. Prema neantropocentričkoj ideologiji, kod ljudskog bi djelovanja trebalo uzeti u obzir i zaštitu prirode te prava životinja. Neantropocentrički pogled na prava životinja zasniva se na tri osnovna stava. Prvi je da su životinje živa bića koja mogu patiti te imaju interese i potrebe slične ljudskim. Drugi je da po principu jednakosti interesi životinja moraju biti uvaženi poput ljudskih. Treća je da životinje imaju vrijednost koja proizlazi iz svijesti ili srodstva s ljudima (Kaluđerović, 2009; Tićac i Marinović, 2017).

2.1.1. Razvoj misli o etici u znanstvenim istraživanjima

Etika je skup načela koji bi trebao biti urođen svakom članu zajednice pa tako i znanstvenicima i liječnicima. Tijekom povijesti, etička načela su se mijenjala s obzirom na evoluciju filozofske misli, ali i razvoj znanosti i medicine (Germain i sur., 2017; Hrvatska enciklopedija, 2020a).

Vivisekcija ima dugu tradiciju. U II stoljeću prije Krista Galen je u sklopu Aleksandrijske škole provodio vivisekciju svinja kako bi dokazao da arterijama teče krv, a ne zrak. Ovaj je znanstveni dokaz zaslužan za opstanak i izmjenu Hipokratove medicine, po kojoj zdravlje ovisi o ravnoteži humora, odnosno ravnoteži četiri glavne tekućine u tijelu. Teorija humora je bilo osnovno načelo medicine u srednjem vijeku te je dominirala do XIX stoljeća. William Harvey je u XVII stoljeću provodio istraživanja koja su uključivala vivisekciju, također kako bi objasnio anatomiju i fiziologiju krvožilnog sustava (Štojs, 2014; Ackerknecht i Haushofer, 2016).

Ideje protiv eksperimentiranja na životinjama javile su se u staroj Grčkoj te u Rimskoj filozofiji, kao odgovor na testiranje na životinjama tadašnjih znanstvenika. Koncepti medicinske etike postoje i u indijskoj, egipatskoj, kineskoj, arapskoj te babilonskoj medicini. U islamskoj se medicini etika zasnivala na konceptima odgovornosti prema pacijentima, sebi i odgovornosti pacijenta prema liječnicima. Takva su se pravila prije svega odnosila na odnos liječnika i pacijenata tijekom liječenja, a ne na znanstvena istraživanja (Štojs, 2014; Ackerknecht i Haushofer, 2016).

Moderna ideja protiv vivisekcije i općenito uporabe životinjskih modela u istraživanjima potječe iz XIX stoljeća. Prema prvim zapisima, protivnici uporabe pokusnih životinja tvrde da je moralni napredak čovječanstva došao do stadija u kojemu se misli i na dobrobit životinja. U

filozofiji XVII i XVIII stoljeća prevladavao je pogled u kojemu su životinje bezdušni strojevi i instrumenti, dok je u modernoj filozofiji u obzir uzeta njihova sposobnost za patnju i njihov odnos s ljudima (Germain i sur., 2017).

Odnos ljudi i životinja te briga za životinje znatno se promijenio kroz posljednje stoljeće zbog promjene uloge životinja u svakodnevnom životu. Posjedovanje kućnih ljubimaca često za posljedicu ima negativan odnos prema prihvaćanju korištenja životinja u istraživanjima. Pokret protiv životinjskih modela je društveno složeni fenomen koji se bavi dobrobiti životinja, moralnim shvaćanjem životinja i ljudi te zaštitom protiv iskorištavanja i prodaje životinja za ljudsku korist. Tijekom vremena to je postao politički problem, problem moći i problem odnosa između znanstvenika i ostatka društva. Zahtjevi za prava životinja moraju biti kompatibilni s uobičajenim razmišljanjem o etici i ostvarivi u praktičkim i političkim okvirima (Kaluderović, 2009; Germain i sur., 2017). Razni pokreti protiv vivisekcije se često odnose iznimno na znanost, dok zanemaruju ostale aspekte ljudskog života u kojima dolazi do lošeg tretiranja životinja. Tako prema mnogim propisima laboratorijske životinje „vrijede više“ od ostalih životinja u društvu jer je istovremeno uzgoj i ubijanje životinja za proizvodnju mesa i ostalih prehrambenih proizvoda etički prihvaćeniji (Hagelin i sur., 2003; Germain i sur., 2017).

Zagovornici eksperimenata u kojima se životinje koriste kao model, znanstvenike koji im se protive prikazuju konzervativnima te tvrde da se odupiru znanstvenom napretku, budući da napredak znanosti ima pogodan utjecaj na živote i ljudi i životinja. Neki smatraju kako dobrobit koja dolazi od znanosti uvijek opravdava istraživanja na životinjama te da je znanost prilagođena idealnom kompromisu između imperativa znanstvenog i moralnog napretka čovječanstva. Za moderni pokret protiv vivisekcije se smatra da je nastao u Velikoj Britaniji u Viktorijansko doba u konzervativnom i religioznom društvu Puritanaca te nije imao potporu siromašnije radničke klase, a danas ima potporu iz svih slojeva društva (Germain i sur., 2017).

2.1.2. Stav javnosti prema istraživanjima na životinjama

Teško je moguće saznati generalni stav javnosti prema znanstvenim istraživanjima na životinjama koji bi bio vjerodostojan jer metodologija i naručitelji tih istraživanja utječu u značajnoj mjeri na rezultate. Također, stavovi se znatno razlikuju s obzirom na dob, spol, osobne i kulturne karakteristike te karakteristike životinja o kojima se radi. U suvremenom društvu ljudi imaju različit stav prema korištenju životinja ovisno o tome koja se vrsta životinja koristi u eksperimentalne svrhe. Životinje koje su prihvaćene kao kućni ljubimci (npr. psi i mačke) kao i primati, ljudi doživljavaju kao životinje većih mentalnih sposobnosti pa smatraju

da su nepogodne za istraživanje. S druge strane, podržavaju korištenje drugih vrsta životinja za koje misle da su mentalno manje razvijene (npr. miševi, štakori ili ribe). Tako ista osoba može podržavati istraživanja na jednoj, a protiviti se istraživanjima na drugoj skupini životinja. Također, životinje koje zadrže neonatalni izgled (neotenziju) će češće biti smatrane nepogodnima za istraživanja. Na stavove ljudi utječe i krajnji cilj istraživanja za koji se koriste životinje te životni uvjeti u kojima se drže tijekom eksperimenata. Znanstvena i medicinska istraživanja imaju veću potporu javnosti kada je u pitanju dozvola korištenja životinja za testiranje, od istraživanja za druge svrhe (Festing i Wilkinson, 2007; Ormandy i Schuppli, 2014).

Istraživanje provedeno na 987 odraslih osoba u Velikoj Britaniji 2018. godine pokazalo je kako 68 % stanovništva prihvaća korištenje životinja u znanstvene svrhe. Za potpunu zabranu istraživanja na životinjama izjasnilo se 27 % stanovnika. U odnosu na 2016. godinu, broj ljudi koji se u potpunosti slaže s upotrebom životinja u znanstvenim istraživanjima se blago smanjio za sve vrste istraživanja. Prema rezultatima ove studije većina javnosti slaže se kako je potrebno učiniti više kako bi se pronašle alternative korištenju životinja. Dio javnosti koji se slaže da je upotreba životinja u medicinskim istraživanjima bitna je 41 % te je u padu. Samo 15 % javnosti tvrdi da uopće nisu zabrinuti zbog upotrebe životinja u istraživanjima, a taj broj je u padu u odnosu na 2016. godinu. Ovi rezultati upućuju na senzibiliziranost javnosti kada je u pitanju testiranje na životinjama te na sve manje prihvaćanje upotrebe pokusnih životinja, a razlog tome može biti i nedovoljna informiranost o nužnosti takvih testova (IPSOS Mori, 2018)

Znanstvena zajednica i farmaceutska industrija ulažu veliki napor, resurse i materijalna sredstva u razvoj znanosti i tehnologije kako bi se životinje zamijenile alternativnim modelima kad i gdje god je to moguće (Festing i Wilkinson, 2007).

2.1.3. Etička pitanja kod primjene testova toksičnosti

Testiranje na životinjama najčešće se koristi u svrhu procjene sigurnosti i učinkovitosti kemikalija, pesticida, potrošačkih proizvoda, lijekova, medicinskih uređaja, cjepiva i mnogih drugih proizvoda. Ta istraživanja su neophodna jer su zahtijevana od strane nadležnih regulatornih tijela te su nužna kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi, životinja i održala zaštita okoliša. Većina akutnih testova toksičnosti provodi se najčešće pomoću miševa, štakora, zamoraca i zečeva (Krewski i sur., 2010; Stokes, 2015). Upotreba životinja u istraživanju i podučavanju podliježe strogim etičkim smjernicama te se uvijek u obzir uzimaju alternativna ispitivanja (Krewski i sur., 2010).

Testovi toksičnosti koji kao testni sustav koriste žive životinje nazivaju se *in vivo* testovima toksičnosti, a objašnjeni su u poglavlju 2.2.1. Tijekom toksikoloških ispitivanja kod životinja dolazi do razvoja ozljeda i bolesti, a moguća je i prisutnost boli i patnje. Ponekad sam test može imati letalan ishod za životinju. To se danas smatra najvećim etičkim problemom *in vivo* testova toksičnosti. Osnovni argument koji se navodi protiv testiranja na životinjama je činjenica da su životinje živa bića s razvijenim živčanim sustavom koja imaju osjet boli i osjećaju patnju i nevolju, zbog čega ih ne bi trebalo podlagati tome u svrhu istraživanja (Doke i Dhawale, 2015). Mnogi pobornici pokreta protiv istraživanja na životinjama koji nisu iz znanstvenih krugova smatraju kako životinje pate na isti način kao i ljudi, a u prilog tome govori i teorija evolucije. Međutim, u početcima se ideje o smanjenju testiranja na životinjama nisu odnosile samo na dobrobit životinja, već primarno na moralno pitanje tih eksperimenata i prvotnog pronalaženja načina za provođenje tih eksperimenata. Dovodi se u upit moral liječnika ili znanstvenika koji su ustanovili laboratorijske testove na životinjama i provodili ih (Germain i sur., 2017).

Patnju je moguće primijetiti na laboratorijskim životinjama i moguće je procijeniti kada životinja pati, a kada ne. Na temelju opažanja može se donijeti pravodoban zaključak o patnji životinje. Razlika između ljudi i životinja je i činjenica da neke vrste mogu osjetiti i ispuštati mirise, visoke frekvencije zvukova, infracrveno ili UV svjetlo što ljudskim osjetilima nije moguće registrirati (Bateson, 1986; Germain i sur., 2017). Životinje mogu pokazivati osjet boli i nelagode na različite načine. Neke se životinje umire i ostanu nepokretne i tihe kada su u opasnosti, što je njihov obrambeni mehanizam. Znanja o prirodnom ponašanju životinja se moraju inkorporirati u procjenu iz razloga što se tako može suziti spektar okolnosti u kojima se smatra da životinje pate. Izolacija životinje od ostalih pripadnika iste vrste može kod nekih uzrokovati velik stres (npr. majmuni), a kod nekih nema utjecaja (npr. ptice). Znanje o ponašanju životinja stečeno je u velikoj mjeri promatranjem životinja u divljini, u njihovom prirodnom staništu te za to uglavnom nisu bili potrebni testovi na laboratorijskim životinjama (Bateson, 1986).

Prema Russellu i Burchu, na čijem se radu temelji najčešće korišten princip etičnosti u istraživanjima na životinjama, općenito se pojam svijesti razmatra kao beskorisni koncept, apstraktan sam po sebi. Sav napredak u ovom polju nije postignut uslijed brige oko samog pojma svijesti, nego uzimajući svijest kao jednu od varijabli u procjeni etičnosti istraživanja i proučavajući različita stanja svijesti (Russell i Burch, 1959). Veliki napredak u istraživanju svijesti je postignut zahvaljujući neurokirurgiji. Na stanja svijesti značajno se utječe kirurškim zahvatom na vidljivim moždanim strukturama (ili promjene nastaju kao posljedica patoloških

procesa) koje su zajedničke većini kralježnjaka. Fluktuacija svijesti se manifestira kao interakcija između korteksa i prednjeg mozga. S druge strane, promatrajući inteligenciju kao varijablu, uočena je povezanost s neokroteksom i ona predstavlja način funkcioniranja koji je gotovo u potpunosti ograničen samo na čovjeka (Croft, 1952; Russell i Burch, 1959). Niži kralježnjaci mogu u jednom trenutku imati jedno određeno raspoloženje te to ograničava opseg njihove pažnje na jedan čimbenik, dok razvijeniji organizmi poput sisavaca imaju veći opseg pažnje pa možemo iz trenutka u trenutak kontrolirati smjer i fokus naše pažnje. Niži kralježnjaci su, prema takvim razmatranjima, osjetljiviji na neugodna stanja jer oni mogu imati isključivo osjet nelagode kada se javi nelagoda, što je kod ljudi slučaj samo kod iznimno jake boli i nelagode. Za niže kralježnjake se ne zna točno na koji način osjećaju bol i nevolju te kako je doživljavaju. Pretpostavka je da jaka bol nadjačava sve ostale osjete koji dolaze do mozga životinje. To je svojstvo svih kralježnjaka te je vidljivo prema motoričkim i autonomnim učincima boli. Pretpostavlja se da postoje dvije vrste osjeta kožne boli, koje se razlikuju prema latenciji i trajanju - brza i spora ili oštra i goruća. One se mogu prenositi različitim živčanim vlaknima, ali se ne razlikuju u osjetu, osim u njegovu trajanju. Ljudi mogu svjesno smanjiti intruziju boli i ne doživljavati ju kao nelagodu izravnom kontrolom pozornosti ili perifernom distrakcijom. Slično je pokazano pokusima na mačkama i majmunima te se pretpostavlja da je taj mehanizam prisutan i kod ostalih sisavaca. Nakon prvog doživljaja boli i predočenja problema boli, ukoliko životinja ima mogućnost izražavanja boli, njezina jačina je smanjena. Pretpostavlja se da se osjet boli smanjuje s vremenom pa laboratorijske životinje nakon prvotnog alarma nemaju jak osjećaj boli. To se odnosi na morfološki i psihološki razvijenije životinje pa dovodi u upit jesu li zaista „jednostavnije“ životinje prikladnije za istraživanja. Na temelju toga se može zaključiti da sisavci, poput miševa, štakora ili kunića, nisu nužno loš model za istraživanja u kojima životinja trpi bol ili patnju, osobito ukoliko se istraživanja provode kroz dulji vremenski period (Russell i Burch, 1959).

Bol se može selektivno ukloniti farmakološkom ili kirurškom lokalnom ili sistemskom anestezijom. Kod životinja bol odmah ima za efekt nagli rast otkucaja srca, a te reakcije nema pod dubokom anestezijom. Međutim, osjećaj boli se vraća prije ostalih osjećaja kod buđenja, u trenutku kad se životinja još obično smatra nesvjesnom. Ustanovljeno je da je refleks boli u srcu (ubrzanje pulsa za 9 - 14 %) bolji pokazatelj prisutnosti svjesnog stanja nego bilo koja somatska motorička reakcija (Croft, 1952). Drugi je pokazatelj samovoljno ponašanje životinje i reakcije te endokrini odgovor. Osjet boli se kod životinja prenosi nocireceptorima, odnosno osjetilnim neuronima za prijenos signala boli. Teško ga je mjeriti i kategorizirati jer je osjet

subjektivan pa se pokušava pratiti promatranjem promjena na životinji. Kod laboratorijskih životinja bol se procjenjuje praćenjem refleksa, potiskivanja ponašanja koja se povezuju s osjećajem ugone, izraza lica i drugih automatskih ponašanja. Razvijaju se nove tehnike procjene boli životinja na modelima manjih životinja, poput zebrastih ribica i vinskih mušica, a koje bi mogle biti primjenjive i na sisavcima. Ponašanje (kretanje) životinje prati se računalno te se iz velike količine podataka dobivenih praćenjem nekoliko stotina životinja analiziraju i rekonstruiraju kretanje životinja. Takvi bi se modeli mogli primijeniti i na veće životinje poput miševa (Graham i Hampshire, 2016). Treći pokazatelj je sposobnost za efektivnu reprodukciju, koji može koristiti samo u dugoročnim istraživanjima. Kako bi mogle razviti zdravo potomstvo, potrebno je funkcioniranje endokrinog sustava te zdravstveno stanje i ponašanje životinja moraju biti u izvrsnom stanju. Ukoliko ženka osjeća patnju i stres, teže će se uspostaviti laktacija (Russell i Burch, 1959).

Do smrti laboratorijskih životinja dolazi kao rezultat tijeka eksperimenta koji ima letalni ishod ili eutanazijom. Smrt u toksikološkim istraživanjima može biti krajnja točka eksperimenta, kao što je određivanje LD₅₀ vrijednosti ili životinja može uginuti nakon ili tijekom eksperimenta kojem smrt nije krajnja točka. Eutanazija se nekada provodi nakon eksperimenata na životinjama koji nemaju letalni ishod, kako ne bi došlo do naknadne patnje i osjećaja boli kod životinje. Osim toga, kada se za eksperiment koristi samo neki organ ili tkivo iz životinje, one bivaju eutanizirane nakon izdvajanja tog tkiva ili organa. U ovim slučajevima se broj uginulih životinja može smanjiti korištenjem ranijih krajnjih točaka i korištenjem LD₅₀ testova koji koriste manji broj životinja (Stokes, 2011; Doke i Dhawale, 2015).

Do nepotrebne smrti životinja dolazi i eutanazijom životinja koje su dobivene uzgojem laboratorijskih životinja, a završile su kao višak. Kako se postiglo smanjenje takvog viška, a time i broja ukupno korištenih životinja, potrebno je usklađivanje broja uzgojenih životinja sa brojem koji je potreban za istraživanja (Doke i Dhawale, 2015). Kod korištenja genetski modificiranih životinja, uvijek je potrebno prvo provjeriti postoje li već jedinke s odgovarajućim svojstvima. Uzgoj genetski modificiranih životinja se treba prilagoditi kako bi se dobio traženi broj životinja uz minimalni broj korištenih ženki i najmanje invazivne postupke. To se postiže pažljivim tehnikama ubrizgavanja, korištenjem ženki optimalne mase i veličine, praćenjem stanja i selekcijom mužjaka (Robinson i Jennings, 2004). Dobivene linije genetski modificiranih miševa se koriste samo povremeno za znanstvena istraživanja, ali ih je potrebno održavati. Ukoliko se održavaju kontinuiranim uzgojem životinja, rađa se prevelik broj životinja koje se moraju eutanizirati jer nisu potrebne za laboratorijska istraživanja. Kako

bi se to izbjeglo, mogu se krioprezervirati spermiji i oocite ili zamrzavati rani zametci te odmrzavati po potrebi. Linije ostaju stabilne jer nema smanjenja fertiliteta zbog starenja, smanjuje se genetski otklon i linija ostaje očuvana u slučaju gubitka uzgojene kolonije. Također, transport smrznutih zametaka ili kriokonzerviranih stanica nasuprot živih životinja je pogodan za istraživanja jer tijekom transporta dolazi do stresa kod životinje (Lane i Jennings, 2004; CCAC, 2020).

2.1.4. Korištenje ljudi i ljudskog materijala za istraživanja

Vivisekcija se, osim na životinjama, tijekom povijesti provodila i na ljudima. U antičko doba i srednjem vijeku radilo se o robovima i zarobljenicima, ali je vrhunac neetičnih istraživanja na ljudima dosegnut tijekom nacističke ere. Veliki broj vivisekcija i eksperimenata na ljudima provodili su nacisti tijekom holokausta u sklopu Aktion T4, kao i japanski liječnici u Odjelu 731. Kako bi se neetična istraživanja na ljudima ovog tipa iskorijenila u potpunosti, uvedena su načela medicinske etike, kao što je, primjerice, Nirnberški kodeks. Prema Nirnberškom kodeksu istraživanje na ljudskim subjektima moguće je isključivo dobrovoljno te kad su ti subjekti pravilno informirani o postupku (Štojs, 2014; Ackerknecht i Haushofer, 2016).

U današnje se vrijeme u razvijenim zemljama ne provode istraživanja na ljudima koja nisu dobrovoljna. U kliničkim istraživanjima je potrebno ispitati nove lijekove i cjepiva na ljudima. U fazi I kliničkih pokusa koriste se male, subterapijske doze lijeka kako bi se ispitala farmakokinetika, bioraspoloživost i poluživot lijekova te njihova sigurnost na manjem broju (od 20 do 80) zdravih dobrovoljaca. U fazama II, III i IV se ispituju terapijske doze lijeka na većem broju (iznad 100) zdravih ili pacijenata s određenim bolestima, kako bi se ispitala učinkovitost, djelotvornost i sigurnost lijekova te obavio nadzor nakon stavljanja u promet (EFPIA, 2020).

Od ljudskog biološkog materijala, u znanstvenim istraživanjima i ispitivanjima toksičnosti koriste se stanice i tkiva ljudskog podrijetla te ljudske matične stanice (Eskes i sur., 2017).

2.1.5. Dobivanje biološkog materijala ljudskog podrijetla i matičnih stanica

In vitro istraživanja su istraživanja u kojima se ne koriste cijele životinje, već izolirane stanice ili tkiva te predstavljaju etički prihvatljiviju alternativu *in vivo* istraživanjima. Principi *in vitro* istraživanja razrađeni su u poglavlju 2.2.3., a korištenje i rukovanje s kulturama stanica i tkiva u poglavlju 2.2.3.1. i 2.2.3.3. Stanice i tkiva za potrebe *in vitro* istraživanja moraju se svježe izolirati iz životinje ili čovjeka ukoliko se radi o primarnoj kulturi ili propagirati iz komercijalno dostupnih staničnih linija. Kod toga je potrebno paziti na fenotipske i genotipske karakteristike

stanica. Ukoliko se koriste kontinuirane stanične linije, preporuča se dobivanje stanica iz provjerenih izvora, kao što su DSMZ (njem. *Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) ili ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) banke stanica (Hartung i sur., 2002). Prije uspostavljanja staničnih linija iz bilo kojih stanica ljudskog podrijetla, potrebno je dobiti etičko odobrenje. Kod uspostavljanja novih staničnih kultura, potrebno je tražiti etičko odobrenje ukoliko se za kulturu koriste stanice ljudskog podrijetla. Sva odobrenja i dozvole etičkih povjerenstava o upotrebi ljudskih tkiva i stanica potrebno je trajno čuvati. Zbog osiguranja sljedivosti i kontrole potrebno je voditi svu evidenciju glede nabave, opskrbe i korištenja biološkog materijala ljudskog podrijetla. Humane stanice dobivaju se iz banki tkiva ili bolnica te je dobivanje stanica neprofitno (Bal-Price i Coecke, 2011).

Embrionalne matične stanice su etički problematične jer ih je potrebno dobiti iz unutarnje stanične mase blastociste, prije implantacije embrija. Blastociste za dobivanje embrionalnih matičnih stanica se dobivaju od neimplantiranih embrija namijenjenih umjetnoj oplodnji, kao i embrija za ostala medicinska i genetička istraživanja. Matične stanice mogu se dobiti iz tkiva odraslih ljudi, kao i iz krvi pupčane vrpce, što se smatra etički prihvatljivijim jer ne uključuje uništavanje embrija. U oba slučaja etička opravdanost dobivanja tih stanica ne razlikuje se od one za dobivanje bilo kojeg drugog tkiva ljudskog podrijetla (Bal-Price i Coecke, 2011).

2.1.5.1. Korištenje životinjskih i ljudskih embrija

Za sve lijekove i kemikalije, ali i tvari kojima smo izloženi iz okoliša je potrebno procijeniti kemijski induciranu razvojnu i reproduktivnu toksičnost. Metode kojima se procjenjuje takva toksičnost često zahtijevaju veliki broj laboratorijskih životinja kao što su štakori i zečevi, dugo traju i skupe su. *In vitro* metode probira pomoću stanica mogu zamijeniti trenutne modele. Za ispitivanje embriotoksičnosti, odnosno štetnog učinka tvari na embrij, mogu se koristiti embrionalne matične stanice (npr. miša). Neki *in vitro* testovi priznati od strane nadležnih regulatornih tijela su EST (engl. *Embryonic Stem cell Test*), WEC (engl. *Whole-Embryo Culture*) i MM (engl. *MicroMass*) test (Lilienblum i sur., 2008).

EST je *in vitro* test koji koristi embrionalne matične stanice miša te se koristi za ispitivanje embriotoksičnosti. EST test se zasniva na činjenici da spoj koji ima potencijalni embriotoksičan učinak blokira spontani razvoj embrionalne matične stanice u srčani mišić s otkucajima tijekom prvih 10 dana embrionalnog razvoja. Koristi se kao test probira u razvoju novih farmaceutika, za identifikaciju hazarda te kao alat kod donošenja internih odluka u proizvodnji farmaceutika i biocida (Marx-Stoelting i sur., 2009). WEC test koristi cijeli embrij štakora, tako da

predstavlja složeniji sustav u odnosu na EST test. Na uzgojenim embrijima se 48 sati nakon implantacije proučava pojava malformacija ili kašnjenje u razvoju određenih organskih sustava. MM test se zasniva na događajima tijekom diferencijacije stanica udova u hondrocite koje proizvode hrskavicu (Lilienblum i sur., 2008; Seiler i Spielmann, 2011). Mana ovih testova je što ovise o detekciji krajnjih točaka, čije poznavanje zahtjeva opsežno iskustvo u eksperimentima pa mogu dovesti do pogrešnih prosudbi. Teži se smanjenju broja korištenih embrija. Iako je potrebno od nekuda dobiti embrionalne matične stanice i upotreba životinja nije u potpunosti isključena, broj korištenih embrija je znatno smanjen (Seiler i Spielmann, 2011; Doke i Dhawale, 2015).

Kako bi se mogle razviti stanične linije embrionalnih matičnih stanica, često se uništava embrij. Moguće je uspostaviti kulturu embrionalnih matičnih stanica bez uništavanja embrija tako da se uspostavi iz pojedinačne blastomere koja se biopsijom izdvaja iz embrija. Ovom je tehnikom moguće izdvajanje samo jedne blastomere (ili nekada dvije) iz embrija u stadiju od 8 stanica. Nakon izdvajanja iz embrija uzgajaju se zajedno s parentalnim embrijem u istoj epruveti 12 do 24 sata, nakon čega se embrij izdvaja i nastavlja rast u mediju 48 sati. Većina embrija nastavlja rast do faze blastociste. Ljudske matične se uzgajaju na sloju embrionalnih fibroblasta miša (MEF, engl. *Mouse Embryonic Fibroblasts*) i zahtijevaju prisutnost fibroblastnog faktora rasta (bFGF ili FGF-2, engl. *Fibroblast Growth Factor*). Medij se suplementira lamininom i fibronektinom (Chung i sur., 2006; Chung i sur., 2008). Kada se embrionalne matične stanice kultiviraju bez antidiferencijacijskih faktora, one spontano diferenciraju i formiraju trodimenzionalne višestanične agregate koji se nazivaju embrioidna tjelešca (EB, engl. *Embryoid Bodies*). Kao zamjena za embrionalne matične stanice, mogu se koristiti pluripotentne stanice. Korištenje pluripotentnih stanica je etički opravdanije od korištenja embrionalnih matičnih stanica zato što se mogu dobiti iz tkiva odrasle osobe, odnosno dobrovoljnog donora. Pluripotentne stanice mogu diferencirati u različite tipove stanica te se mogu koristiti, između ostalog, i u toksikološkim istraživanjima (Thélu i sur., 2020).

2.1.6. 3R načelo u zaštiti dobrobiti pokusnih životinja

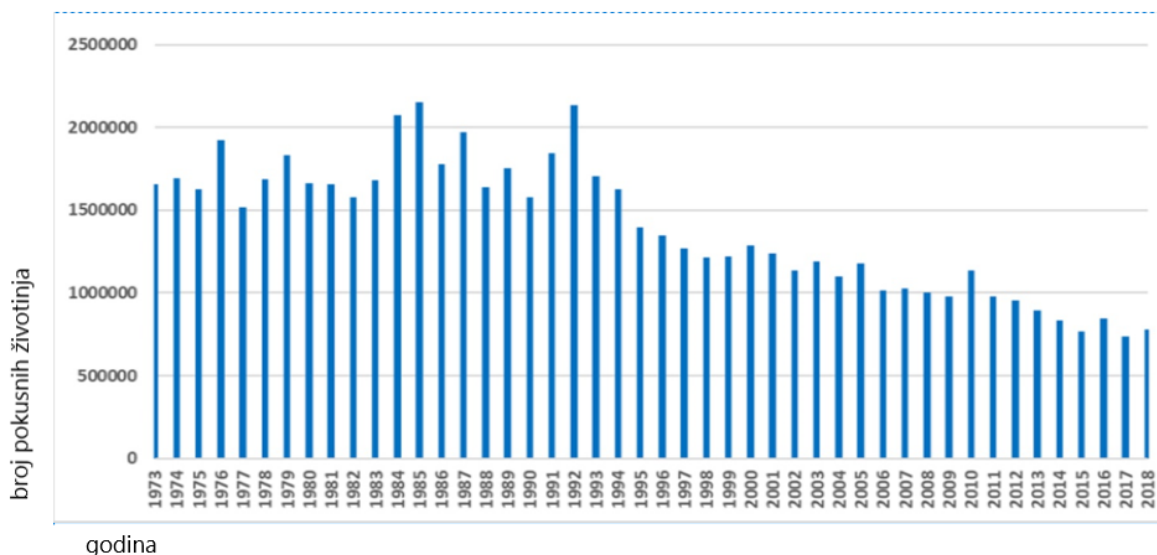
Razmatranjem načina kojima bi se nehumanost mogla izbjeći te postići etički prihvatljiviji odnos prema pokusnim životinjama, došlo je do razvoja modela koji bi trebali biti vodilje pri pokušaju smanjenja patnje i brojnosti pokusnih životinja. Jedan od prvih općeprihvaćenih takvih principa, koji se do danas široko primjenjuje, je 3R princip. Razvijen je iz Koncepta zamjene kojeg su predložili Charles Hume i William Russell 1957. godine, a predlaže zamjenu korištenja životinja metodama istraživanja koje ne koriste životinje. Koncept zamjene proširili

su William Russell i Rex Burch, kako bi istraživanja bila još humanija, u princip kasnije nazvan 3R (Doke i Dhawale, 2015).

3R je akronim za tri pristupa koja bi se trebala provoditi po ovom načelu pri istraživanjima na pokusnim životinjama, a to su: smanjenje (engl. *Reduction*), zamjena (engl. *Replacement*) i poboljšanje (engl. *Refinement*) (Dellambra i sur., 2019). Smanjenje se odnosi na smanjenje broja životinja koje se koriste u istraživanjima, zamjena označava zamjenu svjesnih živih viših životinja materijalom koji nema osjetila ili ima manju mogućnost osjeta boli, a poboljšanje je svako smanjenje učestalosti ili ozbiljnosti nehumanih postupaka primjenjivih na one životinje koje se i dalje moraju koristiti (Russell i Burch, 1959; Doke i Dhawale, 2015).

2.1.7. Korištenje životinja u svrhe istraživanja u svijetu i Europskoj uniji

Broj korištenih životinja u svrhu laboratorijskih eksperimenata naglo je porastao s razvojem biomedicinskih znanosti i tehnologije. Ukupan broj korištenih životinja je visok, ali se smanjuje unazad zadnjih nekoliko desetljeća. Na grafičkom prikazu broja životinja korištenih u istraživanjima u SAD-u (slika 1) vidljiva je tendencija smanjenja broja pokusnih životinja, unatoč činjenici da u SAD-u vlada opušteniji pristup glede reguliranja broja životinja koje se koriste u laboratorijskim istraživanjima (NAVS, 2020).

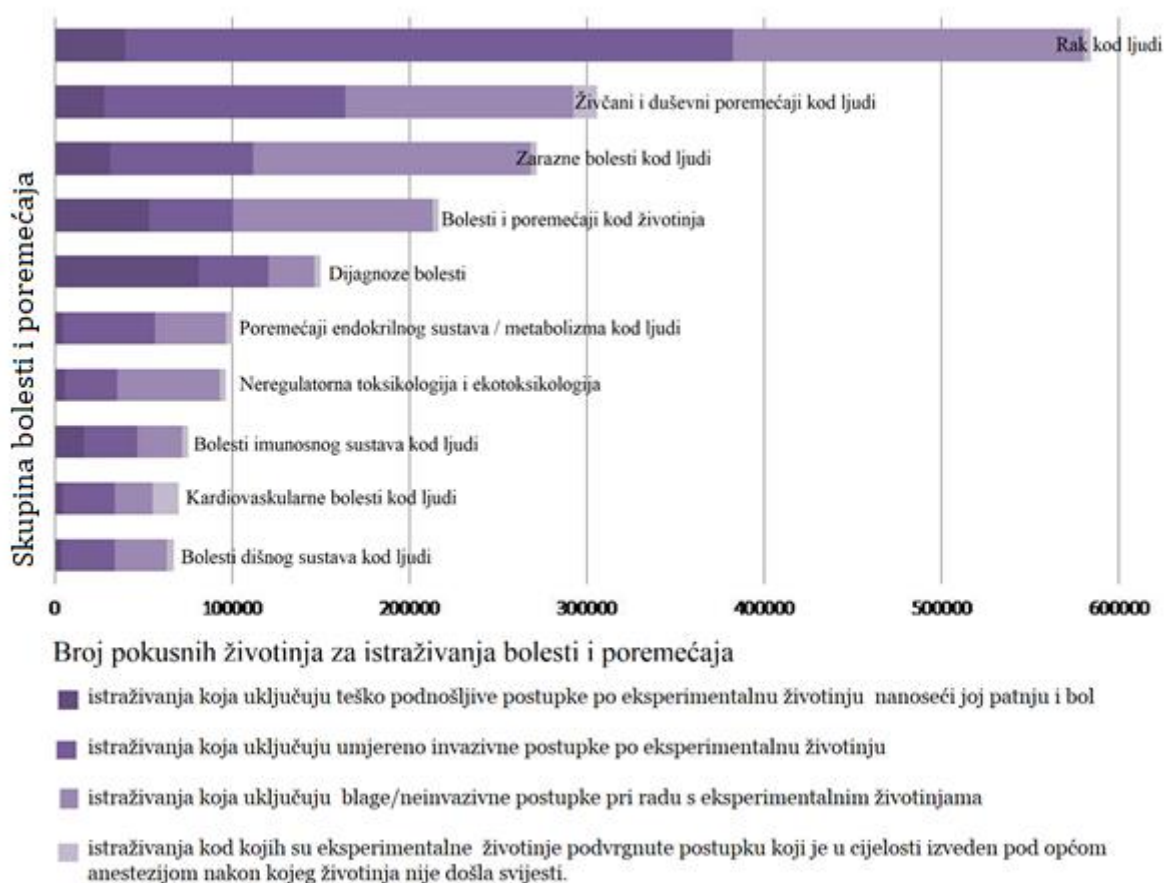


Slika 1. Ukupan broj životinja koje su se koristile u istraživačke svrhe unazad 45 godina u SAD-u (prema NAVS, 2020)

Razlog smanjenja zabilježenog broja korištenih životinja u SAD-u i zemljama Europske unije su, osim inkorporiranja 3R principa, promjene u bilježenju, odnosno vrsti životinja koje dolaze u obzir kod obrade statističkih podataka. Kada se izražava ukupan broj korištenih životinja, od 2010. godine time nisu obuhvaćeni fetusi sisavaca, životinje žrtvovane za tkiva ili organe niti

životinje koje se eutaniziraju jer su višak (Busquet, 2020). Od 2005. do 2017. godine broj godišnje korištenih pokusnih životinja u zemljama EU je pao za 2,27 milijuna (Festing i Wilkinson, 2007; Busquet, 2020). Industrije koje se koriste životinjama za svoja istraživanja su farmaceutska, kozmetička, prehrambena, kemijska industrija i industrija zaštite bilja. Od toga najveći broj životinja na kojima su provođeni eksperimenti, njih čak 50 % (prema podacima za 2005. godinu), odlazi na proizvodnju farmaceutika, razvoj cjepiva 15 %, a toksikološka ispitivanja 4 % (Bottini i Hartung, 2009).

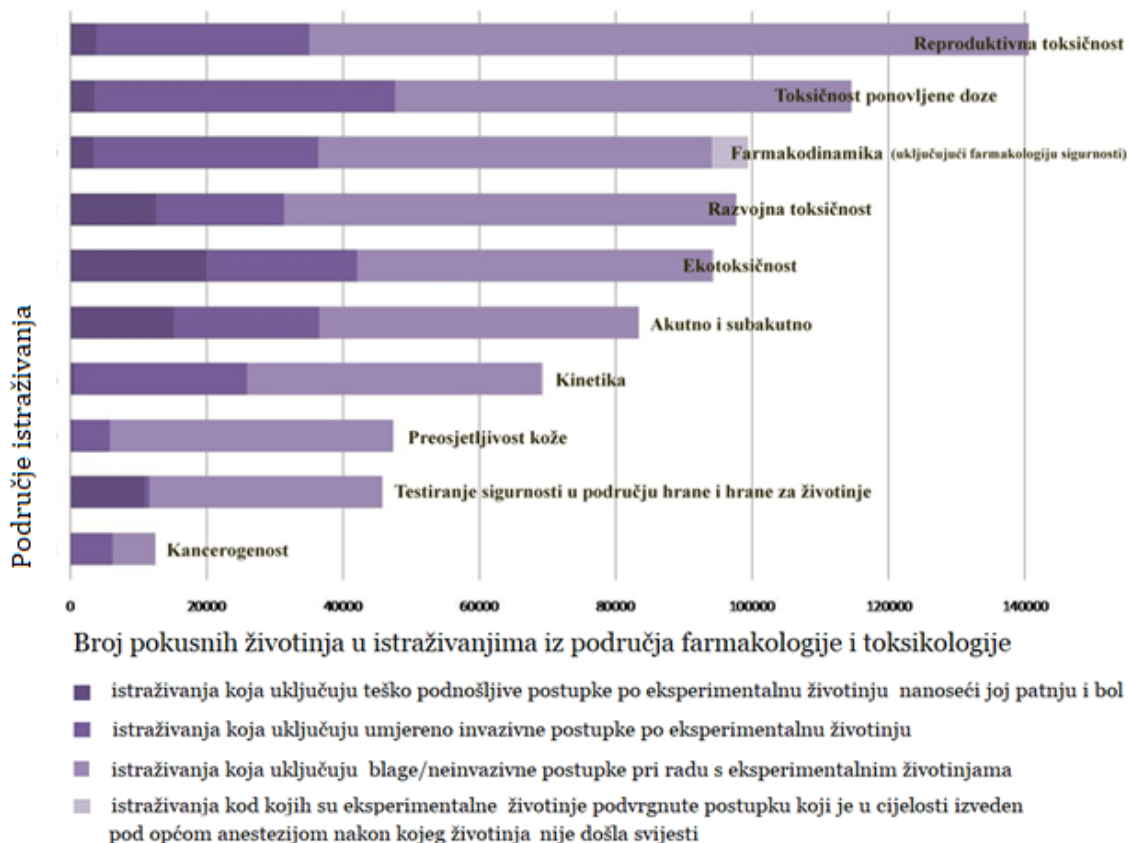
Pokusne životinje koriste se u temeljnim znanstvenim istraživanjima, kao i razvojnim i primijenjenim. Broj korištenih životinja za neka od istraživanja tijekom 2017. godine prikazan je na slici 2.



Slika 2. Broj pokusnih životinja korištenih u deset najzastupljenijih područja istraživanja vezanih uz različite bolesti i poremećaje u 2017. godini (prema EC, 2020)

Temeljna istraživanja koja uključuju istraživanje živčanog i imunskog sustava, istraživanja u području onkologije, ponašanja i biologije životinja su ona na koja opada više od polovice korištenih životinja. Translacijska i primijenjena istraživanja uključuju istraživanje raka kod

ljudi, neuroloških, psihičkih i zaraznih bolesti, kao i poremećaja u životinja. Za ovaj tip istraživanja se 2017. godine koristilo više od 2,2 milijuna pokusnih životinja (EC, 2020). Za farmakološka ispitivanja i ispitivanja toksičnosti koristilo se oko 8 % od ukupno korištenih životinja, a brojčana raspodjela za neka od istraživanja prikazana je na slici 3 (EC, 2020).



Slika 3. Broj korištenih životinja u 2017. godini za najčešća ispitivanja iz područja farmakologije i toksikologije (prema EC, 2020)

Godine 2017. u zemljama Europske unije je uzgojeno 12,6 milijuna životinja, od čega je za testiranje na životinjama korišteno 9,39 milijuna životinja (EC, 2020), od čega su 2,53 milijuna sisavci (Busquet, 2020). Od toga je 8,8 % životinja korišteno u testovima toksičnosti i drugim testovima za ispitivanje sigurnosti, a 11,8 % za kontrolu kvalitete. Za testiranje toksičnosti najviše je životinja korišteno za test kožne preosjetljivosti te iznosi više od pola testiranja. Drugi testovi za koje je korišten velik broj životinja su testovi karcinogenosti, genotoksičnosti i iritacije kože. Broj životinja korištenih za testiranje očne i kožne iritacije je u naglom padu u periodu od 2005. do 2017. godine. Najčešće korištene životinje od 2008. do 2017. godine u EU za razvojnu toksičnost su štakori, a uporaba miševa i zečeva je znatno manja (EC, 2020). Broj korištenih sisavaca kao laboratorijskih životinja u SAD-u u 2017. godini je 780 tisuća. Ukupan broj svih korištenih životinja za 2017. godinu nije poznat, a procjenjuje se da je između 12 i 23

milijuna (omjer broja sisavaca i ukupnih životinja iznosi 1:15 - 30) (USDA, 2020). U Hrvatskoj je u 2018. godini za istraživanja korišteno 25,816 životinja (UVSH, 2019).

Životinje za istraživanja dolaze iz dva tipa izvora. Prvi tip su izvori A-klase, koji uključuju rasplode životinja specifično za eksperimentalne svrhe, a drugi su tip izvori B-klase, koje čine raznovrsni ostali izvori poput azila, ali i životinje iz divljine (Doke i Dhawale, 2015).

2.1.8. Smanjenje broja životinja koje se koriste za eksperimente

Korištenje životinja treba se pažljivo planirati kako bi se koristio što manji broj životinja te kako bi njihova patnja bila što manja. Dobro razrađen dizajn eksperimenta pomaže u znatnom smanjenju broja životinja koje se koriste u istraživanjima te omogućuje prikupljanje potrebnih podataka koristeći minimalni mogući broj životinja. Dobra znanstvena praksa podrazumijeva da se mora koristiti dovoljno veliki broj životinja kako bi mogli generirati rezultat sa statističkim značajem. Stoga je potrebno naći zlatnu sredinu, kako bi dizajn eksperimenta bio u skladu i s jednim i s drugim principom (Festing i Wilkinson, 2007).

Godine 1998. FRAME (engl. *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*) je formirao Odbor za smanjenje uporabe pokusnih životinja (engl. *Reduction Committee*) kako bi javno objavili učinkovite tehnike redukcije broja životinja (Festing i Wilkinson, 2007; Doke i Dhawale, 2015). Dva nova pristupa smanjenju broja životinja su sekvencijalno testiranje i integrirano testiranje sa strategijama odlučivanja (ITDS, engl. *Integrated Testing and Decision Strategies*) (Stokes, 2015).

Sekvencijalno testiranje se uspješno provodi u kombinaciji s inovativnim statističkim metodama. Uključeno je u smjernice OECD-a (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) za testove iritacije oka i kože, kod kojih se test smatra završenim u trenutku kad se kod jedne ili dvije od životinja pojave teže lezije ili dvije životinje pokažu jednak negativan rezultat. Budući da se ne tretiraju sve životinje odjednom, ukupno vrijeme testa je produljeno (Stokes, 2015).

Druga strategija, integrirano testiranje sa strategijama odlučivanja, može smanjiti uporabu životinja korištenjem i razmatranjem veće količine podataka i dostupnih informacija prije uporabe životinja. Na primjer, kod testa akutne oralne toksičnosti mogu se u obzir uzeti sve dostupne informacije o provedenim testovima na životinjama, ali i slučajevima koji su se javili kod ljudi zbog slučajne izloženosti. Ako niti tada nema dovoljno informacija za procjenjivanje rizika, provode se testovi koji su potrebni za nadopunu tih podataka, nakon provedenih *in vitro* testova kojima se odredi odgovarajuća početna doza. Ovaj je pristup smanjio broj potrebnih

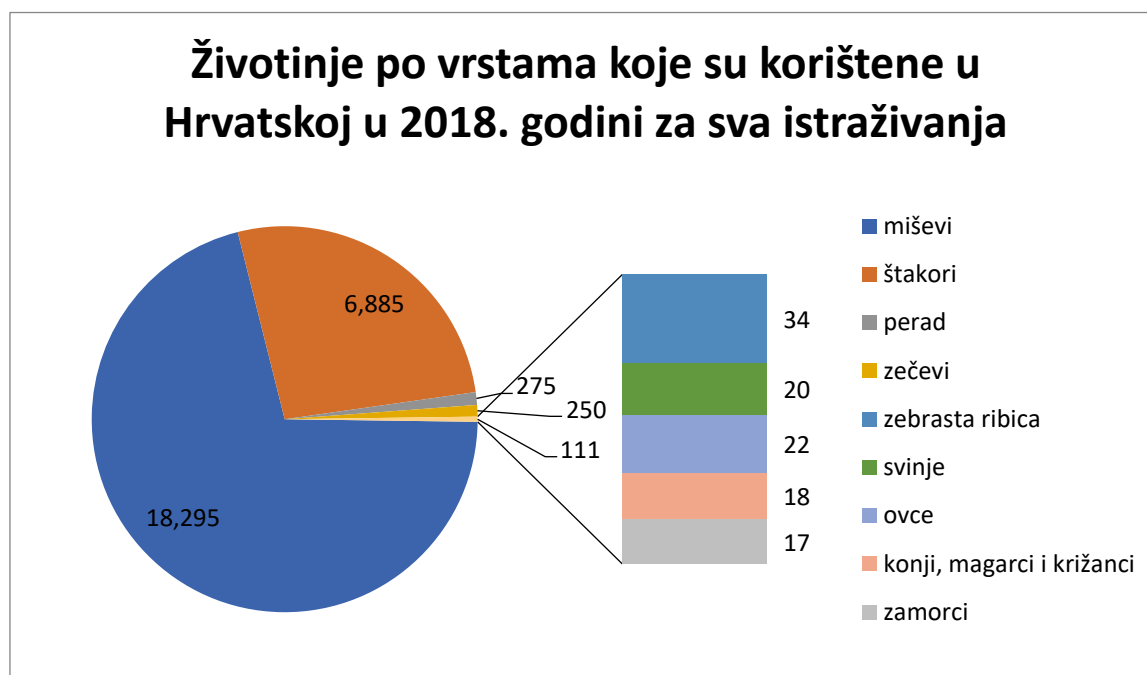
životinja za jedno ispitivanje, a slični pristupi se koriste i kod testova kožne preosjetljivosti (Stokes, 2015).

2.1.9. Relativna i apsolutna zamjena životinjskih modela u istraživanjima

Osim u svrhu smanjenja broja životinja eliminiranjem testiranja na životinjama u početnim fazama razvoja, alternativne metode služe i za zamjenu životinjskih *in vivo* modela općenito. To su već navedene *in vitro* metode testiranja na staničnim kulturama, *in silico* modeli koji se provode na računalnim sustavima (potpoglavlje 2.2.4.), druge nove tehnike analize, ali i zamjena naprednijih životinja nižim životinjama. Zamjena životinjskih modela bi trebala u konačnici imati najveći utjecaj na dobrobit životinja zbog potpunog izbjegavanja uporabe životinja za dio testiranja (Doke i Dhawale, 2015; Stokes, 2015).

Kod zamjene postoje dva smjera - relativna i apsolutna zamjena. Kod relativne zamjene se životinje koriste u istraživanju, ali nisu izložene patnji, a kod apsolutne se uopće ne koriste životinje (Doke i Dhawale, 2015).

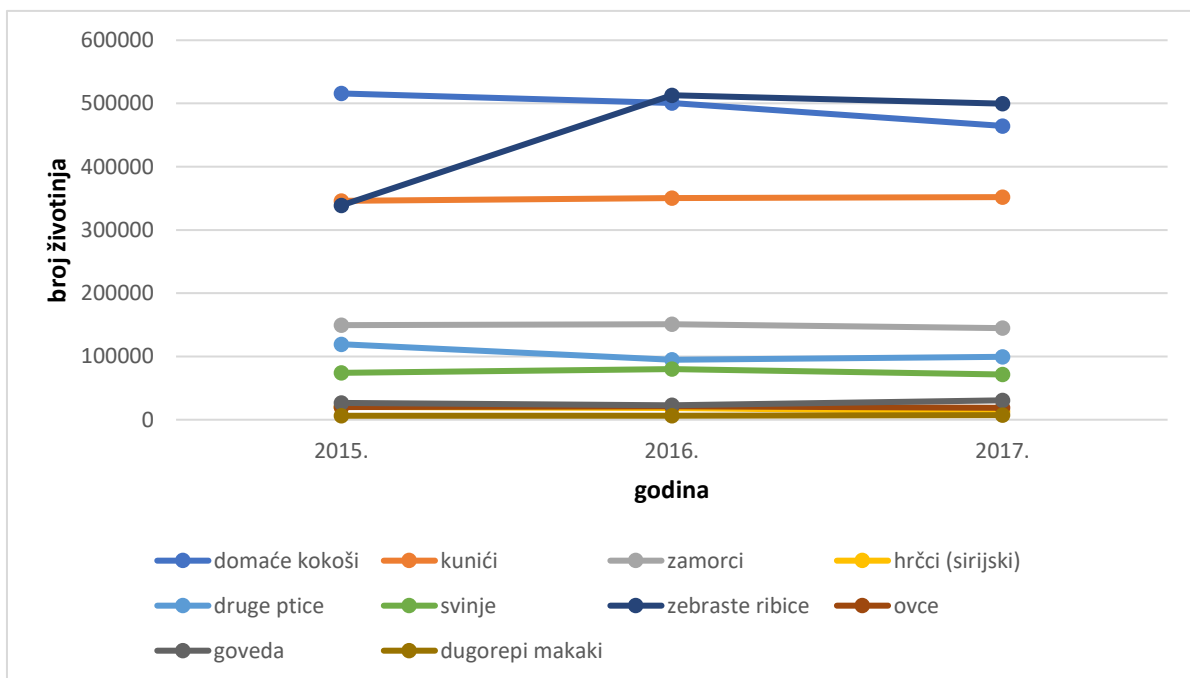
Sisavci i ostali viši kralješnjaci najčešće su korištene životinje u laboratorijskim istraživanjima. Udio pojedinih životinjskih vrsta u ukupnom broju istraživanja na životinjama u Hrvatskoj prikazan je na slici 4, a iz njega je vidljivo da su miševi i štakori najzastupljeniji i prevladavaju ostale vrste (UVSH, 2019).



Slika 4. Vrste životinja koje su korištene u Hrvatskoj u 2018. godini za sva istraživanja (prema UVSH, 2019)

Glavna strategija apsolutne zamjene je odabir manje razvijenih životinja, poput beskralježnjaka i nižih kralježnjaka, gljiva, protista i porokariota umjesto kralježnjaka koji imaju razvijeniji živčani sustav. Osim toga, moguće je i korištenje *in vitro* i *in silico* metoda koje u nekoj mjeri mogu zamijeniti dio ispitivanja. Na slici 5 prikazana je usporedba broja korištenih nekih vrsti sisavaca, ptica i riba u istraživanjima. Broj nižih kralježnjaka u ispitivanjima toksičnosti se povećava u posljednjih nekoliko godina, dok je korištenje ptica u blagom padu (EC, 2020).

Prokarioti koji se koriste su bakterije, najčešće *Escherichia coli* (model za molekularne i genetske studije), *Bacillus subtilis* (model stanične diferencijacije) i *Caulobacter crescentus*. Eukariotski modelni organizmi se često preferiraju nasuprot prokariotskim zbog veće podudarnosti u staničnim funkcijama s višim eukariotima. Filamentozni fungus *Neurospora crassa* može biti model za genetička ispitivanja, studije cirkadijalnog ritma i regulaciju metabolizma (Díaz i Larrondo, 2020). *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* su također modeli u genetičkim studijama. Protist *Dictyostelium discoideum* se koristi u molekularnim i genetičkim istraživanjima (Doke i Dhawale, 2015).



Slika 5. Broj životinja koje su se 2015., 2016. i 2017. godine koristile u istraživanjima po prvi put, prema vrstama u državama članicama Europske unije (izostavljene su životinje koje su se koristile u najvećem broju, štakori i miševi) (prema EC, 2020)

Beskralježnjaci se koriste za proučavanje mnogih bolesti te su pogodni jer imaju kratak životni vijek i korištenje ovih životinja često ne predstavlja etički problem. Mnogi beskralježnjaci se koriste za znanstvena istraživanja. Spužva *Amphimedon queenslandica* se koristi u proučavanju evolucije, razvojne biologije i komparativne genomike, a vrste iz roda *Aplysia* (morski zekani)

u neurobiologiji. Nematod *Caenorhabditis elegans* je često korišten modelni organizam i može se koristiti u raznim biomedicinskim istraživanjima za proučavanje apoptoze i razvojne genetike. Koristi se i za proučavanje različitih neuroloških poremećaja poput Huntingtonove, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, poremećaja imunskog sustava, raka i dijabetesa. Člankonožac *Drosophila melanogaster* (vinska mušica) može poslužiti za genetsko modeliranje, razvojnu biologiju, proučavanje transformacija, mutacija i za probir toksičnosti, a osim za genetička, koristi i za neurološka istraživanja. Vrste iz koljena *Cnidaria* (žarnjaci) se koriste za razumijevanje procesa regeneracije i morfogeneze. Žarnjaci iz roda *Hydrozoa* pogodni su za istraživanja u toksikologiji jer su vrlo osjetljivi na ksenobiotike i metalne kontaminante, imaju živčani sustav i višeslojno tkivo za apsorpciju toksikanata, a mogu se uzgajati u velikim populacijama, jednostavno i jeftino (Patwardhan i Ghaskadbi, 2013). Međutim, njihovo je korištenje u testiranju toksičnosti ipak ograničeno. Nemaju npr. adaptivnu imunost, zbog čega se ne mogu koristiti za objašnjavanje bolesti kod ljudi (Festing i Wilkinson 2007; Krewski i sur., 2010; Doke i Dhawale, 2015).

Niži kralježnjaci su pogodniji za istraživanje od beskralježnjaka jer je genetička sličnost s višim kralježnjacima (uključujući sisavce) znatno veća. Etički problem korištenja nižih kralježnjaka je manji u odnosu na više kralježnjake te se općenito testovi na ovim životinjama smatraju humanijim i prihvatljivijim (Doke i Dhawale, 2015). Primjer izvrsnog modela za različita istraživanja je niži kralježnjak *Danio rerio* (zebrasta ribica). Pogodna je za testiranje jer ima prozirno tijelo pa je moguć i olakšan vizualni pristup svim promjenama tijekom razvoja. Male su, plodne i imaju kratak životni ciklus, zbog čega se smanjuje vrijeme i cijena istraživanja. Koriste se u svim fazama razvoja za ispitivanje toksičnosti kemikalija i farmaceutskih proizvoda te za istraživanje raka, bolesti srca, neuroloških smetnji, bihevioralnih bolesti i mutacija uslijed izlaganja štetnim tvarima (Russell i Burch, 1959; Doke i Dhawale, 2015).

Koncept zamjene se uspješno provodi u mnogim istraživanjima i testiranjima lijekova i kemikalija. To se najviše odnosi na početne faze ispitivanja kemikalija, odnosno pred-klinička ispitivanja lijekova, ali su prisutni u svim fazama. Općenito, upotrebom kultura stanica i tkiva se znatno smanjuje broj korištenih životinja u početnim fazama istraživanja. Stanice i tkiva koja se koriste u te svrhe su najčešće podrijetlom iz jetre, bubrega, mozga i kože, a dobivaju se izolacijom iz životinje, nakon čega se uzgajaju *in vitro*. Ukoliko se kultiviranje provodi u prikladnim uvjetima, mogu se održavati mjesecima pa i do nekoliko godina. To u konačnici predstavlja poštedu velikog broja životinja, iako je žrtvovana životinja za dobivanje tkiva na početku procesa (Festing i Wilkinson 2007; Doke i Dhawale, 2015). Za provjeru iritacije oka

koristio se *Draize* test toksičnosti koji zahtjeva novu životinju za svako testiranje, a najčešće su korišteni zečevi. Alternativa tom testu je *in vitro* metoda u kojoj se koristi kultura organa rožnice goveda. Kultura se uzgaja do tri tjedna u laboratoriju te se može koristiti u nizu različitih metoda za procjenu toksičnosti *in vitro*. U mnogim su zemljama *in vitro* stanične kulture zamijenile test iritacije kože i *Draize* test (Xu, 2000). Također, ekstrakcija inzulina iz gušterače svinja i krava zamijenjena je dobivanjem inzulina iz bakterijske kulture. To je eliminiralo korištenje životinja u svrhu dobivanja lijeka koji je od životne važnosti za pacijente s dijabetesom tipa I (Doke i Dhawale, 2015). Zamjena *in vivo* testova alternativnim testovima uspješno se provodi i za testiranje kožne preosjetljivosti, a primjeri su detaljnije objašnjeni u poglavlju 2.3.

Apsolutna bi zamjena uključivala potpunu zabranu svih testiranja na životinjama te zamjenu svih testova testovima koji ne koriste niti jednu životinju. To uključuje testiranje na životinjama i korištenje životinja za dobivanje materijala (tkiva i organi, embrionalne matične stanice). Kada bi se testiranje na životinjama ukinulo u potpunosti, to bi imalo značajne i teške posljedice za znanstvena istraživanja te sigurnost lijekova, hrane i okoliša, kao i mnogih drugih aspekata ljudskog života (Doke i Dhawale, 2015).

2.1.10. Poboljšanje životnih uvjeta i briga o pokusnim životinjama

Briga o životinjama je bitan čimbenik kod istraživanja na životinjama te je pravilnom skrbi i njegom, korištenjem potrebnih lijekova i stvaranjem ugodnog okruženja za životinje moguće znatno pridonijeti njihovom blagostanju, ali i postići vjerodostojnije rezultate istraživanja. Problem je velika razlika između uvjeta u kojima je životinja tijekom eksperimenata i onih u kojima se životinja nalazi u divljini. Tijekom eksperimenta životinje su najčešće odvojene od ostalih pripadnika svoje vrste (Russell i Burch, 1959; Doke i Dhawale, 2015).

Strategije za smanjenje ili potpuno izbjegavanje boli i patnje kod životinja su: ranije krajnje točke, korištenje lijekova za suzbijanje boli te pružanje odgovarajuće veterinarske i potporne njege (Stokes, 2015).

Pomno odabrane znanstvene i humane krajnje točke eksperimenta, odnosno završetka istraživanja mogu doprinijeti smanjenju boli i patnje životinje. Eksperiment se prekida ranije, prije no što dođe do patnje i boli pokusne životinje, a dok se još uvijek mogu dobiti traženi eksperimentalni podaci. Idealna krajnja točka je ona kod koje još nije došlo do pojave boli i patnje kod životinje, a postiže se cilj znanstvenog istraživanja. Biomarkeri za krajnje točke u ovom slučaju mogu biti klinički znakovi, ali i fiziološka i biokemijska mjerenja te drugi

parametri. Ovaj je pristup koristan kada nije moguća upotreba lijekova za suzbijanje boli zbog utjecaja tih lijekova na ciljeve ispitivanja. Primjer testa na pokusnim životinjama kod kojeg se provodi ova strategija je lokalna analiza limfnih čvorova miševa za ispitivanje kožne preosjetljivosti. U tom se testu uvodi ranija krajnja točka te je izbjegnuta bol i stres životinje jer se cilj testa dobiva tijekom indukcijske faze alergijskog kontaktnog dermatitisa, a ne elicitacijske faze. To je znatan napredak u postupanju sa životinjama, budući da je kod tradicionalnog testa za alergijski kontaktni dermatitis - maksimizacijskog testa sa zamorcima - prisutna reakcija koja se očituje crvenilom, oteklinom i svrbežom, a tijekom testa može doći do jake boli i patnje, teških iritacija kože, upala i nekroze (Stokes, 2015). Razlike u ovim testovima za ispitivanje kožne preosjetljivosti detaljnije su objašnjene je u poglavlju 2.3.4.1.

Postupci se na životinjama moraju provoditi pod lokalnom ili općom anestezijom ukoliko je ona kompatibilna s ispitivanjem i nije značajnije traumatična za životinju od samog ispitivanja. Analgetici se primjenjuju preventivno ili postoperativno kada popusti djelovanje anestezije. Korištenje analgetika uključuje nesteroidne antireumatike, opioide i lokalne anestetike, a preporuča se i multimodalna analgezija, odnosno istovremeno korištenje više analgetika s različitim mehanizmima djelovanja. Lijekovi za suzbijanje boli se, prema smjernicama OECD-a, trebaju koristiti u studijama na životinjama kod kojih su moguće povrede oka, kod biopsije i operativnih zahvata te se mogu koristiti kao način eutanazije (EC, 2010; Stokes, 2015; CCAC, 2020).

Pružanje odgovarajuće veterinarske njege podrazumijeva često promatranje životinja kako bi mogli pravodobno prepoznati kliničke znakove koji upućuju na bol i nelagodu, kao i pružanje njege potrebne za smanjenje boli, ozljeda i drugih štetnih posljedica ispitivanja. Životinje treba držati primjereno hidrirane, moraju imati pristup vodi i hrani te čist i suh okoliš. Veterinarska njega je ključna za osiguravanje dobrobiti životinja i cilj joj je uvijek umanjiti patnju i nelagodu kod ispitivanih životinja (Stokes, 2015). Tijekom istraživanja, u većini zemalja su veterinari uključeni u skrb o životinjama tijekom eksperimenta, ali u manjem broju su uvijek prisutni i uključeni u rutinski pregled životinja. Osim veterinaru, mogu biti uključeni i dugi stručnjaci za životinje i njihovu dobrobit. Upotreba anestetika i analgetika tijekom eksperimenta i pažljivo rukovanje sa životinjama može pomoći u smanjenju boli doživljene od strane životinja. Kultura brige za životinje postiže se propisima, ali i osiguravanjem adekvatne edukacije tehničara i ostalih radnika koji dolaze u dodir sa životinjama (Festing i Wilkinson, 2007; Cheluvappa i sur., 2017).

Jedan od pristupa koji bi mogao smanjiti broj testiranja na životinjama i poboljšati ophođenje prema životinjama je pravilna edukacija o etici u toksikološkim istraživanjima usmjerena prema osoblju koje s njima dolazi u kontakt. Podučavanje bi uključivalo učenje o evoluciji misli na temu etike u istraživanjima na životinjama, 3R načelima i strategijama njihove primjene, o etičkoj odgovornosti znanstvenika, alternativama životinjskim modelima te bi također obuhvatio savjetovanje pri pisanju prijedloga etičkim odborima. Edukacija bi dodatno trebala obuhvatiti i učenje o odgovarajućim postupcima znanstvenika kod testiranja i brige za životinje koji imaju utjecaj na smanjenje njihove patnje i boli (FELASA, 2005).

Kad je životinja pod stresom i osjeća nelagodu, dolazi do neravnoteže hormona, što može utjecati na rezultate istraživanja. Tada bi eksperimenti trebali biti ponovljeni kako bi se dobili relevantni rezultati, čime bi se dodatno povećao broj korištenih životinja. Osiguravanje odgovarajućih uvjeta i brige za životinje tijekom testiranja može znatno poboljšati kvalitetu samog istraživanja. Neke bolesti sporije napreduju kada se životinje nalaze u ugodnijem okruženju (u kavezu se mogu gnijezditi, skrivati, grickati hranu koju jedu u prirodnom okruženju), što je pokazano na miševima s Huntingtonovom bolešću (Doke i Dhawale, 2015).

Aktivističke društvene skupine koje se protive uporabi pokusnih životinja često ne prihvaćaju mane i ograničenja alternativnih modela te se energično zalažu za njihovo usvajanje ne misleći pritom na moguće posljedice za zdravlje ljudi. Pokreti za zaštitu životinja i protiv vivisekcije također se često protive i 3R principu, budući da je prema načelima tog principa testiranje na životinjama i dalje dozvoljeno za neka istraživanja. Prihvaćaju isključivo principe i metode koje u potpunosti isključuju uporabu svih laboratorijskih životinja (Olsson i sur., 2012; Germain i sur., 2017).

U suvremenoj znanstvenoj zajednici uvriježeno je mišljenje kako niti jedan odgovorni znanstvenik ne želi koristiti životinje kada to nije nužno ili im nanijeti nepotrebnu patnju ako se to može izbjeći. Zbog toga većina znanstvenika prihvaća kontroliranu uporabu životinja u istraživanjima i istraživanja isključivo unutar etičkih okvira (Festing i Wilkinson, 2007; Stokes, 2015).

2.1.11. Zakonska regulativa u testiranju na životinjama u Europi i svijetu

Zbog zabrinutosti i pritiska javnosti o dobrobiti životinja, doneseni su mnogi zakoni i pravila čiji je temeljni cilj smanjiti boli i patnju životinja te njihovo korištenje u znanstvene svrhe svesti na minimum. Društvo za prevenciju okrutnih postupaka prema životinjama, SPCA (engl. *Society for Prevention of Cruelty to Animals*) osnovano je u Engleskoj krajem XIX stoljeća.

Pod pritiskom pokreta protiv vivisekcije, Britanska vlada formirala je 1875. godine Kraljevsko povjerenstvo za regulaciju upotrebe vivisekcije (engl. *Royal Commission to regulate the practice of vivisection*), koje je izdalo posebnu legislativu (engl. *Cruelty to Animals Acts*). Zakonodavstvo većine ostalih razvijenih zemalja je kroz nekoliko desetljeća proglasilo određene obavezne preglede prije provođenja pokusa na životinjama (FELASA, 2005; Stokes, 2015; Germain i sur., 2017).

Europska komisija je 1986. godine izdala direktivu 86/609/EEZ (Direktiva Vijeća od 24. studenoga 1986. o usklađivanju zakona i drugih propisa država članica s obzirom na zaštitu životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe) koja više nije na snazi, ali je 2010. godine izdana Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Prema direktivi iz 2010. godine obvezna je cjelovita evaluacija svakog projekta u kojemu će se životinje koristiti za istraživanje, prije provedbe samog projekta, ali nije predviđeno kontinuirano praćenje (engl. *on-going review*) od strane odbora (EC, 2010). Cilj etičke revizije projekata je ishodovanje dozvole za testiranja na životinjama samo onda kada za to postoji opravdanje. Neki aspekti korištenja životinja u znanstvene svrhe trenutno nisu regulirani u paneuropskom pravu, a po mišljenjima navedenim u *Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe* (FELASA, 2005) izazivaju konstantnu zabrinutost znanstvene javnosti. To se prije svega odnosi na usmrćivanje životinja kako bi se pribavilo tkivo ili organi za *in vitro* studije te usmrćivanje viška životinja koje su uzgojene za znanstvene svrhe. Ovdje treba pridodati i problematiku konteksta u kojemu se koriste laboratorijske životinje, s posebnim naglaskom na postupanje sa životinjama i educiranost osoblja. Mnogo je organizacija koje daju smjernice za postupanje sa životinjama, bilo da se radi o brizi za životinje, njihovom uzgoju, prehrani, transportu, ali ponajviše o uporabi životinja u laboratorijskim eksperimentima. Neke od tih organizacija su ICH (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), CPCSEA (engl. *Committee for the Purpose of Control And Supervision of Experiments on Animals*) i OECD (Doke i Dhawale, 2015).

Uredba (EZ) 1907/2006 Europskoga parlamenta i Vijeća EZ o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija, poznatija pod nazivom REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) predstavlja pravni okvir Europske unije za kemikalije te od 1. srpnja 2007. godine zamjenjuje mnogobrojne dotadašnje uredbe i direktive koje su regulirale područje kemikalija jedinstvenim sustavom (EC, 2006). Osnovni je cilj Uredbe održavanje visoke razine zaštite od rizika koji predstavljaju kemikalije te

promicanje alternativnih metoda u procjeni rizika i smanjenje pokusa na životinjama. ECHA (engl. *European Chemicals Agency*, Europska agencija za kemikalije) je agencija koja pripada regulatornim tijelima za provođenje inovativnih propisa Europske unije o kemikalijama, uz informativnu podršku (Ukelis i sur., 2008).

Europski parlament se trajno bavi pitanjima smanjivanja i zabrane testiranja na životinjama. Razlozi su etičke prirode, ali i postoje drugi razlozi poput postojećih legislativa, sprječavanja sukoba interesa, uvjerenja i ciljeva političkih grupa u parlamentu te pritiska javnosti. U prosincu 2019. godine je Europski parlament donio novu strategiju rasta kojom vodeći stručnjaci iz svih područja znanosti udružuju svoja nastojanja za preobrazbu europskog društva u pravedno i prosperitetno društvo s modernim, resursno učinkovitim i konkurentnim gospodarstvom. Strategija je objavljena pod nazivom Europski zeleni plan (engl. *The European Green Deal*). Europski zeleni plan potiče i tehnologije koje su prihvatljive za okoliš i inovacije pa se spominje i razvijanje alternativnih metoda među kojima su i one koje se odnose na ispitivanja toksičnosti. Kod procjene rizika naglasak je stavljen i na potrebu za smanjenjem ispitivanja na životinjama te se poziva na povećanje napora i osiguravanje sredstava u tu svrhu (Busquet, 2020; EP, 2020).

Tri regulatorna tijela koja u Europi imaju značajnu ulogu u razvoju alternativnih metoda su ECHA, EFSA (engl. *European Food Safety Authority*) i EMA (engl. *European Medicines Agency*). Glavna strategija ECHA-e je smanjenje testiranja toksičnosti na životinjama upotrebom *in silico* metoda, odnosno metoda koje analiziraju i kombiniraju postojeće podatke. EFSA se bavi razvojem *in vitro* metoda u provođenju 3R principa. EMA poduzima aktivnosti i izdaje smjernice za provođenje 3R principa kod ispitivanja lijekova (Busquet, 2020).

U SAD-u je na snazi Zakon o dobrobiti životinja (AWA, engl. *Animal Welfare Act*) iz 1966. godine. To je jedini savezni zakon koji regulira postupanje sa životinjama u istraživanjima, na izložbama, pri transportu i trgovini životinjama. Dobrobit životinja je osigurana i nizom drugih zakona i smjernica, no ovaj zakon je minimalni prihvatljivi standard. Propisani su standardi za postupanje kod njege, liječenja i prijevoza životinja, uključujući i brigu za životinje koje se koriste u svrhu znanstvenih istraživanja. Bol i patnja životinja mora se svesti na minimum te je potrebno osigurati odgovarajuću upotrebu anestetika, analgetika, sredstava za smirenje i eutanaziju. Istraživači moraju uvijek razmotriti alternativne pristupe kako bi izbjegli bol i patnju životinja i prije provođenja eksperimenata se moraju savjetovati s liječnikom veterinarske medicine o najučinkovitijim načinima smanjenja boli, smirenja i ublažavanja patnje životinja. Svaka ustanova u SAD-u koja koristi životinje za istraživanje mora podnijeti godišnje izvješće u Ministarstvo poljoprivrede SAD-a (USDA, engl. *United States Department of Agriculture*)

koje navodi broj životinja koje su doživjele bol veću od neznatne ili trenutne, bez lijekova za ublažavanje boli (Stokes, 2015).

2.1.12. Procjena etičke prihvatljivosti istraživanja

Kako bi se dopustilo provođenje eksperimenata na životinjama samo onda kad je to nužno i opravdano implementirane su strategije propisane 3R principom te je potrebna adekvatna procjena etičke prihvatljivosti eksperimenata koji se provode u sklopu akademskih institucija, kao i istraživanja vezana uz industriju. Većina zemlja ima nacionalne etičke odbore koji provode tu procjenu. U nekim zemljama su lokalni pregledi obvezni, ali ih nadgledaju nacionalni koji mogu naknadno odobriti ili arbitrirati rad, a neke imaju i neovisne odbore. Budući da je u etičkim pitanjima moguće doći do procjena koje se razlikuju zbog različitih osobnih stavova, moguće je da se odluke lokalnog i nacionalnog odbora razlikuju. FELASA (engl. *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) je institucija kojoj je cilj zagovaranje odgovornog znanstvenog ponašanja u radu sa životinjama u znanosti te objedinjuje interese zemalja u Europi i izvan nje. Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama je član FELASA-e (FELASA, 2005).

U nekim zemljama (Grčka, Njemačka, Austrija i Švedska) je u pojedinim slučajevima za procjenu etičke prihvatljivosti i opravdanosti rada s pokusnim životinjama zadužena jedna osoba. To je najčešće ovlaštenu službeni veterinar, liječnik ili zoolog, s ili bez naknadne procjene odbora. U zemljama u kojima se provodi mali broj znanstvenih istraživanja problem je u nedostatnom broju ljudi koji provode etičke procjene te povezanost tih ljudi sa znanstvenom zajednicom koja provodi istraživanja za koje se radi procjena (FELASA, 2005). Procjena jedne osobe nije poželjna jer može biti subjektivna te nema nužno rasprave, konsenzusa i dogovora, već je savjetovanje sa znanstvenicima proizvoljno. Pregled jedne osobe ne može obuhvatiti raspon faktora i sve perspektive koje bi utjecale na odluku većeg odbora, a odgovornost pojedinca koji je donio odluku je velika. Kod etičkog pregleda, potrebno je imati raznolike sudionike u raspravi koji imaju različita stajališta o pitanjima koja se raspravljaju, a sudionici moraju pokrivati što šire područje stručnosti. Budući da niti jedan znanstvenik ili stručnjak iz nekog područja ne može imati sva znanja koja su potrebna za ovu procjenu, bilo bi poželjno uključiti što više stručnjaka iz različitih područja znanosti. To osim veterinarskih stručnjaka i zoologa uključuje i znanstvenike s područja biomedicinskih znanosti, statistike i alternativnih metoda procjene toksičnosti (FELASA, 2005). U nekim zemljama se također uključuju i laici, koji dolaze iz drugih područja znanosti (društvene znanosti kao što su sociologija ili pravo), administrativnog osoblja ili menadžmenta koji nema veze s uporabom životinja. Kada u odluci

o tome je li znanstveni projekt etički prihvatljiv ili ne sudjeluje osoba koja nije nužno u toj znanosti, već dolazi izvan tog područja, zabrinutost javnosti o donesenoj odluci biva ublažena. U većini zemalja znanstvenici koji provode istraživanja rijetko su, ili nikada, prisutni u etičkoj procjeni, osim u Velikoj Britaniji gdje sudjeluju u ranim stadijima procjene. Kod rasprave o etičkoj prihvatljivosti nekog istraživanja ipak bi bilo ispravno uključiti znanstvenike koji će provoditi istraživanje jer i oni mogu doprinijeti davanjem svih potrebnih objašnjenja o samom eksperimentu, ali ne bi trebali biti prisutni tijekom donošenja odluke kako na nju ne bi utjecali (FELASA, 2005).

U raspravi treba svim sudionicima pružiti priliku za iznošenje stajališta i tako osigurati informiranost o svim aspektima. Dobro organizirani i informirani odbor znat će procijeniti je li potrebno podržati neki znanstveni projekt ili ne. Procjena da je uporaba životinja za testiranje nepotrebna može biti donesena na temelju činjenice da životinje trpe nepotrebnu bol, ali i na temelju procjene da svrha istraživanja ne odobrava njegovu provedbu iako je šteta za životinju blaga. Također, neki se postupci mogu ocijeniti neprihvatljivima unatoč procjeni o većoj općoj koristi ukoliko se ocijeni da su štete ozbiljnije ili postoje odgovarajuće alternative (Bateson, 1986; FELASA, 2005).

Prema izvješću FELASA-e većina ispitanika u njihovim istraživanjima smatra da se postupci etičkih procjena u njihovim zemljama provode odgovarajuće. Međutim, to je teško procijeniti bez prisutnosti u odborima i njihovim raspravama. Način pristupanja evaluaciji se razlikuje među zemljama zbog razlike u članovima koji u njima sudjeluju i njihovim kompetencijama. U 9 zemalja članica FELASA-e postoje određene smjernice ili popisi čimbenika koji postavljaju načela za provođenje etičke procjene. Takve se smjernice rijetko uspostavljaju na nacionalnoj razini, iako postoje, primjerice, u Švicarskoj (FELASA, 2005).

Diljem svijeta objavljene su razne smjernice namijenjene izradi plana za kvalitetnu procjenu opravdanosti korištenja životinja za toksikološka ispitivanja. Te smjernice uzimaju u obzir moguću patnju životinja tijekom ispitivanja te potencijalnu korist dobivenih rezultata istraživanja za dobrobit ljudi. Primjer je prijedlog sustava za donošenje odluka o etičkoj prihvatljivosti eksperimenata na životinjama u osam koraka koji su sastavili dr. Frans Stafleu i suradnici 1999. godine na Sveučilištu Utrechtu. Ovim se sustavom tijekom procjene prvo razrađuju pitanja korisnosti eksperimenta za dobrobit čovjeka te se svaki aspekt boduje s određenim brojem bodova, kod čega veći broj bodova znači veću dobrobit za čovječanstvo. Nakon toga se procjenjuje kakav će efekt eksperiment imati na pokusne životinje te se također boduje po definiranom modelu, kod čega veći broj bodova označava veću patnju i bol životinja.

U konačnici se odluka donosi na temelju odvage koja je od stavki „ostvarila“ veći broj bodova – dobrobit eksperimenta ili patnja laboratorijskih životinja (Stafleu i sur., 1999).

Osim odgovarajuće etičke procjene prije odobrenja provođenja eksperimenata, bitno je provoditi i kontinuirano praćenje (engl. *on-going review*) tijekom samog istraživanja. Ono se, prema istraživanju FELASA-e, ne provodi u svim zemljama članicama, a kod nekih zemalja (npr. Nizozemska) je takva procjena standardna. U malom broju zemalja se provodi i etička procjena nakon završetka eksperimenata (FELASA, 2005).

Neki se znanstvenici boje da pretjerane etičke procjene stvaraju nepotrebnu birokraciju koja u konačnici usporava znanstvena istraživanja i donosi više štete nego koristi u znanstvenim istraživanjima (Festing i Wilkinson, 2007).

2.2. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Kako bi valjano ispitali sigurnost nekog kemijskog spoja, potrebno je provesti odgovarajuće testove toksičnosti. Tradicionalni testovi toksičnosti su *in vivo* testovi, odnosno testovi kod kojih se koriste cijele životinje kao modeli, dok su alternativni testovi toksičnosti *in vitro* testovi toksičnosti kod kojih se ne koriste cijele životinje (Eaton i Gilbert, 2013).

Deskriptivni testovi toksičnosti na pokusnim životinjama zasnivaju se na dva osnovna principa:

1. rezultati istraživanja na životinjama su primjenjivi na ljude.
2. kako bi se otkrile moguće opasnosti za ljude, laboratorijske pokusne životinje se izlažu visokim dozama kemikalija.

Prvi princip nije u potpunosti valjan iz razloga što neki poznati kemijski spojevi izazivaju određene pojave kod ljudi, ali ne nužno i kod životinja (npr. mogu izazvati karcinom kod ljudi, a nisu nužno kancerogeni za pokusne životinje). Ispitivanja kancerogenosti ksenobiotika na životinjama ne mogu uvijek biti osnova za donošenje zaključaka o kancerogenosti za ljude jer postoje razlike u biotransformacijama prokancerogena u kancerogen kod ljudi i životinja. Isto tako, postoje razlike i u mehanizmima toksičnosti između različitih vrsta životinja i čovjeka. Drugi princip je proizišao iz odnosa doze i odgovora, po kojem je toksični učinak češći ukoliko je doza ili izloženost veća. Nekada štetni učinci na zdravlje dolaze do izražaja tek nakon duljeg trajanja izloženosti ili dovoljnog intenziteta, ponekad samo kod osjetljivih pojedinaca ili tijekom osjetljivih životnih faza. Korištenje visokih doza pri tretmanu pokusnih životinja može predstavljati problem kod ekstrapolacije rezultata ukoliko je čovjek realno izložen znatno nižim dozama (Gibb, 2008; Eaton i Gilbert, 2013).

Potrebno je pokriti sva područja mogućeg rizika za ljude te uzeti u obzir iscrpan popis mogućih nuspojava koje se mogu predvidjeti. Toksične učinke na ljudima možemo klasificirati na: akutne toksične učinke, toksičnost ponovljenih doza, negativne učinke na plodnost i reprodukciju, embriotoksičnost, genotoksičnost, kancerogenost, imunosupresiju i druge lokalne štetne učinke (Olejniczak i sur., 2001).

2.2.1. *In vivo* testovi toksičnosti

In vivo testovi toksičnosti koriste se najčešće za ispitivanje akutne toksičnosti u glodavaca, odnosno toksičnih učinaka kod kraćeg izlaganja nekom kemijskom spoju ili smjesi spojeva u visokoj dozi. Suvremeni *in vivo* testovi su usavršeni te često koriste više od jedne životinjske vrste. Testovi akutne toksičnosti su nužni i služe za osnovnu karakterizaciju potencijala toksičnosti, rani odabir odgovarajućih farmakoloških tvari, pronalazak raspona doze i daju prve dokaze na ciljnim tkivima i organima (Ukelis i sur., 2008; Sachana i Hargreaves 2012).

Tradicionalna *in vivo* metoda određivanja akutne toksičnosti je LD₅₀ (engl. *lethal dose*) test. Kod ove metode je cilj odrediti vrijednost LD₅₀ koja predstavlja dozu (u mg kg⁻¹ t. m.) kod koje se postiže letalnost kod 50 % tretirane populacije. Za topive spojeve se koristi vrijednost LC₅₀ (engl. *lethal concentration*), odnosno koncentracija spoja u vodi (u mg L⁻¹) kod koje je letalnost tretiranih životinja 50 % (Timbrell, 2009).

Akutni test toksičnosti je test koji se provodi kako bi se utvrdio odnos doza-odgovor ispitivane tvari za određenu životinjsku vrstu. Akutni testovi toksičnosti se provode na dvije ili više vrsta sisavaca – u Europskoj uniji i Japanu je potrebno koristiti minimalno dvije, a u SAD-u tri. Preporučuju se glodavci jer su pogodni za kvalitativnu procjenu toksičnosti i kvantitativno određivanje letalne doze (OECD, 2008; Ukelis i sur., 2008).

U cilju određivanja toksičnih učinaka, potrebno je provesti niz istraživanja u kojima dolazi do izlaganja pokusnih životinja ispitivanoj tvari te se provjeravaju različiti parametri poput urođenih oštećenja (abnormalnosti konstitucije, anomalije na tkivima), promjena u ponašanju, pojave raka i drugi učinci na zdravlje. Kako bi se postigla veća sigurnost, istraživanja su se poboljšavala uvođenjem multigeneracijskih testova toksičnosti (mogući učinci na potomstvo kroz više generacija), odnosno proširivanjem postojećih testova na životinjama. Tako su testovi postali još skuplji i dugotrajniji te koriste veći broj pokusnih životinja (Gibb, 2008). Broj pokusnih životinja uvijek je potrebno smanjiti iz ekoloških i etičkih razloga. Za LD₅₀ test obično je potrebno koristiti veliki broj životinja, ali su razvijene *in vivo* metode u kojima se koristi minimalni mogući broj pokusnih životinja. Za svaki definiran korak u istraživanju primjenjuju

se samo tri životinje svakog spola, a testovi su osmišljeni tako da nikada nije potrebno više od dva koraka. Istraživanje se može ponoviti s još šest životinja osjetljivijeg spola, ukoliko se primijeti da je jedan spol osjetljiviji od drugog. Moderni *in vivo* testovi uključuju manji broj životinja i nemaju nužno letalan ishod kao krajnju točku eksperimenta, već toksičnost. Time se postižu humaniji uvjeti za životinje u skladu sa zakonima i pokusi se prekidaju kada se primijeti bol, predstojeća smrt ili težak stres kod životinje (Ukelis i sur., 2008).

2.2.2. Mikrodoziranje

Mikrodoziranje je nova tehnika za mjerenje toksikokinetike koja uključuje praćenje kretanja stranih tvari u tijelu, tj. apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje nakon unosa niskih doza (od 1 % terapijske doze) lijeka. Istraživanja se provode na ljudskim dobrovoljcima i bez prisile što ih čini etičkim opravdanijim od istraživanjima na životinjama (Willmann i sur., 2008; Cheluvappa i sur., 2017). Uz pomoć mikrodoziranja je istražen velik broj lijekova. Iako ova metoda još uvijek ne donosi prave i u cijelosti relevantne podatke, ima potencijal za razvoj. Zamjena jednog dijela testiranja na životinjama mikrodoziranjem znatno smanjuje vrijeme potrebno za istraživanje lijeka, prema nekim procjenama za 12 do 18 mjeseci (Cheluvappa i sur., 2017).

PET (pozitronska emisijska tomografija) je neinvazivna metoda tomografskog snimanja koja koristi farmakološki ili biološki/biokemijski aktivne spojeve označene kratkotrajnim pozitron-emitirajućim radionuklidima. Unose se intravenozno te se prate vanjskom detekcijom i vizualiziraju kao skup tomografskih slika. Istraživanja se provode na dobrovoljcima, pacijentima ili u istraživanju istraživanjima na životinjama (Bergström i sur., 2003).

Kod mikrodoziranja se za praćenje kemikalija koristi PET. PET omogućuje procjenu apsorpcije i distribucije lijeka i procjenu kasnijeg doziranja. Dva glavna pristupa kod upotrebe PET-e u istraživanju farmakokinetike su izravno označavanje i istraživanje popunjenosti mjesta vezanja. Kod izravnog označavanja lijek se označuje radioaktivnim izotopom. Radioizotopi ^{11}C , ^{18}F ili ^{76}Br se koriste za proizvodnju različitih obilježenih gradivnih spojeva, kao što su $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, N^{11}CN , ^{11}CO ili obilježeni ioni fluora i broma. Poluživot im varira od 20 minuta (za ^{11}C) pa sve do 16 sati (za ^{76}Br), a specifična radioaktivnost od 10 do 200 GBq μmol^{-1} . Iz obilježenog ^{11}CO mogu se sintetizirati različite funkcijske skupine: aldehidi, ketoni, urea, imidi, amidi, tioesteri, esteri, karboksilne kiseline i drugi. Obilježeni spoj se unosi injekcijom ili infuzijom, na način da ne bude dugo na istom mjestu kako ne bi u tijelu na jednom mjestu bila prevelika količina radioaktivnosti. Moguće ga je unijeti i oralno ili inhalacijski, ali je tada potrebno smanjiti dozu

radioaktivnosti. U trenutku unosa radioaktivno obilježenog lijeka, aktivira se detektor koji prati u konačnici oslobođene gama zrake (npr. ^{18}F ugrađen u FDG) raspada se beta plus raspadom uz emisiju pozitrona i neutrina). Nastali pozitron je jako nestabilan te nekoliko desetaka mm do par milimetara od mjesta nastanka dolazi do njegove anihilacije s elektronom. Anihilacija rezultira poništenjem pozitrona i elektrona što prati simultana emisija dva γ fotona, svaki energije 511 keV, koji mjesto anihilacije napuštaju pod kutom od 180° , odnosno na istom pravcu u suprotnim smjerovima, što se detektira PET uređajem (Bergström i sur., 2003; Willmann i sur., 2008; Dresto-Alač, 2012). Snimke snimljene PET uređajem se promatraju na ekranu i tako se identificira u kojim je dijelovima tijela i u kojoj količini došlo do distribucije obilježenog spoja te u kojem vremenu nakon ulaska u tijelo. Koncentracija lijeka se računa iz identificirane radioaktivnosti i tjelesne mase ispitanika. Radionuklidi kratkog vremena poluraspada imaju visoku količinu radioaktivnosti ($10 - 400 \text{ GBq } \mu\text{mol}^{-1}$). Za ispitivanja je potrebno postizati radioaktivnost od $300 - 800 \text{ MBq}$. Ukupna količina radioaktivnosti prisutna u tijelu zdravog dobrovoljca ne smije prelaziti 2000 MBq . Kod PET ispitivanja uglavnom se uvodi 600 MBq s $6 - 20 \text{ nmol}$ lijeka. Unesen lijek se prati te se istražuje njegova farmakokinetika, distribucija u organima, dolazak do ciljnog tkiva i neželjena akumulacija u organima. Ova se metoda ne može koristiti za praćenje biotransformacija jer PET mjeri radioaktivnost i nema mogućnost razlikovanja od koje molekule ta radioaktivnost dolazi. Stoga nije moguće razaznati dolazi li radioaktivnost od lijeka ili nekog njegovog metabolita (Bergström i sur., 2003).

Ova metoda ima brojne prednosti. Radionuklidi se mogu uključiti u konstituciju biološki aktivnih molekula, a da im se ne mijenjaju biološka svojstva, mogu se pratiti izvana, odnosno metoda je neinvazivna i imaju kratko vrijeme poluraspada koje je prilagođeno vremenu potrebnom za ispitivanje kod ljudi. Prednost ove metode je i što fizikalno-kemijska svojstva lijeka ostaju nepromijenjena, mogu se pojaviti samo promjene u izosteriji. Kod istraživanja popunjenosti mjesta vezanja, ligand obilježen izotopima se natječe za mjesto vezanja (npr. receptor) s lijekom. Izotopi (^{64}Cu ili ^{68}Ga) se spajaju preko kelirajućih spojeva (DOTA ili TETA) na monoklonska protutijela ili peptide. Stupanj popunjenosti mjesta vezanja se procjenjuje usporedbom PET snimanja nakon unosa lijeka i prvog PET snimanja, u kojem je sudjelovao samo ligand s izotopom. Nije moguće precizno odrediti stupanj popunjenosti, već se samo radi o procjeni zbog konkurentnog vezanja liganda s izotopom i lijeka na isto mjesto. Kod osmišljanja i razvoja ovakvih istraživanja bitno je osigurati da skupine koje se vežu u svrhu vizualizacije ne utječu na farmakokinetiku lijeka te treba uzeti u obzir da postoji konkurencija

prema mjestu vezanja između lijeka i liganda. Ova se metoda koristi za ispitivanje dopaminskih receptora, kako bi se u kasnijim istraživanjima izbjegle doze koje bi imale nuspojave (Willmann i sur., 2008).

Metoda mikrodoziranja ima i svoje ograničenje, a ono leži u činjenici da je nemoguće predvidjeti toksičnost ili nuspojave koje bi se pojavile kod veće, terapijske doze. Nove lijekove je teško formulirati u koncentracijama za testiranje PET mikrodoziranjem pa je koncentracija potrebna za postizanje genotoksičnih učinaka znatno viša od one koja se uvodi kod mikrodoziranja. Te se koncentracije ispituju tek kasnije tijekom razvoja lijekova. Lijekovi se ispituju ovom metodom do koncentracije od $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Prosječna koncentracija nakon injekcije je između 0,1 i 0,3 nM u plazmi te se smanjuje s vremenom (Bergström i sur., 2003). Unatoč primjenjivosti mikrodoziranja u istraživanju lijekova, i dalje će biti potrebno testove provesti na životinjama s višim (terapijskim) dozama. Stoga, zasada, mikrodoziranje može samo pomoći djelomičnim smanjenjem korištenja životinja u ranijim fazama istraživanja. Zbog ograničenja mikrodoziranja u predviđanju učinka terapijske doze ova metoda nije zamjena za istraživanja na životinjama, ne smatra se alternativnim pristupom i ne pripada toj klasifikaciji (Bergström i sur., 2003; Robinson i Jennings, 2004; Cheluvappa i sur., 2017).

2.2.3. *In vitro* testovi toksičnosti

Alternativno *in vivo* metodama, *in vitro* metode testiranja toksičnosti ne koriste cijele životinje kao testne subjekte, već stanice ili tkiva. Istraživanje i proučavanje učinaka je moguće korištenjem stanica, dijelova stanica i tkiva umjesto korištenja cijelih organizama, odnosno životinja (Gibb, 2008). *In vitro* testovi razvijeni su kao nadopuna ili zamjena za klasične *in vivo* testove, a neki se koriste kao testovi probira (engl. *screening*), za identificiranje potencijalnih štetnih učinaka i postavljanje prioriteta za sljedeće testove. Češće se koriste za proučavanje lokaliziranih učinaka ili specifičnih učinaka na određena tkiva, a ne na cijeli organizam (Eisenbrand i sur., 2002; Krewski i sur., 2010).

U usporedbi s *in vivo* testovima, *in vitro* testovi toksičnosti su kratkotrajniji, jeftiniji te etički i ekološki prihvatljiviji. Vrijeme potrebno za izvođenje istraživanja skraćuje se sa 5 - 10 na 1 - 3 godine, troškovi su znatno manji i korištenje životinja je bitno smanjeno (Eisenbrand i sur., 2002; Kniewald i sur., 2005). U prilog *in vitro* testovima ide činjenica da zbog čestog korištenja tkiva i stanica humanog podrijetla nema potrebe za utvrđivanjem sličnosti u metaboličkim putevima između različitih vrsta (Eisenbrand i sur., 2002). Moguće je umjesto humanih stanica koristiti i stanice drugih sisavaca, a i mikroorganizama poput kvasca. Za ispitivanje

genotoksičnosti se, primjerice, koriste stanične linije mišjih limfoma i ovarija kineskog hrčka (Timbrell, 2009).

In vivo testovi smatraju se zlatnim standardom za ispitivanje akutne toksičnosti. Zbog toga se *in vitro* ispitivanja u toksikologiji dizajniraju na način da osiguraju što veću podudarnost rezultata s odgovarajućim *in vivo* istraživanjima (Roggen, 2011). Kako bi se postiglo prihvaćanje ovih testova, mora biti potvrđena njihova točnost u odnosu na *in vivo* modele te moraju biti sigurni. Prednost *in vitro* testova je mogućnost istraživanja molekularnih i staničnih mehanizama toksičnosti, što nije moguće kod *in vivo* testova (Kniewald i sur., 2005). Ovim metodama se uspješno provode testiranja za neka područja toksičnosti, primjerice fototoksičnost i genotoksičnost (Olejniczak i sur., 2001; Eaton i Gilbert, 2013).

Modernim *in vitro* testovima najčešće se ispituje utjecaj kemijskih spojeva na staničnu proliferaciju ili vijabilnost, i to na primarnim kulturama i staničnim linijama. Testovi u kojima se ispituje koliko je stanica mrtvo, a koliko preživjelo daju prve informacije koje možemo dobiti o učinku nekog kemijskog spoja na stanice. U ovim eksperimentima se određuje vijabilnost stanica, tip stanične smrti, njihova metabolička aktivnost, integritet membrane,... (Eisenbrand i sur., 2002).

Vijabilnost stanica može se odrediti brojenjem živih stanica, kvalifikacijom genomske DNA, ukupnih proteina ili inkorporiranjem fluorescentnih ili radioaktivnih markera u DNA proliferirajućih stanica. Broj mrtvih stanica može se odrediti znatno lakše i preciznije od broja živih stanica (Ukelis i sur., 2008). U literaturi najčešće spominjani tipovi stanične smrti su nekroza i apoptoza. Nekroza je stanična smrt kod koje se stanica uništava autolizom, kod nekrotičnih stanica nema tvorbe apoptotskih tjelešaca. Apoptoza je programirana smrt stanice. Bitna je za razvoj organizma i eliminaciju neželjenih stanica iz tkiva ili organa, a potaknuta je apoptotskim faktorima. U apoptotskim stanicama prisutna su apoptotska tjelešca (Bernardi i sur., 1999; Ukelis i sur., 2008).

Metabolička aktivnost se bilježi mjerenjem potrošnje energije, odnosno kvantifikacijom ATP-a ili obojenih supstrata ili produkata u koji sudjeluju u redukcijским metaboličkim putevima u stanici (MTT, WST-1, resazurin) (Ukelis i sur., 2008).

Do narušavanja integriteta membrane stanica dolazi zbog djelovanja toksičnih spojeva kojima je ona primarno ciljno mjesto djelovanja. Stupanj dezintegracije može se odrediti uz pomoć boja koje se unesu u citoplazmu, a zatim se obojene stanice detektiraju mikroskopskim

metodama. Najčešće korišteni testovi su *Trypan blue* i NRU (engl. *Neutral Red Uptake assay*) (Ukelis i sur., 2008).

Kod nižih koncentracija od onih koje induciraju staničnu smrt može se proučavati mehanizam pre-letalnih putova. Najčešće istraživane nuspojave lijekova su one koje uzrokuju hepatotoksičnost, kao npr. steatozu, kolestazu, fosfolipidozu i oksidacijski stres. Pre-letalni indikatori stresa stanice su pre-apoptotičke/nekrotičke signalne molekule, iscrpljivanje glutaciona, blage promjene u homeostazi kalcija i energije, poremećaji u proliferaciji stanice i autofagocitoza kojom se uništavaju abnormalni organeli (Xu i sur., 2004).

2.2.3.1. Kulture stanica i tkiva u *in vitro* ispitivanjima toksičnosti

U *in vitro* modelima ispitivanja toksičnosti najčešće se koriste kulture stanica i tkiva. Pored stanica mikroorganizama, puno se češće koriste uzgojene stanice sisavaca i drugih životinja (Timbrell, 2009).

Stanične kulture koje se u tu svrhu koriste mogu biti primarne stanice koje se dobivaju iz tkiva životinje te se nadalje propagiraju i uzgajaju u odgovarajućem mediju za kultivaciju stanica pri točno određenim laboratorijskim uvjetima. One nemaju dug životni vijek i podložne su genetičkim, fiziološkim i biokemijskim promjenama te se općenito može reći da „teško rastu“ *in vitro*. Evidentirani su primjeri promjene u izoformama citokroma P-450 (koje uvelike utječu na biotransformacije u stanici) i to već nakon 24 satnog perioda od izolacije. Takve stanične kulture stoga nisu pogodne za dugoročna ispitivanja koja zahtijevaju ponavljanja i reproducibilnost te se rjeđe koriste (Timbrell, 2009).

Drugi tip staničnih kultura koje se mogu koristiti u *in vitro* modelima ispitivanja toksičnosti su besmrtno stanice, kontinuirane stanične linije, odnosno stanice koje se mogu beskonačno razmnožavati te se mogu zamrzavati i odmrzavati kada je to potrebno. Dobivaju se transformacijom primarnih stanica ili iz tumorskih stanica te su genetički promijenjene i ne oponašaju uvijek u potpunosti stanične metaboličke i signalne putove. Za razliku od primarnih kultura koje „teško rastu“ *in vitro*, kontinuirane stanične linije karakterizira brzi rast i prinos biomase. Nedostatak kod ovog *in vitro* modela ispitivanja toksičnosti je u tome što stanice imaju izmijenjene stanične procese i genetski su nestabilne (Timbrell, 2009).

Osim navedenih tipova stanica koje se dobivaju iz diferenciranih tkiva, za *in vitro* ispitivanja toksičnosti mogu se koristiti i embrionalne (nediferencirane) matične stanice koje su znatno stabilnije i bolje oponašaju glavne metaboličke putove u stanici koje je potrebno uzeti u obzir kod procjene toksičnosti i rizika (Timbrell, 2009; Eskes i sur., 2017). Matične stanice se mogu

diferencirati u različite tipove stanica i tako koristiti za testiranje toksičnosti specifično za neko određeno tkivo. Implementacija matičnih stanica u već standardizirane protokole *in vitro* ispitivanja toksičnosti može rezultirati smanjenjem pogrešnog identificiranja toksičnih svojstava kemikalija te tako poboljšati *in vitro* procjenu toksičnosti.

Kako bi se poboljšala pouzdanost *in vitro* metoda koje se temelje na uzgoju staničnih linija, objavljen je izvještaj o dobroj praksi za uzgoj životinjskih stanica, GCCP (engl. *Good Cell Culture Practice*) (Eskes i sur., 2017).

2.2.3.2. Serum životinjskog podrijetla

Serum je krv kojoj su odstranjene stanice i faktori zgrušavanja krvi. Koristi se u *in vitro* kulturama stanica kao dodatak mediju u kojem stanice rastu. Najčešće korišten serum je fetalni goveđi serum (FBS, engl. *Fetal Bovine Serum*). Serum je mješavina kompleksnog sastava koja sadrži faktore rasta te druge biomolekule potrebne za rast stanica. Glavna funkcija seruma i razlog zbog kojeg se dodaje je poticanje rasta i proliferacije stanica te opskrba transportnim proteinima, mineralnim tvarima, lipidima, faktorima za prijanjanje kulture stanica uz površinu posude za uzgoj te faktorima rasta stanica, kao i faktorima koji stabiliziraju i omogućuju detoksikaciju te regulaciju pH (Jochems i sur., 2002; Rauch i sur., 2011).

Fetalni serum je bolji za rast stanica od seruma odraslih životinja zbog manje koncentracije γ -globulina te potiče bolji rast i proliferaciju stanica. Dobiva se iz fetusa goveda, odnosno trudnih krava koje su spremne za klanje. Kad je krava trudna u vrijeme klanja, fetusi se odvajaju od krave, očiste od amnionske tekućine i dezinficiraju. Krv se vadi punkcijom sterilnom iglom između rebara, što provodi iskusni stručnjak. Moguće je krv izvaditi i iz pupčane vrpce, ali se ta tehnika rjeđe koristi. Krv se dobiva punkcijom iz srca dok ono kuca. To je nužno jer se tako mogućnost kontaminacije mikroorganizmima svodi na minimum. Budući da je nužno da ne dođe ni do kakvog dodira s mogućim kontaminantima, sve se radi u aseptičkim uvjetima. Od jednog se fetusa može dobiti 150 do 350 mL seruma, ovisno o njegovoj starosti. Sličnim se postupkom, također punkcijom srca, može dobiti serum svinja i konja koji mogu služiti kao alternativa FBS-u. Budući da fetus mora biti živ za vrijeme punkcije i životinje nisu pod anestezijom, ovaj je postupak problematičan s etičkog stajališta. Zbog nedostatka kisika tijekom postupka postoji mogućnost oštećenja mozga te je moguće da dolazi do patnje fetusa goveda. Osim toga, do nelagode životinja dolazi i tijekom pripreme za klanje, transporta i pred klanje, što znači da je patnja trudne krave uslijed klanja veća ukoliko se koristi i za dobivanje FBS-a. Osim toga, ostali problemi kod korištenja FBS su rizik od kontaminacije, visoka cijena te nedostupnost tijekom cijele godine (Jochems i sur., 2002; Rauch i sur., 2011).

U GCCP-u su objašnjene smjernice za nabavu seruma te mogućnosti zamjene seruma životinjskog podrijetla serumima iz drugih izvora. Moguć je i rast stanica u medijima bez seruma (engl. *serum-free media*). Ulažu se naponi kako bi se smanjila upotreba seruma iz životinjskih izvora te se teži zamijeni sintetskim serumima ili se preporučuje korištenje medija bez seruma. Razvijeno je niz zamjena za serum, od kojih su neke i komercijalno dostupne. Neke su dobivene iz ekstrakata tkiva (hipofiza), očne tekućine, kravljeg mlijeka ili kolostruma, a neki su biljni ekstrakti ili lizati trombocita. Kod razvoja seruma bitno je da sadrži mitogene faktore koji će poticati rast i proliferaciju stanica. Ti su faktori prisutni u serumima, a podrijetlo im je iz aktiviranih trombocita (Bal-Price i Coecke, 2011).

Lizati trombocita se mogu koristiti kao alternativa FBS-u jer mogu opskrbiti rastuće stanične kulture faktorima rasta i drugim aktivnim molekulama koje se oslobađaju iz alfa-granula. To su trombocitni faktor rasta (PDGF, engl. *Platelet-Derived Growth Factor*), epidermalni faktor rasta (EGF, engl. *Epidermal Growth Factor*), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), osnovni faktor rasta fibroblasta (bFGF, engl. *basic Fibroblast Growth Factor*), faktor rasta hepatocita (HGF, engl. *Hepatocyte Growth Factor*) i transformirajući faktor rasta – β (TGF – β , engl. *Transforming Growth Factor β*). Kod razvoja novih seruma trombociti se smrzavaju, skladište, odmrzavaju i aktiviraju (Rauch i sur., 2011).

2.2.3.3. Dobra praksa za uzgoj životinjskih stanica

In vitro tehnologija se brže razvija zbog potrebe za testiranje toksičnosti i kontrole kvalitete proizvoda, ali se primjenjuje i u drugim područjima (Hartung i sur., 2002). Kulture stanica složeni su biološki sustavi koji, unatoč svim prednostima, mogu biti nepouzdan alat za toksikološka ispitivanja. Dobrom praksom za uzgoj životinjskih stanica – GCCP-om rizik od ove nepouzdanosti se svodi na najmanju moguću mjeru. Primjena GCCP-a pruža korisnicima niz pogodnosti, od posebno razrađenih postupaka za racionalizaciju i standardizaciju *in vitro* laboratorijskih praksi i uvođenja jedinstvene nomenklature do učinkovitih sustava kontrole kvalitete i sigurnosti. Dobra praksa za uzgoj životinjskih stanica obuhvaća preporuke o načinima pohrane podataka tijekom ispitivanja i izradi raznih izvještaja, olakšava interpretaciju i primjenu zaključaka koji su dobiveni istraživanjima. GCCP promiče uspostavljanje i održavanje najbolje prakse pri radu s kulturama stanica, olakšava izradu programa obrazovanja, uspostavlja načine za pomoć urednicima i uredništvima znanstvenih časopisa, kao i tijelima koja financiraju istraživanja. GCCP je minimalni standard koji mora zadovoljiti bilo koji postupak u kojem se koriste kulture životinjskih stanica i tkiva. Cilj GCCP-a je smanjenje

nesigurnosti tijekom razvoja i primjene *in vitro* postupaka. GCCP potiče uspostavljanje principa za olakšano međunarodno usklađivanje (Hartung i sur., 2002; Bal-Price i Coecke, 2011).

Šest osnovnih principa GCCP-a su:

1. Razumijevanje *in vitro* sustava i relevantnih faktora koji imaju utjecaj na njega
2. Osiguranje kvalitete svih materijala i metoda te njihove primjene kako bi se održao integritet, valjanost i reproducibilnost provedenog znanstvenog istraživanja
3. Dokumentiranje informacija o svim korištenim materijalima i metodama
4. Uspostavljanje i održavanje odgovarajućih mjera zaštite ljudi i okoliša od bilo koje potencijalne opasnosti
5. Sukladnost s mjerodavnim zakonima i propisima te etičkim načelima
6. Pružanje relevantnog i odgovarajućeg obrazovanja i osposobljavanja osoblja s ciljem promicanja visoke kvalitete i sigurnosti u provođenju *in vitro* tehnika rada (Coecke i sur., 2005).

Razumijevanje *in vitro* sustava i faktora koji imaju utjecaj na njega uspostavlja se korištenjem autentičnog sustava podataka o podrijetlu, genotipskim i fenotipskim karakteristikama, čistoći od biološke kontaminacije, stabilnosti i funkcionalnom integritetu sustava. Standardizaciju tkiva i stanica nije lako osigurati jer su skloni promjenama i izloženi fizičkim i kemijskim utjecajima tijekom korištenja. Ipak, moguće je uspostaviti okvire unutar kojih se mogu kontrolirati varijacije u stanicama i drugi štetni učinci na reproducibilnost i pouzdanost (Bal-Price i Coecke, 2011; Eskes i sur., 2017). Uvjeti u kojima se uzgaja *in vitro* kultura predstavljaju okolinu stanica koja je različita od okoline stanica u *in vivo* uvjetima, a uključuje medij, suplemente i druge aditive te uvjete inkubacije i rasta stanica. Stanice se mogu uzgajati u mediju sa ili bez dodatka seruma, a poželjno je da medij koji se koristi bude kemijski definiran. Upotreba seruma se može izbjeći korištenjem medija bez seruma koji imaju u sebi ekstrakte. Važno je biti svjestan činjenice da serum ima složeni sastav koji često nije točno poznat (Bal-Price i Coecke, 2011). Serija seruma rijetko potječe od jedne životinje, najčešće je smjesa seruma dobivenog od više životinja. Osim toga, svaka serija je drugačija pa je teško osigurati homogeni sastav seruma kroz istraživanje (Hartung i sur., 2002). Prema GCCP-u, bitno je obratiti pažnju kod korištenja seruma iz različitih serija. Kod uvođenja nove serije seruma, potrebno je procijeniti svojstva nove serije ispitivanjem paralelno s prethodnom serijom. Budući da životinjski serumi, unatoč pročišćavanju, mogu biti izvor mikroorganizama,

preporuča se korištenje seruma koji potječu iz zemalja gdje je niža mogućnost infekcije mikroorganizmima i iz životinja do 30 mjeseci starosti. Antibiotici bi se trebali izbjegavati kad god je to moguće. Potrebno je paziti na aseptičke uvjete, tretiranje i čišćenje površina na kojima se manipulira sa staničnim kulturama, izbjegavanje nepoželjnih uvjeta za stanice, a korištenje laboratorijske opreme (poput laminara, inkubatora, sustava za kriopohranu) omogućiti samo educiranom osoblju. Potrebno je održavati odgovarajuću temperaturu pri kojoj rastu stanice, odvod plinova koji mogu imati toksični efekt na stanice te optimalni pH za rast stanica (Bal-Price i Coecke, 2011).

Osiguranje kvalitete svih materijala i metoda te njihove primjene kako bi se održao integritet, valjanost i reproducibilnost provedenog rada postiže se nadgledanjem osiguranja kvalitete bioloških materijala - stanica i tkiva, popratnih materijala, metoda, protokola i standardnih radnih postupaka, opreme i održavanja opreme, postupaka dobivanja podataka i obrade rezultata. Kvaliteta kulture stanica se može procijeniti na temelju njihovog autentičnog podrijetla, morfoloških karakteristika, održivosti, specifične brzine rasta i udvostručenja, funkcionalnosti, stanja diferencijacije, kontrole svojstava koja su specifična za njihovu upotrebu te moguće kontaminacije mikroorganizmima i unakrsne kontaminacije. Kvaliteta medija za uzgoj stanica, aditiva i suplemenata se provjerava iz dokumentacije od dobavljača (Bal-Price i Coecke, 2011; Eskes i sur., 2017).

Dokumentiranje informacija o svim korištenim materijalima i metodama omogućuje sljedivost, interpretaciju i ponovljivost tih postupaka. To uključuje dokumentaciju o vrsti korištenih stanica, njihovom podrijetlu, autentifikaciju i karakterizaciju, ali i dokumentiranje ostalih materijala i metoda korištenih u istraživanju i manipulaciji sa stanicama. Minimalna količina podataka koju je potrebno navesti o stanicama je vrsta ili soj, spol i starost donora, zdravstveno stanje, podrijetlo stanica (iz kojeg je tkiva ili organa kultura izolirana), tip izoliranih stanica, tehnika izolacije, datum izolacije, operator, dobavljač, ugovor o prijenosu materijala, povijest bolesti donora, ispitivanje patogena, uvjeti isporuke, stanje u kojem je bio materijal kad je stigao, identifikacija i autentifikacija stanične linije i testiranje na mikoplazme. Potrebno je čuvati zapise o uspostavljanju kulture, mediju, supstratu, postupcima pripreme i rukovanju sa stanicama te svim pratećim postupcima (Bal-Price i Coecke, 2011). U izvješću je uvijek potrebno navesti nomenklaturu stanične linije (kod ili broj iz banke stanica iz koje je dobavljena), odnosno podrijetlo i metodu izolacije ukoliko je dobivena iz tkiva. Osim toga, potrebno je navesti izvor materijala (npr. banka stanica, laboratorij, donor), osnovne morfološke karakteristike, uvjete uzgoja kulture (sastav korištenog medija, pufferi koji su dodavani, sastav

plinova u inkubatoru), intervale subkultivacije, uvjete zamrzavanja i odmrzavanja, indikatore diferencijacije ili nekih drugih aktivnosti stanice te korištene metode testiranja (Hartung i sur., 2002).

Uspostavljanje i održavanje odgovarajućih mjera zaštite ljudi i okoliša od bilo koje potencijalne opasnosti uključuje rizike vezane uz manipulaciju kulturama stanica. Ti se rizici odnose na fizičke opasnosti te kemijske i biološke opasnosti. Osim toga, postoji i rizik za okoliš uslijed neodgovarajućeg zbrinjavanja otpada ili tijekom transporta (Bal-Price i Coecke, 2011). Primarne kulture ljudskih stanica mogu biti izvori kontaminacije virusima (HIV, hepatitis B, hepatitis C) i infekcija. Stanične linije mogu sadržavati endogene viruse, mogu biti tumorskog podrijetla ili tumorigenične pa je potrebno zaštititi osoblje od mogućih infekcija. Sav otpad je potrebno zbrinjavati na odgovarajući način (Hartung i sur., 2002).

Bitna je i sukladnost s mjerodavnim zakonima i propisima te etičkim načelima. Kod kultura stanica se to odnosi na pribavljanje stanica za uspostavljanje kulture i dobivanje seruma iz životinjskih izvora. Kod upotrebe ljudskih matičnih stanica potrebno je razmotriti etičku stranu podrijetla stanica i njihove potencijalne upotrebe. Istraživanja sa ljudskim matičnim stanicama podliježu strogim kontrolama, a neke zemlje razmatraju i uvođenje zakona i propisa kojima bi ograničili njihovu upotrebu. Nabava matičnih stanica iz embrija i fetusa je etički osjetljivo pitanje zbog okolnosti u kojima takvi embriji i fetusi postaju dostupni. Potrebno je poštivati i slijediti propise koji se odnose na genetski modificirane organizme kad se postupa s genetski modificiranim stanicama (Bal-Price i Coecke, 2011).

Osoblje koje obavlja rad u laboratoriju mora biti kompetentno te je potrebna kontinuirana edukacija. Pružanje relevantnog i odgovarajućeg obrazovanja i osposobljavanja osoblja s ciljem promicanja visoke kvalitete i sigurnosti u provođenju *in vitro* tehnika rada se odnosi na osnovne i specifične tehnike rada. Osnovne tehnike rada su: brojanje stanica, mijenjanje medija, rukovanje medijem, tehnike aseptičkog rada, detekcija i eliminacija kontaminacije, a specifične npr.: kloniranje, transfekcija, transformacija i imortalizacija stanica, propagiranje i izolacija virusa (Hartung i sur., 2002; Bal-Price i Coecke, 2011).

2.2.4. *In silico* modeli

U biologiji se pod *in silico* modelima podrazumijevaju modeli istraživanja koja se provode isključivo na računalu ili koristeći računalne simulacije. Ovi modeli pomažu u razumijevanju različitih osnovnih načela biologije, a mogu dati svoj doprinos i u dizajniranju novih lijekova. Primjena *in silico* modela u toksikologiji uključuje primjenu računalnih i statističkih metoda za

pronalaženje sličnosti, smjerova ili obrazaca interakcija između spojeva za koje je nepoznat toksikološki ishod, kao i za spojeve kojima je toksikološki ishod poznat (sa svrhom provjere). Računalno generirane simulacije koriste se za predviđanje različitih mogućih bioloških i toksičnih učinaka kemikalija i lijekova u razvoju bez upotrebe životinja. Temeljno načelo većine metoda *in silico* analize je princip sličnosti, s hipotezom da strukturno slični spojevi imaju veliku mogućnost istovjetnih bioloških učinaka. Neke se računalne metode određivanja toksičnosti na tom principu koriste u rutinskim predviđanjima potencijalnih kandidata za lijekove (Ford, 2016). Nakon provedenih računalno generiranih simulacija, odabiru se najperspektivnije molekule koje će se testirati *in vivo*, odnosno takve simulacije služe ponajviše za testove probira (Ford, 2016; Cheluvappa i sur., 2017).

Dva često korištena računalna alata su CADD softver (engl. *Computer Aided Drug Design*) i SAR (engl. *Structure Activity Relationship*). Kad se razmatra razvoj nekog novog lijeka ili terapijskog proteina, u obzir dolazi jedino molekula koja se može vezati na receptor u ciljnoj stanici. Kako bi saznali mjesto vezanja lijeka na receptor, obično su potrebni *in vivo* eksperimenti. Međutim, CADD softver može identificirati vjerojatnost mjesta vezanja pa je tako moguće predvidjeti mjesto vezanja potencijalnog lijeka na receptor. Nakon provedene identifikacije, životinje će se koristiti jedino u završnoj fazi za dobivanje potvrdnih rezultata. Kod SAR računalnih programa, biološka aktivnost se predviđa na temelju prisutnosti kemijskih skupina. Kod QSAR-a (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*) se radi o modelu koji matematički opisuje odnos fizikalno-kemijskih svojstava nekog spoja i njezine biološke aktivnosti. Taj se model uspješno koristi i za predviđanje kancerogenosti i mutagenosti bilo koje molekule (Doke i Dhawale, 2015; Cheluvappa i sur., 2017).

In silico metode uglavnom se primjenjuju za pred-klinička ispitivanja lijekova. Unatoč brzom napretku u tom polju, prihvaćanje ovakvih testova od strane regulatornih tijela sporo napreduje. *In silico* analiza nije nužna niti obavezna kod podnošenja procjene toksičnosti. Ipak, predviđanja na temelju QSAR tehnologije koriste se rutinski za dobivanje podataka potrebnih u procjeni toksičnosti kad je eksperimentalno dobivanje tih podataka dugotrajno i skupo. Prednosti su: mogućnost smanjenja korištenja životinja u pred-kliničkim ispitivanjima, niska cijena, kraće trajanje, mogućnost ispitivanja velikog broja spojeva, standardizacija metoda, procjena fizikalno-kemijskih svojstava netopivih i reaktivnih spojeva, te predviđanje ekotoksikološkog rizika. Osim toga, pruža se mogućnost uočavanja složenih odnosa zbog obrade velikih skupova podataka. Nedostaci su komplicirano tumačenje dobivenih podataka, nepouzdana predviđanja, teško shvaćanje rezultata nestručnjacima, nemogućnost jasnog

definiranja koji su rezultati prihvatljivi i nedostatan ispitivanje metabolita spojeva (Ford, 2016; Cheluvappa i sur., 2017).

Razvoj *in silico* modela kojima je cilj otkrivanje moguće mutagenosti nekih spojeva započeo je sredinom XX stoljeća, a ubrzao se u proteklih desetak godina. Princip je baziran na analizi velikog broja dostupnih podataka o provedenim Amesovim testovima za ispitivanje mutagenosti pomoću bakterije *Salmonella typhimurium*. Najčešće korišteni programi su: TOPKAT (engl. *TOxicity Prediction by Komputer Assisted Technology*), MCASE (engl. *Multiple Computer Automated Structure Evaluation*), *Derek Nexus* i *Leadscope*. Postižu sličnu točnost kao i Amesov test (85 %). Pojava hepatotoksičnosti može se predvidjeti *in silico* modelima, čak i u slučajevima kada *in vivo* testovi nisu uspjeli identificirati znakove hepatotoksičnosti. Osim *in vitro* testova, *in silico* modeli mogu poslužiti kao alternativa *Draize* testu očne iritacije koji se provodi na kunićima (Ford, 2016). *In silico* modeli se mogu koristiti i u procjeni toksičnosti za testove preosjetljivosti kože. Upotreba *in silico* modela u procjeni kancerogenosti nije se pokazala preciznom kao u drugim poljima, ali se nekim modelima ove vrste uspjelo postići razlikovanje genotoksičnih od negenotoksičnih kancerogena (Ford, 2016).

2.2.5. Ograničenja alternativnih testova toksičnosti

In vitro i *in silico* istraživanja se sve češće koriste, ali ne mogu u potpunosti zamijeniti testove na životinjama. Apsolutna zamjena životinja za testove systemske toksičnosti zahtijeva poznavanje i razumijevanje svih staničnih i molekularnih događaja i puteva koji bi mogli dovesti do negativnog ishoda, kao i točan mehanizam apsorpcije, distribucije, biotransformacija i izlučivanja. Glavna prepreka svim alternativnim testovima toksičnosti je nedovoljno precizno oponašanje složenih bioloških sustava, odnosno organizama. Iako je ostvaren napredak te je moguće oponašati određene organe, ili organe izvađene iz životinja održavati u *in vitro* uvjetima, potrebno je dodatno usavršavanje ovih tehnika kako bi modeli postali prikladniji (Stokes, 2015).

Mnoge pokusne životinje služe kao modelni organizmi za toksikološka istraživanja jer imaju slične biološke značajke čovjeku. Međutim, specifičan toksični učinak nekih kemikalija na životinji ne mora se javiti i kod čovjeka. Zbog toga neki testovi toksičnosti mogu biti odbačeni uslijed bioloških razlika ljudi i pokusnih životinja, primjer takvog spoja je talidomid na koji su štakori kao vrsta otporni, a ljudski fetusi pokazuju osjetljivost. Moguća je i pojava toksičnog odgovora na neku tvar kod životinje do koje kod čovjeka neće doći (Krewski i sur., 2010; Stokes, 2015). Iako postoje testovi genotoksičnosti koji se provode na bakterijama kao testovi

probira, *in vitro* testovi nisu uvijek sigurni za istraživanje mutagenosti i karcinogenosti. Mogu proizvesti lažne rezultate pa se više koriste za istraživanja kojima je cilj bolje upoznavanje procesa mutageneze i karcinogeneze, nego za same testove koji bi zamijenili životinje (Robinson i Jennings, 2004). Kako bi se prebrodile prepreke koje predstavlja biološka različitost ljudi i životinja, trebale bi se u što većoj mjeri koristiti humane stanice jer sustavi koji se baziraju na njima mogu poslužiti kao bolji modeli za biološki odgovor od onih u različitim vrstama životinja (Robinson i Jennings, 2004; Krewski i sur., 2010).

Iako regulatorna tijela prihvaćaju brojne alternativne metode ispitivanja, one uglavnom nisu u širokoj primjeni. Alternativne metode se validiraju i odobravaju, ali se uz njih i dalje koristi velik broj životinja. Uvođenje novih tehnologija uključuje razvoj sustava metoda, validaciju tih metoda od strane nacionalnih, ali i međunarodnih regulatornih tijela. Validacija je neophodna, ali produljuje i poskupljuje proces prelaska na alternativne metode (Festing i Wilkinson, 2007). Na putu do provedbe potpune prihvaćenosti neke alternativne metode potrebno je prevladati nekoliko prepreka. Prva je prepreka za industriju rizik prihvaćanja podataka dobivenih tom alternativnom metodom od strane nadležnog regulatornog tijela. Druga je prepreka vezana uz korištenje međunarodno prihvaćenih alternativnih testova, budući da je potrebno provoditi ispitivanje u skladu s propisima svih zemalja u koje će se konačni proizvod izvoziti. Treća je prepreka slaba upoznatost osoblja u regulatornim tijelima s prihvaćenim alternativnim metodama, zbog čega je veća vjerojatnost da neće sugerirati razmatranje alternativne metode u slučajevima kada je to prihvatljivo. Neke alternativne metode su ipak uvedene u smjernice, što je ključni korak u postupku prihvaćanja alternativnih metoda i tendenciji da zamijene *in vivo* metode (Stokes, 2015).

2.3. ISPITIVANJE DERMALNE TOKSIČNOSTI I KOŽNE PREOSJETLJIVOSTI TRADICIONALNIM I ALTERNATIVNIM METODAMA

Koža je najveći organ u ljudskom tijelu te ima ulogu barijere između organizma i njegovog okoliša. Od velikog broja toksikanata s kojima dolazi u dodir, propusna je za malen dio. Dermalna toksičnost je toksični učinak neke tvari nakon kontakta s kožom ljudi ili životinja (ECHA, 2017). Može se ispitivati na životinjama te se rezultati tih istraživanja mogu primijeniti na ljude zbog sličnosti kože u ljudi i životinja, unatoč razlikama u građi i apsorpciji toksikanata. Ispitivanje dermalne toksičnosti najčešće se provodi na glodavcima čija se koža razlikuje od ljudske po tome što mišićni sloj ima utjecaj na zatvaranje rana (kod ljudi tu ulogu imaju keratinociti), različita je i lokalizacija melanocita, prekrivenost površine kože dlakama i





imunosti sustav kože. Za ispitivanje se mogu koristiti svinje koje imaju sličniju histološku strukturu, anatomiju, biokemijska svojstva i fiziologiju ljudima od glodavaca, ali i jednostavnije životinje poput zebraste ribice čija koža ima mnoge sličnosti s ljudskom kožom, a uzgoj je lakši od uzgoja sisavaca (Avcı i sur., 2013; Dellambra i sur., 2019). Osim ispitivanja na životinjama koriste se i mnogi alternativni testovi koji ne uključuju životinje u svrhu testiranja dermalne toksičnosti. U ovom su poglavlju definirane neke od metoda ispitivanja toksičnosti, razmotrena su pitanja etičke prihvatljivosti tih testova te razlozi i smjer razvoja novih alternativnih testova.

2.3.1. Akutna dermalna toksičnost i klasifikacija dermalnih toksikanata

S obzirom na trajanje i izloženost potencijalnim toksikantima dermalna toksičnost se dijeli na četiri skupine: akutnu, subakutnu, subkroničnu i kroničnu. Akutna izloženost odnosi se na izloženost toksikantu u trajanju do 24 sata, subakutna do jedan mjesec, subkronična od 1 do 3 mjeseca, a kronična kroz period dulji od 3 mjeseca. Osim akutne, ostale se izloženosti odnose na ponovljenu izloženost, dok je akutna izloženost jednokratna (Eaton i Gilbert., 2013). Akutna toksičnost odnosi se na ozbiljne štetne zdravstvene učinke koji se javljaju nakon pojedinačne ili kratkoročne oralne, dermalne ili inhalacijske izloženosti tvari ili smjese (Avcı i sur., 2013; Eaton i Gilbert., 2013; ECHA, 2017).

Za dermalnu toksičnost se izloženost izražava u mg po kg tjelesne mase ($\text{mg kg}^{-1} \text{ t.m.}$). Tvari, prema toksičnosti, svrstavamo u 5 kategorija. Prvu kategoriju čine najtoksičnije tvari koje mogu izazvati letalni efekt u niskim dozama, a petu kategoriju tvari s najmanjom toksičnošću. Akutna toksičnost izražava se kao ATE (engl. *Acute Toxicity Estimate*). Vrijednosti ATE dobivaju se testiranjem toksičnosti za kategorije 1, 2, 3 i 4. Za spojeve iz kategorije 5 ATE vrijednosti se određuju na temelju pouzdanih nalaza koji ukazuju da postoji toksičnost u tom rasponu. Mogu se odrediti i ekstrapolacijom, procjenom ili na osnovu ATE vrijednosti iz kategorija 1 - 4. Ukoliko ATE vrijednost nije poznata, vrijednost akutne toksičnosti može se procijeniti pomoću odgovarajuće formule čime se dobiva vrijednost cATpE (engl. *converted Acute Toxicity point Estimate*). Vrijednosti ATE i cATpE po kategorijama za dermalnu toksičnost prikazane su u tablici 1 (ECHA, 2017).

Tablica 1: Kategorizacija tvari obzirom na akutnu dermalnu toksičnost (prema ECHA, 2017).

	Kategorija 1	Kategorija 2	Kategorija 3	Kategorija 4	Kategorija 5
ATE^a (mg kg⁻¹ t.m.)	ATE ≤ 50	50 < ATE ≤ 200	200 < ATE ≤ 1000	1000 < ATE ≤ 2000	2000 < ATE ≤ 5000
cATpE^b (mg kg⁻¹ t.m.)	5	50	300	1100	2500
Značenje	Letalna ukoliko dođe u kontakt s kožom	Letalna ukoliko dođe u kontakt s kožom	Toksična ukoliko dođe u kontakt s kožom	Štetna ukoliko dođe u kontakt s kožom	Može biti štetna ukoliko dođe u kontakt s kožom
Grafička oznaka					Nema grafičke oznake
^a vrijednost akutne toksičnosti, odnosno doze pri kojoj je tvar ili smjesa letalna (engl. <i>Acute Toxicity Estimate</i>) ^b procijenjena vrijednost dermalne akutne toksičnosti za tvari kojima nije izmjerena vrijednost akutne toksičnosti (engl. <i>converted Acute Toxicity point Estimate</i>)					

2.3.2. Testiranje dermalne toksičnosti

Dermalna toksičnost može se testirati *in vivo* ili alternativnim testovima. Za određivanje dermalne toksičnosti i provođenje odgovarajuće kategorizacije toksikanata mogu poslužiti sljedeći izvori: podatci ispitivanja dobiveni epikutanim testom - jednim od najstarijih dijagnostičkih postupaka u dermatologiji, rezultati epidemioloških studija koji pokazuju pojavu kontaktnog dermatitisa nakon izlaganja nekom spoju, podatci iz testiranja na životinjama ili ljudima i dobro dokumentirani slučajevi alergijskog kontaktnog dermatitisa iz klinika. Podatci dobiveni na temelju testiranja na životinjama su pouzdaniji od podataka dobivenih na temelju slučajne izloženosti ljudi (ECHA, 2017).

2.3.3. *In vivo* testiranje dermalne toksičnosti

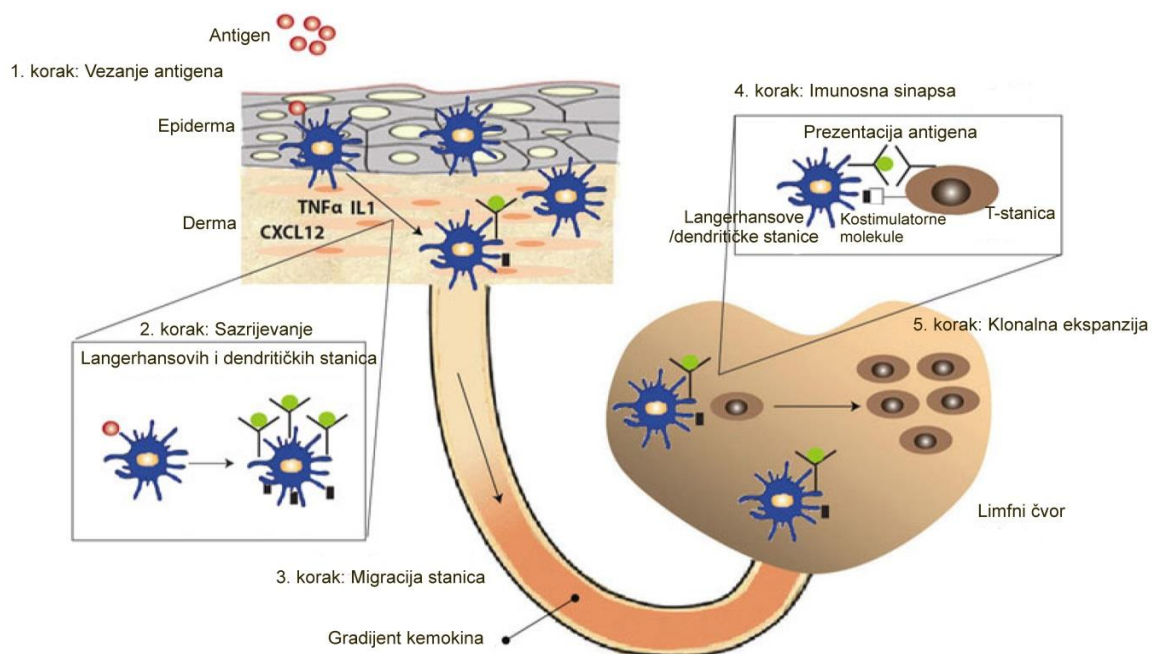
Kod *in vivo* testiranja dermalne toksičnosti kao modelni organizmi najčešće se koriste zečevi, zamorci i miševi. Britvom se na određenom mjestu na koži ukloni krzno te se nanese sloj ispitivane tvari, omota plastičnim materijalom i ostavi 24 sata. Nakon 24 sata, uklanja se plastični materijal, koža glodavca se briše kako bi se odstranio ostatak ispitivane tvari i promatraju se životinje kroz 14 dana kako bi se utvrdila toksičnost. Postupak se provodi za više koncentracija, a ukoliko nema vidljive toksičnosti pri koncentracijama od 2 g kg⁻¹ t. m. prestaje se s provođenjem testova toksičnosti (Eaton i Gilbert, 2013; Ford, 2016). Nedostaci ovih testova

su etička pitanja vezana uz nelagodu, patnju i bol životinja, nepotpuna podudarnost ljudske i životinjske kože zbog koje se dobiveni podaci moraju ekstrapolirati na ljudsku kožu (Ford, 2016; Dellambra i sur., 2019).

2.3.4. Testiranje kožne preosjetljivosti

Jedan od štetnih učinaka koji može nastati kao rezultat izloženosti kože potencijalno toksičnim tvarima je kontaktna osjetljivost, koja se klinički manifestira kao alergijski kontaktni dermatitis (ACD, engl. *Allergic Contact Dermatitis*). 15 - 20 % ljudi u nekom trenutku života ima reakciju kožne preosjetljivosti, odnosno razvije alergijski kontaktni dermatitis. Senzibilizator kože je tvar ili smjesa koja će izazvati alergijsku reakciju nakon kontakta s kožom. Testiranjem preosjetljivosti kože utvrđuje se mogućnost da kemikalija uzrokuje alergijski kontaktni dermatitis, lokalnu kožnu reakciju koju karakterizira crvenilo, otekline i svrbež (ECHA, 2017).

Kako bi došlo do alergijske reakcije, senzibilizator mora prodrijeti u kožu i reagirati s endogenim proteinima. Nakon što prodre u kožu, dolazi do aktivacije imunskog odgovora kože (Sharma i sur., 2012). Imunosni odgovor na alergen rezultat je niza događaja prikazanih na slici 6.



Slika 6. Mehanizam alergijske reakcije na antigen u koži (prema Sharma i sur., 2012)

Ekspozicija kože alergenu dovodi do sazrijevanja Langerhansovih dendritičkih stanica te njihove migracije do limfnog čvora. Aktivacija i migracija dendritičkih stanica je regulirana mnogobrojnim faktorima uključujući kemokine i citokine koje luče različite u koži prisutne

stanice. Dendritičke stanice unose antigene, prenose ih do limfnih čvorova te prerađene peptide predočuju T stanicama. Smatra se da je migracija do limfnog čvora regulirana gradijentom kemokina CCL19 i/ili CCL21 kroz limfnu žilu. Dendritičke stanice su glavne u transportu antigena do limfnog čvora gdje dolazi do formiranja imunoloških sinapsi s T-stanicama što dovodi do njihove aktivacije. Aktivirane T-stanice zatim diferenciraju i proliferiraju što rezultira selektivnom ekspanzijom klonalne populacije alergen specifičnih T limfocita (Sharma i sur., 2012; Dellambra i sur., 2019).

Kod testiranja preosjetljivosti kože ispituje se jedan od četiri ključna događaja tijekom reakcije na senzibilizator. Prvi ključni događaj je molekularna inicijacija, odnosno kovalentno vezanje spoja na peptide u koži. Senzibilizator se veže na tiolnu skupinu cisteinskog ostatka ili primarnu aminoskupinu lizinskog ostatka (OECD, 2014). Ključni događaj 2 je izlučivanje citokina i kemokina u keratinocitima. Ovaj se korak u nekim metodama ispituje uz pomoć Nrf2 (engl. *Nuclear erythroid 2-related factor 2*) signalnog puta kojeg aktiviraju elektrofilni ili antioksidansi. Nrf2 je transkripcijski faktor koji, kada je aktivan, inicira transkripciju gena koji kodiraju za proteine uključene u imunski odgovor na senzibilizator. Nrf2 je pod negativnom kontrolom proteina Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Kad je senzibilizator vezan na Keap1 protein, nema inhibicije Nrf2, već je Nrf2 slobodan i može djelovati kao transkripcijski faktor. Kao rezultat kaskade reakcija uzrokovanih senzibilizatorom, dolazi do vezanja transkripcijskog faktora Nrf2 na DNA sekvencu koja je *response element* za taj elektrofil (EpRE, engl. *Electrophile Response Element*) ili antioksidans (ARE, engl. *Antioxidant Response Element*). Vezanjem Nrf2 na ARE/EpRE aktiviraju se ARE/EpRE-ovisni putevi i dolazi do inicijacije transkripcije gena povezanih s odgovorom na oksidacijski stres. Nrf2 put je jedan od molekularnih markera u ispitivanju preosjetljivosti kože. Ekspresija gena ARE/EpRE-ovisnih puteva i drugih citoprotektivnih gena je pokazatelj da je došlo do imunski reakcije na senzibilizator. Neki *in vitro* testovi detektiraju potencijalne senzibilizatore kože na temelju ovog događaja, odnosno aktivacije ARE/EpRE-ovisnih puteva (OECD, 2014; Natsch i Emter, 2015), što je objašnjeno u poglavlju 2.3.5.1. Ključni događaj 3 je sazrijevanje dendritičkih stanica i njihovo putovanje do limfnog čvora. Ključni događaj 4 je predočenje antigena nativnim T stanicama i proliferacija memorijskih stanica. Nakon predočenja senzibilizatora kao antigena, T stanice ih prepoznaju kao strane peptide, dolazi do njihove aktivacije te nastaju memorijske T stanice. Memorijske stanice proliferiraju i induciraju alergijski kontaktni dermatitis ukoliko se ponovno aktiviraju predočenjem tog antigena (OECD, 2014). Zasad niti jedan *in vitro* test ne otkriva senzibilizator kože na temelju događaja 4.

Elicitacijska faza je faza u kojoj se javlja odgovor na antigen kao alergijski odgovor, primjerice crvenilo i oticanje, a taj događaj služi za detektiranje senzibilizatora u nekim *in vivo* testovima. Preosjetljivost kože izaziva čitav niz tvari različitih fizikalno-kemijskih svojstava, različitog načina prodora u kožu i mehanizama toksičnosti. Zbog te različitosti ne postoji jedinstven test kojim bi se mogao odrediti potencijal neke tvari da bude senzibilizator kože. Općenito, testove možemo podijeliti u dvije skupine: *in vivo* testove kožne preosjetljivosti i alternativne testove. *In vivo* testovi najčešće koriste zamorce ili miševе, a pod pojmom „alternativni testovi“ se podrazumijevaju testovi koji ne uključuju pokusne životinje (Eaton i Gilbert, 2013).

2.3.4.1. *In vivo* testovi kožne preosjetljivosti

Tri najčešće korištena *in vivo* testa za određivanje je li neka tvar senzibilizator kože ili nije su Buehlerov test, maksimizacijski test sa zamorcima (GPMT, engl. *Guinea Pig Maximization Test*) i lokalna analiza limfnih čvorova miševa (LLNA, engl. *Local Lymph Node Assay*) (Daniel i sur., 2018). Kod nekih se testova koriste adjuvansi, a kod nekih nema adjuvansa. Dodavanjem adjuvansa pojačava se alergijska reakcija te se koriste za testiranje tvari koje bi izazvale slabiju reakciju i smatraju se točnijima. Primjer takvog testa je maksimizacijski test sa zamorcima (Eaton i Gilbert, 2013, Kaplan i sur., 2013).

Buehlerov test za ispitivanje kožne preosjetljivosti je pogodan za ispitivanje lokalne preosjetljivosti. Za ispitivanje se koriste albino zamorci, mužjaci ili ženke koje nisu imale potomstvo i nisu skotne, a potrebno je minimalno 30 životinja (20 za ispitivanu i 10 za kontrolnu skupinu). Ispitivana tvar se nanosi na obrijanu kožu boka zamorca te se prekriva zavojem kroz period od 6 sati. Postupak se ponavlja za 7 i 14 dana. Nakon 28 dana se na isti način nanosi na drugi bok, prekriva zavojem i ostavlja kroz 24 sata. 24 i 48 sati nakon skidanja zavoja, životinja se uspoređuje s testnom u vidu pojave crvenila i oticanja. U Buehlerovom testu se ne koriste adjuvansi (Kaplan i sur., 2013).

Maksimizacijski test sa zamorcima – GPMT je metoda za utvrđivanje potencijalnog senzibilizatora kože testiranjem kemijskih spojeva na koži zamorca. GPMT se smatra najprimjerenijom tehnikom u kojoj se koristi adjuvans (Kaplan i sur., 2013). Metoda ovog testa je slična Buehlerovom testu, osim što se ispitivana tvar unosi intradermalnom injekcijom i dodaje se adjuvans te se životinja tretira na području ramena i boka. Mogu se koristiti mužjaci ili ženke (koje nisu imale potomstvo i nisu skotne) albino zamoraca, njih 10 za ispitivanu i 5 za kontrolnu skupinu (OECD, 1992). Protokol GPMT metode uključuje tretiranje intradermalnim injekcijama u području ramena na način da se sa svake strane životinje (lijevo i desno rame) na kožu kojoj je odstranjena dlaka intradermalno ubrizgavaju po tri injekcije u 0. danu testiranja.

Od tri injekcije, jedna sadrži mješavinu jednakih volumena vode i adjuvansa, druga ispitivanu tvar, a treća ispitivanu tvar u mješavini jednakih volumena otapala i adjuvansa. Ukoliko nakon 48 sati ne dođe do pojave iritacije, ispitivano područje se topikalno tretira s 0,5 mL 10 %ne otopine natrijevog lauril sulfata u vazelinu, u periodu od 24 sata, kako bi se potaknula blaga upalna reakcija. Na 6. do 8. dan testa životinjama se ponovo odstranjuje dlaka te se tretiraju ispitivanom kemikalijom topikalno, također na području ramena, nanošenjem krpice natopljene ispitivanom tvari na kožu i prekrivanjem okluzivnim oblogom. Taj tretman traje 48 sati. 20. do 22. dana testiranja ispitivana tvar se topikalno nanosi natopljenom krpicom na područje slabina kojem je odstranjena dlaka, te se prekriva okluzivnim oblogom kroz 24 sata. Kontrolna se skupina tretira injekcijama koje umjesto ispitivane kemikalije sadrže samo medij u kojem se ispitivana kemikalija kod testne skupine otapa, a kod topikalnog nanošenja se stavlja krpica natopljena medijem i okluzivni oblog. Znakovi pojave crvenila i oteklina se ispituju nakon skidanja obloga te se bilježe u skladu s propisanom ljestvicom ocjenjivanja koju su ustanovili Magnusson i Kligman, autori ove metode. Ljestvica ocjenjuje pojave na koži od 0 (nema promjene na koži) do 3 (intenzivno crvenilo i oticanje) (OECD, 1992).

Krajnje točke Buehlerovog i GPMT testa su vizualno primjećivanje pojave edema (oteklina) i eritema (crvenila) te mogu biti subjektivne. Zbog toga se teško može procijeniti toksičnost tvari koje potiču iritaciju. Ukoliko su GPMT ili Buehlerovim testom dobiveni pozitivni rezultati, ispitivani spoj se proglašava senzibilizatorom. Ukoliko su rezultati negativni, ne proglašava se ne-senzibilizatorom, već se provode drugi testovi (OECD, 1992; Kaplan i sur., 2013).

Lokalna analiza limfnih čvorova miševa – LLNA je *in vivo test* razvijen kao alternativa za navedena dva testa sa zamorcima. Ispitivane životinje su miševi soja CBA/Ca ili CBA/J (ili nekog drugog soja ukoliko postoji dovoljno podataka da nema razlika u reakciji s obzirom na soj), najčešće ženke starosti 8 - 12 tjedana. Po jednoj doznoj skupini koriste se najmanje četiri životinje, a istraživanje se provodi s najmanje tri koncentracije ispitivane tvari uz paralelnu negativnu kontrolnu skupinu tretiranu samo nosačem za ispitivanu tvar i jednu pozitivnu kontrolnu skupinu (Kimber, 2002; Kaplan i sur., 2013).

Tijekom indukcijske faze kod izazivanja preosjetljivosti kože, dolazi do ugradnje ³H-timidina u limfocite koji proliferiraju unutar proksimalnog limfnog čvora. Životinjama se topikalno nanosi ispitivana tvar na uši tri dana za redom (0., 1. i 2. dan testa). Nakon toga odmaraju 2 dana te im se na 5. dan testa intravenozno unosi doza ³H-timidina od 20 μCi (0,74 MBq) u otopini 250 μL fosfatnog pufera. Nakon pet sati, životinje se žrtvuju i sekcijom limfnog čvora iz uha se dobiva suspenzija za ispitivanje količine ugrađenog ³H-timidina. Tvar se proglašava

senzibilizatorom ukoliko je došlo do povećanja koncentracije ³H-timidina tri puta u odnosu na kontrolnu skupinu (Kimber, 2002; EC, 2012).

Prednosti LLNA u odnosu na Buehlerov i GMPT test su manji broj i patnja životinja te dobivanje kvantitativnih vrijednosti i podataka o odnosu doze i odgovora. Dobivanje kvantitativnih vrijednosti je bitno jer se dobiveni podatci mogu lakše statistički obrađivati i uspoređivati, a podaci dobiveni LLNA testovima se često koriste u *in silico* određivanju potencijalnih senzibilizatora kože. Nedostatak su lažno negativni rezultati kod određenih metala i lažno pozitivni rezultati kod nekih površinski aktivnih tvari koje nadražuju kožu. Iako je LLNA također *in vivo* metoda koja ne isključuje u potpunosti korištenje životinja, smatra se etički prihvatljivijom od GPMT i Buehlerovog testa zato što se koristi manji broj životinja te je mogućnost da životinje osjećaju bol i patnju manja. Test se temelji na promatranju ranijeg događaja tijekom reakcije preosjetljivosti koji ne izaziva nelagodu poput otekline i crvenila. Rezultati ispitivanja LLNA testom su jednakovrijedni rezultatima Buehlerovog ili GPMT testa te se ovaj test obično može koristiti kao alternativa bez dodatne potvrde rezultata. Nedostatak LLNA testa je što teško detektira alergnost nikla jer je kod miševa alergijska reakcija na niklov sulfat i klorid slaba. Nikal je slab alergen, ali je njegova rasprostranjenost velika zbog čega je čest alergen (Kimber i sur., 2002; EC, 2012; Kaplan i sur., 2013).

2.3.4.2. Alternativni testovi za testiranje kožne preosjetljivosti

Kako bi se postigle uštede u vremenu i cijeni testiranja te smanjilo korištenje laboratorijskih životinja, razvijeni su mnogi alternativni testovi za testiranje kožne preosjetljivosti, kao npr. *in vitro* i *in silico* metode. Alternativne metode često omogućuju bržu i efikasniju procjenu toksičnosti u odnosu na *in vivo* metode. Mnogi testovi bez životinja su razvijeni zbog napretka istraživanja u kozmetičkoj industriji, odnosno za ispitivanje i kontrolu kozmetičkih proizvoda i njihovih sastojaka. Tkivnim inženjerstvom su razvijeni ekvivalenti ljudske kože koji mogu oponašati ključna strukturna i funkcionalna svojstva kože, ali *in vitro*. Modeli ekvivalenata kože se razvijaju unazad 30 - 40 godina te su obećavajući alat koji sve više zamjenjuje testove na životinjama (Urbisch i sur., 2015; Dellambra i sur., 2019).

Postoje četiri osnovna pristupa u ispitivanju preosjetljivosti kože koji izbjegavaju korištenje životinja, a to su: 2D kulture stanica, 3D konstrukti, *in silico* modeli i integrirane mikrofluidičke platforme. Neki od alternativnih testova odobrenih od strane ECVAM-a (engl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*) su DPRA (engl. *Direct Peptide Reactivity Assay*), ADRA (engl. *Amino Acid Derivative Reactivity Assay*), h-CLAT (engl. *human Cell*

Line Activation Test), U-SENSTM (engl. *U937 cell line activation test*), IL-8 Luc test (engl. *InterLeukine-8 reporter gene assay*), KeratinoSensTM i LuSens (Thélu i sur., 2020).

2.3.5. Kulture stanica u ispitivanju dermalne toksičnosti

Kulture stanica u ispitivanju dermalne toksičnosti čine stanice koje predstavljaju ekvivalent koži ili nekim komponentama kože koje sudjeluju u imunosnom odgovoru. Prvo je *in vitro* rekonstruiran epidermis. Prvi alati za konstruiranje *in vitro* kože bili su keratinociti izolirani biopsijom i propagirani *in vitro*. Na taj su način rekonstruirani slojevi epitela koji zadržavaju biokemijske i histološke karakteristike i svojstvo diferencijacije. U idućoj su se generaciji keratinociti razvijali na matricama kako bi se bolje razvio epidermis. Međutim, kako bi dobili sva svojstva kože za ispitivanja potrebno je rekonstruirati i dermis. Zbog toga su razvijeni trodimenzionalni modeli cijele debljine kože (Dellambra i sur., 2019).

Glavnu ulogu u imunosnoj reakciji u koži imaju tri tipa stanica:

- keratinociti,
- dendritičke stanice koje prezentiraju antigen i
- T stanice koje sudjeluju u aktivaciji imunosnog odgovora.

Interakcija između ova tri tipa stanica u živom tkivu je bitna za pravilno odvijanje svih događaja u aktivaciji imunosnog odgovora (Thélu i sur., 2020).

2.3.5.1. 2D kulture stanica

Prvi *in vitro* eksperimenti provedeni su na kulturama stanica u monosloju u Petrijevoj zdjelici, odnosno 2D modelima. Najčešće se radi o keratinocitima ili dendritičkim stanicama. Ukoliko se za potrebe *in vitro* testiranja kožne preosjetljivosti uspostavlja nova stanična linija humanih stanica, za to je potrebno dobiti etičko odobrenje (Bal-Price i Coecke, 2011). Međutim, većina odobrenih metoda koristi stanične linije humanih stanica koje su uspostavljene prije nekoliko desetaka godina pa se korištenje takvih stanica za potrebe ispitivanja toksičnosti smatra etički prihvatljivim, budući da ne zahtjeva dobivanje novih stanica iz tkiva. Neke stanične linije dendritičkih stanica koje se koriste u ispitivanju kožne preosjetljivosti navedene su u tablici 2.

2D modeli se lakše i brže pripremaju od 3D modela, imaju veću reproducibilnost i stanice se mogu lako gledati mikroskopom. Nedostatak u odnosu na 3D modele je što stanice rastu u jednom sloju pa im je ograničen rast i međustanični kontakt jer je većini stanica glavna kontaktna površina posude u kojem se uzgajaju. Tako uzgojene stanice imaju manju funkcionalnost, slabiju opskrbu kisikom i drugim nutrijentima te teško mogu rasti u kulturama (Sharma i sur., 2012; Eskes i sur., 2017).

h-CLAT je test koji koristi *in vitro* stanične kulture za ispitivanje toksičnosti ksenobiotika. Pokazao se uspješnim za ispitivanje kožne preosjetljivosti. Test se zasniva na mjerenju fenotipskih promjena u stanicama 24 sata nakon tretmana ispitivanom kemikalijom. Test ima preciznost od 96 % te je interlaboratorijski reproducibilan. Većina rezultata dobivenih ovim testom podudara se s rezultatima dobivenim LLNA testom (Ashikaga i sur., 2008; Natsch i Emter, 2015). Usprkos podudaranju, samostalno ne može zamijeniti *in vivo* testove kožne preosjetljivosti, već se može primijeniti samo u kombinaciji s drugim alternativnim testovima, primjerice DPRA ili KeratinoSens™ kako bi dobili potpunu i točnu sliku (EC, 2017a).

Tablica 2. Humane stanične linije dendritičkih stanica koje se najčešće koriste za testiranje kožne preosjetljivosti. (prema Thélou i sur., 2020)

Stanična linija	Naziv stanične linije (engl.)	Tip stanica
MUTZ-3	<i>CD34+ human acute myeloid leukemia cell line</i>	Linija CD34+ stanica akutne mijeloidne leukemije
U-937	<i>human histiocytic lymphoma cell line</i>	Stanična linija histiocitnog limfoma
THP-1	<i>human monocytic leukemia cell line</i>	Stanična linija monocitne leukemije
KG-1	<i>human bone marrow-derived acute myelogenous leukemia cell line</i>	Stanična linija akutne mijeloidne leukemije, iz koštane srži
HL- 60	<i>human acute pro-myeloid leukemia cell line</i>	Stanična linija akutne pro-mijeloidne leukemije
K562	<i>human erythroleukemia cell line</i>	Stanična linija eritroleukemije

Metode KeratinoSens™ i LuSens koriste genetski modificirane stanične linije keratinocita, a razvijene su za ispitivanje kožne preosjetljivosti. Princip metode je prepoznavanje senzibilizatora kože na temelju aktivacije Nrf2/ARE citoprotektivnog puta u keratinocitima (Thélou i sur., 2020). Aktivacija Nrf2/ARE kaskade reakcija može se detektirati tako da se u genom stanica insertiraju konstrukti reporter gena (npr. gena za luciferazu) pod kontrolom ARE elementa. Mjerenjem aktivnosti reporter gena nakon inkubacije stanica testiranim ksenobiotikom dobivaju se rezultati na temelju kojih se može zaključiti je li ispitivana kemikalija senzibilizator ili ne-senzibilizator. Ukoliko je detektirana aktivnost reporter gena nakon tretmana ispitivanom kemikalijom znači da je došlo do aktivacije Nrf2/ARE kaskade reakcija, odnosno ispitivana kemikalija je potaknula imunski odgovor. Aktivacijom Nrf2/ARE

puta došlo je do aktivacije transkripcije reporter gena koja se može mjeriti. Primjerice, ukoliko je kao reporter gen ugrađen gen za luciferazu, ekspresija gena se mjeri luminometrijom (Ramirez i sur., 2014; Dellambra i sur., 2019; Cho i sur., 2020). Kod stanične linije koja se koristi u KeratinoSens™ metodi kao reporter gen ugrađen je gen za luciferazu pod kontrolom gena *AKR1C2* dobivenog iz humanih stanica, a kod LuSens metode ima ugrađenu *NQO1* sekvencu dobivenu iz stanica štakora (Natsch i Emter, 2015). IL-8 Luc test se provodi na staničnoj liniji koja ima ugrađene gene za luciferaze: *SLO* (engl. *Stable Luciferase Orange*) i *SLR* (engl. *Stable Luciferase Red*) (Kimura i sur., 2018).

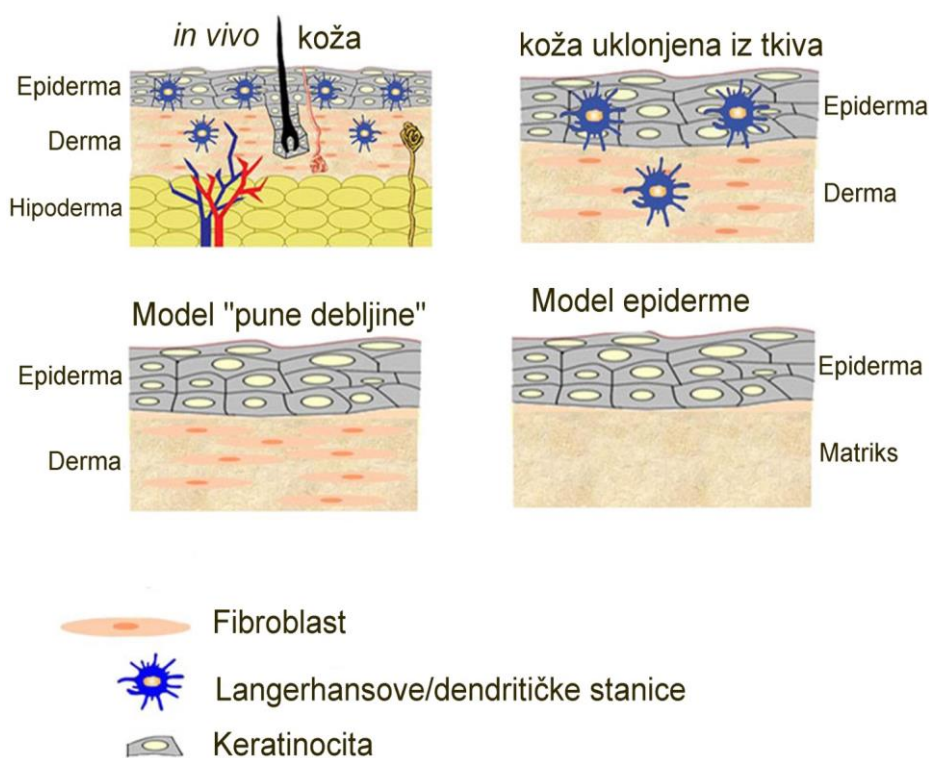
2.3.5.2. 3D konstrukti

3D modeli epidermisa, odnosno rekonstruirani modeli ljudskog epidermisa (RhE, engl. *Reconstructed human Epidermis*) dobivaju se uzgojem primarnih keratinocita na dermisu bez epidermisa ili na biorazgradivim polimernim supstratima (hijaluronska kiselina, fibrin, kolagen, silk-kolagen ili hidrogelovi) s inkorporiranim ljudskim fibroblastima iz dermisa. Tkivo se izlaže granici faza zraka i tekućine te se tako potiče diferencijacija i stratifikacija epidermisa. Modeli pune debljine kože su sastavljeni od RhE modela na dermalnom odjeljku naseljenom fibroblastom u koji mogu biti ugrađeni i ostali tipovi stanica, kao što su npr. melanociti i stanice imunskog sustava (Dellambra i sur., 2019; Thélu i sur., 2020).

3D modeli kože su biološki sustavi kultura stanica tkiva u kojima stanice rastu u više slojeva. Takvi složeniji modeli bolje oponašaju *in vivo* kožu jer je obuhvaćen veći broj događaja koji se odvijaju tijekom imunskih reakcija. Stanice imaju bolju funkcionalnost i međusobnu interakciju. Zbog funkcionalnosti preživljavanje stanica je veće, a većom gustoćom i interakcijama postiže se struktura koja može oponašati prirodnu gustoću stanica u tkivu ili organu. Smanjen je kontakt stanica s podlogom na kojoj rastu, manja je ograničenost prostorom zbog mogućnosti rasta u više slojeva, stanice imaju bolju opskrbu kisikom i drugim nutrijentima te mogu rasti u tekućem mediju. Podloga na kojoj rastu stanice mora omogućiti procese adhezije, proliferacije i diferencijacije i na taj način osigurava pogodno umjetno okruženje za razvoj stanica (Eskes i sur., 2017; Thélu i sur., 2020). Nedostatak je veća kompleksnost, zbog čega je manja reproducibilnost istraživanja. Zbog toga se razvijaju standardizirani sustavi za ovakve modele stanica, koji imaju određenu veličinu, strukturu i sastav, odnosno udio određenih tipova stanica u strukturi (Sharma i sur., 2012; Eskes i sur., 2017).

3D modeli kože mogu se podijeliti u tri osnovne skupine: kožu uklonjenu iz živog tkiva, modeli epidermisa dobiveni tkivnim inženjerstvom i ekvivalenti kože s punom debljinom kože. Struktura ova tri modela u usporedbi s *in vivo* kožom shematski je prikazana na slici 7. Koža

uklonjena, odnosno dobivena izolacijom iz živog tkiva je najslabija koži *in vivo* te predstavlja jednaku barijeru kao koža *in vivo*. Zadržava sve pomoćne strukture i stanice: keratinociti, melanociti, Langerhansove stanice, fibroblasti i endotelne stanice. Razlikuje se od *in vivo* kože po tome što ne sadrži krvne kapilare i živčane nastavke, folikule dlaka i masno tkivo ispod dermisa. Modeli epidermisa sadrže epidermis koji raste na matriksu, ali nema dermisa i ne sadrže sve imunosne stanice prisutne u koži *in vivo* i u koži dobivenoj iz tkiva. Ekvivalenti kože s punom debljinom kože sadrže epidermis i dermis bez ostalih stanica imunskog sustava, živčanih nastavaka i nisu prokrvljeni (Sharma i sur., 2012). Korištenje 3D modela je zbog veće sličnosti sa strukturom kože *in vivo* obećavajući pristup u prevladavanju ograničenja koja predstavljaju 2D modeli stanica (Thélu i sur., 2020).



Slika 7. Grafički prikaz poprečnog presjeka *in vivo* kože i tri 3D modela kože koji bi se mogli koristiti u ispitivanju kožne preosjetljivosti (prema Sharma i sur., 2011)

2.3.6. *In silico* modeli u ispitivanju preosjetljivosti kože i integrirane mikrofluidičke platforme

QSAR, Derek i TOPKAT sustavi su *in silico* modeli koji mogu prepoznati potencijal neke kemikalije da uzrokuje preosjetljivost kože na temelju kemijske strukture. Predviđaju toksični potencijal i mehanizme djelovanja ispitivanih tvari na temelju baza dostupnih podataka o prethodno ispitanim kemijskim spojevima, njihovim strukturama i učincima. Razvijeni su neki QSAR modeli koji objedinjuju podatke dobivene LLNA i GPMT testovima te na temelju tih

podataka procjenjuju da li bi molekule koje nisu ispitane *in vivo* testovima mogle izazvati preosjetljivost kože (Sharma i sur., 2012).

Mikrofluidičke platforme su sustavi u kojima se na površini manjoj od milimetra može ustanoviti opskrba mikroskopskog sustava tekućinom te se fino regulirati. Imaju primjenu, između ostalog, i u proizvodnji biočipova. Razvijeni su za model tzv. kože na čipu (engl. *skin-on-chip*). Jedna od primjena ovih sustava je i prijenos mikrofizioloških sustava (organa, kao što je npr. koža) na sustav na kojem će se lakše odvijati opskrba hranjivim tvarima i kontrola fizikalnih i kemijskih parametara uzgoja (Dellambra i sur., 2019). Kod ispitivanja toksičnosti na ovakvim sustavima lakše se može kontrolirati transport i apsorpcija ispitivanog ksenobiotika u uzgojeno tkivo. Osim toga, moguća je ko-kultura stanica kože s drugim kulturama. Razvijeni su mikrofluidički sustavi za rast ekvivalenata kože pune debljine koji bi se mogli koristiti za ispitivanje toksičnosti lijekova (Abaci i sur., 2015).

2.3.7. Ispitivanje mjesta vezanja proteina

Jedan od pristupa u predviđanju potencijala izazivanja kožne preosjetljivosti je ispitivanje vezanja proteina. Kemijski spoj koji je senzibilizator reagira s peptidima u keratinocitima i drugim kemijskim spojevima u koži. Većina alergena se ponaša elektrofilno pa reagiraju s nukleofilnim centrima aminokiselina te se kovalentno vežu na protein. Na temelju tog vezanja razvijeni su *in chemico* – DPRA i ADRA testovi koji se temelje na ispitivanju potencijalnih alergena s obzirom na mogućnost vezanja s peptidima u stanici koje bi moglo inducirati alergijsku reakciju. Testovi se provode na način da se tvari razrjeđuju u puferu i inkubiraju s peptidima te se HPLC-om analiziraju slobodni peptidi. Analizom slobodnih peptida može se zaključiti da li je došlo do vezanja ispitivanog spoja na peptide ili nije. Ukoliko je koncentracija slobodnih peptida manja od koncentracije prije inkubacije ispitivanom kemikalijom, znači da je dio peptida vezan na tu kemikaliju, odnosno došlo je do vezanja na proteine koje može inicirati reakciju kožne preosjetljivosti (OECD, 2020).

Kod DPRA se mjeri vezanje kemikalije na heptapeptid koji sadrži lizin (Ac-RFAAKAA-COOH) ili cistein (Ac-RFAACAACOOH). Prema protokolu, pripremaju se otopine peptida određene čistoće, razrjeđuju u puferu i inkubiraju s ispitivanom kemikalijom. Nakon inkubacije koja traje 24 sata, kromatografijom se ispituje koliko je peptida ostalo u uzorku (Urbisch i sur., 2015). Dobiveni podaci se koriste za klasifikaciju kemikalija na one s minimalnom, niskom, srednjom ili visokom reaktivnosti. Kod ADRA metode se koriste peptidi koji su derivati cisteina i lizina te imaju i naftalenski prsten. Spectro-DPRA – spektrofotometrijski DPRA je varijacija

DPRA metode koja koristi spektrofotometriju te se slobodni peptidi mjere spektrofotometrijski umjesto HPLC-om (OECD, 2020).

Testovi koji se temelje na ispitivanju mjesta vezanja proteina mogu se koristiti za ispitivanja preosjetljivosti kože samo u kombinaciji s drugim alternativnim metodama ili kao testovi probira prije provođenja *in vivo* metoda, zbog toga što ne mogu detektirati pro-haptene i pre-haptene (Sharma i sur., 2012; EC, 2017a; Dellambra i sur., 2019).

2.3.8. Usporedba ekvivalenata kože i kože kao organa

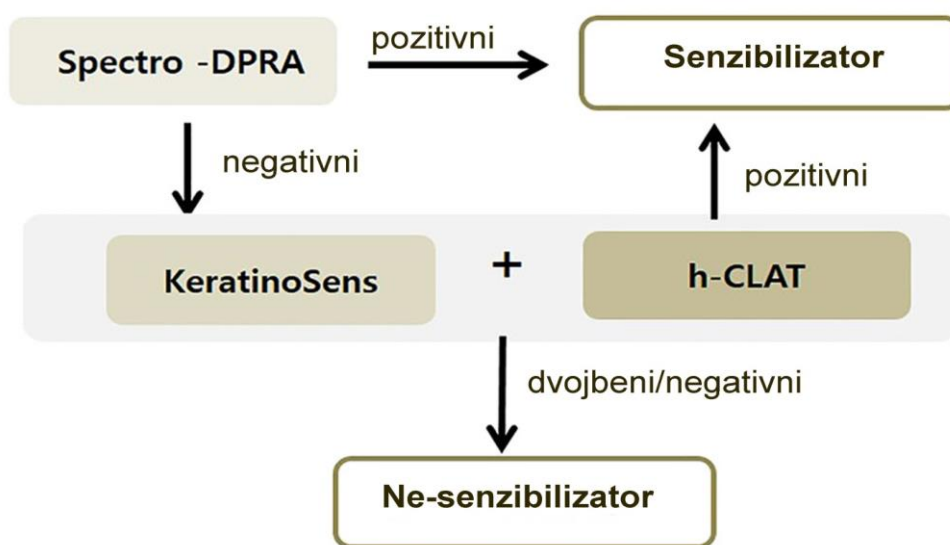
Komercijalno dostupni ekvivalenti pune debljine kože postali su alternativa životinjskim modelima za potrebe istraživanja i razvoja u kozmetičkoj industriji. Međutim, ne mogu se smatrati istovjetnima *in vivo* koži zbog toga što, unatoč usavršavanju modela, postoje neke razlike u strukturi, a time i u propusnosti te metabolizmu. Jedan od najvećih problema kod korištenja životinja kao modelnih organizama za ispitivanje dermalne toksičnosti je razlika u propusnosti između kože životinja i čovjeka. Taj problem nije prebrođen niti kod konstrukcije 2D i 3D modela kože. Ekvivalenti kože dobiveni propagacijom tkiva imaju veću permeabilnost od ljudske kože. *Stratum corneum* u 3D modelima kože ima slabiju barijeru, odnosno veću propusnost u odnosu na *in vivo* kožu zbog nesavršenosti strukturne organizacije lipida (Dellambra i sur., 2019; Thélu i sur., 2020). Nedostatak je i nepostojanje funkcionalnog sustava opskrbe krvnim žilama pa se izmjena kisika i hranjivih tvari te otpadnih tvari i produkata metabolizma provodi ručno promjenom medija, zbog čega dolazi do promjena u sastavu medija tijekom uzgoja. Ko-kultiviranje endotelnih i AdSC (matične stanice izvedene iz masnog tkiva, engl. *Adipose-derived Stem Cells*) stanica u fibrin gelovima potiče stvaranje vaskularne mreže, ali je za uzgoj takvih stanica potrebna specifična struktura pericita i mišićnih stanica koje okružuju krvne žile. Matične stanice koje imaju sposobnost diferencijacije u sve tipove stanica mogu se koristiti za proizvodnju ekvivalenata kože u punoj debljini. S fibroblastima se mogu ko-kultivirati zreli adipociti kako bi se poboljšala ravnoteža između proliferacije i diferencijacije epidermisa, razvila djelotvornija epidermalna barijera i omogućilo umetanje folikula dlaka. U ekvivalentima kože moguće je i kultivirati CD34+ hematopoetske ishodišne stanice i stanice koje se mogu diferencirati u Langerharsove stanice i pravilno lokalizirati (Dellambra i sur., 2019).

2.3.9. Integrirani pristup

Integriranim pristupom moguće je odrediti je li neka tvar senzibilizator ili nije, i to kombinacijom dva ili više pristupa ili modela predviđanja. Korištenjem integriranog pristupa

može se postići bolje predviđanje u usporedbi s primjenom jednog ispitivanja (EURL ECVAM, 2015; Cho i sur., 2020).

Primjer integriranog pristupa prikazan je na slici 8. Na Nacionalnom sveučilištu u Seulu su dr. sc. Sun-A Cho i suradnici ispitali četiri različita pristupa koji su koristili Spectro-DPRA, KeratinoSensTM i h-CLAT metode kako bi odredili je li neka tvar senzibilizator kože ili nije, a ovaj je pristup pokazao najveću mogućnost predviđanja. Tvar se prvo ispituje Spectro-DPRA metodom. Ukoliko se pokaže da je senzibilizator, rezultat se proglašava pozitivnim. Ukoliko je rezultat negativan, provodi se ispitivanje KeratinoSensTM i h-CLAT, zbog toga što su mogući lažno negativni rezultati Spectro-DPRA. Ukoliko se rezultat ova dva testa podudara i pokaže da je senzibilizator, proglašava se pozitivnim. Ukoliko je barem jedan od njih negativan, rezultat se proglašava negativnim, odnosno tvar nije senzibilizator (Cho i sur., 2020).



Slika 8. Primjer integriranog pristupa određivanja kožne preosjetljivosti (prema Cho i sur., 2020)

Niti jedan od alternativnih testova se ne preporučuje kao samostalna zamjena za testiranje na životinjama, već se razvijaju integrirane strategije koje uključuju višestruka testiranja. Različiti *in vivo* i alternativni testovi donose rezultate na temelju različitih mehanizama tijekom imunostne reakcije. Presjek nekih metoda i njihovih osnovnih karakteristika je prikazan u tablici 3. Daljnji razvoj *in vitro* kože će se najvjerojatnije kretati u smjeru točnijeg poznavanja biološkog sustava kože i pravilnog rješavanja pitanja troškova, vremena i etičke opravdanosti istraživanja. Budući alternativni modeli ispitivanja dermalne toksičnosti bi trebali moći reproducirati ljudsku kožu u kontekstu umjetnog tijela, kako bi mogli oponašati interakcije kože

Tablica 3. Usporedba metoda za ispitivanje dermalne toksičnosti

Metoda	Tip testa	Ključni događaj	Testni sustav	Proces u imunom odgovoru koji se mjeri testom	Metoda mjerenja
Lokalna analiza limfnih čvorova	<i>in vivo</i>	Proliferacija T limfocita	Miševi	Indukcija primarne proliferacije limfocita u limfnom čvoru	Mjerenje proliferacije limfocita radioznačavanjem (ugradnja ³ H- timidina) ili bioluminiscencija (kvantifikacija ATP-a u limfocitima)
Maksimizacijski test sa zamorcima	<i>in vivo</i>	Alergijski odgovor, faza elicitacije	Albino zamorci	Alergijski odgovor	Uočavanje pojave edema i eritema
h-CLAT ^a	<i>in vitro</i>	Aktivacija dendritičkih stanica	THP-1 - stanična linija akutne monocitne leukemije	Pojačana ekspresija CD54 i CD86	Protočna citometrija
LuSens	<i>in vitro</i>	Izlučivanje citokina i kemokina u keratinocitima	Stanična linija transgenih humanih keratinocita s unesenim reporter genom za luciferazu	Aktivacija Nrf2/ARE puta ^b	Mjerenje luminiscencije
U-SENS ^{TM c}	<i>in vitro</i>	Sazrijevanje dendritičkih stanica	U-937 - leukemijske monocitne stanice difuznoga histiocitnog limfoma	Pojačana ekspresija CD86	Protočna citometrija
GARD ^d	<i>in vitro</i>	Aktivacija dendritičkih stanica	MUTZ-3 - stanična linija mijeloidne leukemije	Povećana razina ekspresije 200 gena u stanicama	Sinteza cDNA iz izdvojene ukupne RNA prema odgovarajućem protokolu (Affymetrix®, GeneChip®); analiza dobivenih podataka RMA algoritmom i donošenje odluke SVM ^j predviđanjem
VITASENS	<i>in vitro</i>	Aktivacija dendritičkih stanica	Primarna kultura dendritičkih stanica (CD34+)	Ekspresija gena (<i>CCR2</i> i <i>CREM</i>) u tri vremenska intervala	Analiza izolirane ukupne RNA iz stanica RT-PCR u stvarnom vremenu; analiza PCR rezultata qBase softverom i analiza relativne ekspresije gena $\Delta\Delta C_t$ metodom
DPRA ^e	<i>in chemico</i>	Molekularna inicijacija	Sintetski heptapeptidi ⁱ	Kovalentno vezanje reaktivnih elektrofilnih spojeva (senzibilizatori) na proteine u koži	Analiza slobodnih peptida HPLC-om
PPRA ^f	<i>in chemico</i>	Molekularna inicijacija	Sintetski heptapeptidi ^g i HRP/P ^h	Kovalentno vezanje reaktivnih elektrofilnih spojeva (senzibilizatori) na proteine u koži	Analiza slobodnih peptida HPLC/MS/MS sustavom
EASA ⁱ	<i>in chemico</i>	Molekularna inicijacija	Slobodni peptidi – NBT (4-nitrobenzentiol), PDA (piridoksil amin)	Kovalentno vezanje reaktivnih elektrofilnih spojeva (senzibilizatori) na proteine u koži	Analiza slobodnih peptida (NBT i PDA) mjerenjem A ₂₃₄

Metoda	Detektira pro- i pre-haptene	Koristi pokusne životinje	Koristi stanice humanog podrijetla	Koristi fetalni serum	Koristi genetski modificirane stanice	Odobren	Izvori
Lokalna analiza limfnih čvorova	+	+	-	-	-	+	Kimber i sur., 2002; EC, 2012
Maksimizacijski test sa zamorcima	+	+	-	-	-	+	OECD, 1992
h-CLAT ^a	-	-	+	+	-	+	EC, 2017a; EURL ECVAM, 2015
LuSens	-	-	+	+	+	-	JRC, 2020a; EURL ECVAM, 2018; Ramirez i sur., 2014
U-SENS ^{TM c}	+	-	+	+	-	+	EURL ECVAM, 2017; Alépée i sur., 2015
GARD ^d	+	-	+	+	-	-	JRC, 2020b; Forreryd i sur., 2018; Johansson i sur., 2013
VITOSENS	+	-	+ ^k	-	-	-	JRC, 2020c; Hooyberghs i sur., 2008
DPRA ^e	-	-	-	-	-	+	EC, 2017b; Cho i sur., 2020; Patlewicz i sur., 2016
PPRA ^f	+	-	-	-	-	-	Gerberick i sur., 2009
EASA ⁱ	-	-	-	-	-	-	JRC, 2020d; Strickland i sur., 2018; Chipinda i sur., 2014
^a engl. <i>human Cell Line Activation Test</i> ^b jedan od signalnih puteva kojim se u keratinocitima aktivira imunosna reakcija na senzibilizator ^c engl. <i>U937 cell line activation test</i> ^d engl. <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> ^e engl. <i>Direct Peptide Reactivity Assay</i> ^f engl. <i>Peroxidase Peptide Reactivity Assay</i> ^g peptid s cisteinom (Ac-RFAACAA-COOH) i lizinom (Ac-RFAAKAACOOH) ^h enzim (peroksidaza) koji u biološkim sustavima aktivira pro-haptene (engl. <i>horseradish peroxidase/hydrogen peroxide</i>) ⁱ engl. <i>Electrophilic Allergen Screening Assay</i> ^j Metoda potpornih vektora (engl. <i>Support Vector Machine</i>) ^k koristi embrionalne matične stanice humanog podrijetla – potrebna su dva etička odobrenja							

s drugim organima i upotpuniti sliku o toksikokinetici spojeva koji ulaze kroz kožu (Urbisch i sur., 2015; Daniel i sur., 2018; Dellambra i sur., 2019).

2.3.10. Zakonska regulativa u testiranju kozmetičkih proizvoda na životinjama u EU i ostatku svijeta

Korištenje životinja u testiranju za farmaceutsku industriju općenito se smatra opravdanim iz razloga što se tu radi o razvoju proizvodnje lijekova koji pridonose smanjenju smrtnosti i poboljšanju kvalitete ljudskog života. Procjenjuje se da je u istraživanja za farmaceutsku industriju 2018. godine uloženo 36,5 milijardi eura u Europi, a ukupna tržišna vrijednost farmaceutskih proizvoda proizvedenih u EU iznosi oko 209 milijardi eura (EFPIA, 2019). Radi se o proizvodnji desetaka tisuća lijekova koji se već koriste te o manjem broju novih proizvoda. Veći dio dobiti dolazi od proizvoda za koje više nisu potrebna testiranja na životinjama, budući da su već evaluirani i prihvaćeni. Proizvodi koji zahtijevaju testiranje na životinjama pripadaju malom broju novih proizvoda, njih desetak godišnje. Međutim, velik broj proizvoda za koje se provode istraživanja ne dospije do tržišta jer nisu ispunili osnovne uvjete u sigurnosnim testovima. Nasuprot farmaceutskoj, kozmetička industrija je po mnogočemu drugačija jer konstantno izlazi na tržište s novim proizvodima, njih oko 20 000 godišnje. Ti proizvodi sadrže oko 400 novih tvari koje moraju biti podvrgnute ispitivanju toksičnosti. Proizvodi kozmetičke industrije imaju kraće vrijeme zadržavanja na tržištu od onih iz farmaceutske industrije, pa se istraživanja na životinjama za ovu granu industrije smatraju manje opravdanim (Bottini i Hartung, 2009). Godine 2013. u Europskoj je uniji u potpunosti zabranjeno testiranje kozmetičkih proizvoda na životinjama. Ta je zabrana poslala poruku ostatku svijeta o tome koliko je važna zaštita životinja te je pokrenula svijest o realnoj mogućnosti postupnog ukidanja ispitivanja na životinjama u svijetu u kozmetičke svrhe (EP, 2018). Uredba Europske unije 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima je glavni propis na temelju kojega se stavljaju na tržište gotovi kozmetički proizvodi, proizvedeni u EU ili uvezeni. Uredba zabranjuje ispitivanje gotovih kozmetičkih proizvoda i njihovih sastojaka na životinjama te zabranjuje stavljanje na tržište unutar EU gotovih kozmetičkih proizvoda i sastojaka koji su testirani na životinjama nakon određenog datuma. Kako bi neka tvar mogla biti sastojak kozmetičkih proizvoda, moraju biti dostupni podaci o testiranju senzibilizacije (preosjetljivosti) kože. Budući da testiranje na životinjama u EU nije dopušteno za kozmetičke proizvode i njihove sastojke, nužno je korištenje alternativnih metoda ispitivanja senzibilizacije kože (Daniel i sur., 2018; EC, 2019).

U nekim državama izvan EU, primjerice u Gvatemali, Islandu, Indiji, Izraelu, Novom Zelandu, Norveškoj, Srbiji, Švicarskoj i Turskoj postoje potpune zabrane testiranja kozmetičkih

proizvoda na životinjama. Neke su zemlje, poput Južne Koreje i Australije ostvarile značajan napredak u smjeru takve zabrane iako nisu uvele potpunu zakonski reguliranu zabranu. Ipak, oko 80 % zemalja svijeta i dalje nema nikakve zabrane ispitivanja na životinjama te dopušta ispitivanje i stavljanje na tržište proizvoda koji su testirani na životinjama. Prema odluci EU iz 2018. godine o globalnoj zabrani ispitivanja na životinjama u kozmetičke svrhe poziva se na uvođenje međunarodne zabrane ispitivanja na životinjama do 2023. godine. Zabrane ovog tipa mogu biti pod utjecajem tržišta, industrije, trgovinskih pregovora i pravilima WTO (engl. *World Trade Organization*), ali se jedino suradnjom svih dionika na koje utječe zabrana može osigurati njena sustavna implementacija koja će spriječiti njeno ukidanje (EP, 2018).

U Brazilu nije potreban nikakav specifični test, a preporuča se LLNA. Za klasifikaciju kozmetičkih proizvoda mora se provesti procjena opasnosti sastojaka (jesu li senzibilizatori ili ne-senzibilizatori) (Daniel i sur., 2018).

U Kini je testiranje potencijala preosjetljivosti kože za nove proizvode i kozmetičke proizvode s posebnom namjenom obavezno. Buehlerov test ili GPMT se preporučuju. Japanska regulativa zahtijeva podatke o preosjetljivosti kože na nove sastojke na temelju GPMT, Buehlerovog testa ili LLNA. Japanske kozmetičke kompanije samostalno su prestale s testiranjem kozmetičkih sastojaka na životinjama nakon izdavanja europske Direktive 2010/63/EU, kako bi svoje proizvode mogle izvoziti u zemlje EU (Daniel i sur., 2018).

Propisi u Južnoj Koreji zahtijevaju podatke o testovima osjetljivosti kože kad se uvodi neki novi sastojak. Zakon ne dopušta testiranje na životinjama za sastojke koji se koriste samo u kozmetičkim proizvodima. Zabranjen je i marketing kozmetičkih proizvoda koji sadrže sastojke testirane na životinjama u toj godini. Korišteni testovi su DPRA, ARE-Nrf2 Luciferase Test i h-CLAT (Daniel i sur., 2018).

U SAD-u nije potrebno nikakvo testiranje osjetljivosti kože za kozmetiku, već je tvrtka ili pojedinac koji proizvodi ili stavlja na tržište proizvod zakonski odgovoran za sigurnost svojih proizvoda. Za plasiranje kozmetičkih proizvoda na tržište u Kanadi ne postoje zahtjevi za tvrtke o dostavljanju podatka ispitivanja na životinjama, uključujući preosjetljivost kože. Ponekad se samo traži dokaz o sigurnosti proizvoda, na temelju testova na životinjama i alternativnih testova (Daniel i sur., 2018).

2.3.11. Provođenje smjernica o zabrani ispitivanja na životinjama i problemi sa zabranom testiranja

Države članice EU moraju na godišnjoj bazi omogućiti javnu dostupnost prikupljenih statističkih podataka o korištenju životinja u testiranjima i provođenju tih testiranja (EP, 2018).

U nekim je zemljama zabrana testiranja problem jer mali i srednji poduzetnici koji proizvode kozmetičke proizvode nemaju dovoljno potrebnog znanja o zabranama ispitivanja, kao ni financijska sredstva za ispitivanja novih sastojaka. Također, na europskoj razini nema dovoljno ocjenjivača sigurnosti i teško ih je naći. Zabrana testiranja na životinjama za kozmetičke proizvode imala je kao posljedicu istraživanje, razvoj, potvrđivanje i prihvaćanje mnogih alternativnih testova toksičnosti. Razvijene su nove alternativne metode za predviđanje preosjetljivosti kože u dodiru s kemikalijama, procjenu bioelucije kemikalija iz metalnih legura i za utvrđivanje akutne toksičnosti na ribama (EC, 2019).

U siječnju 2016. godine pokrenut je europski suradnički projekt EU-ToxRisk čiji je cilj poboljšanje ispitivanja toksičnosti koja se temelje na mehanizmu djelovanja i procjeni rizika. Predviđeno trajanje projekta je šest godina, a za financiranje oko 30 milijuna eura. U okviru ovog projekta već je provedeno nekoliko studija slučaja u složenim područjima ispitivanja toksičnosti ponovljenih doza te ispitivanja razvojne i reproduktivne toksičnosti, uključujući ispitivanja endokrinih disruptora. Nekoliko industrijskih sektora, uključujući neke proizvođače kozmetike, trenutno su u postupku uspostavljanja suradnje s projektnim timom, koje je i u bliskoj interakciji s regulatornim institucijama i EURL ECVAM-om (EC, 2019).

Inicijativom za inovativne lijekove (IMI), kao dijelom programa Obzor 2020, isto se tako pruža podrška raznim projektima čiji je cilj razvoj postupaka za ispitivanje sigurnosti koji ne uključuju životinje, naročito za kontrolu kvalitete cjepiva i procjenu sigurnosti lijekova. Ovi projekti su sufinancirani od strane Europske komisije s financiranjem od 35 milijuna eura, uz jednak doprinos iz farmaceutskog sektora (EC, 2019).

Međunarodna regulatorna zajednica nije prihvatila alternativne metode kod ispitivanja procjene sigurnosti kemikalija za toksičnost ponovljenih doza, reproduktivnu toksičnost ili kancerogenost (Stokes, 2015; EC, 2019).

3. ZAKLJUČCI

- 1) Potreba za ispitivanjem toksičnosti kontinuirano se povećava s razvojem medicine i farmaceutske industrije pa je potrebno razviti testove koji mogu pratiti razvoj i potrebe industrije i osiguranje od hazarda.
- 2) Alternativni testovi toksičnosti često omogućuju preliminarno, brže i jeftinije ispitivanje toksičnosti velikog broja spojeva u odnosu na *in vivo* testove toksičnosti, koji su dugotrajniji i skuplji.
- 3) Korištenje životinja u testiranjima se smanjuje u svim poljima znanosti zbog razvoja alternativnih metoda i veće svijesti znanstvenika, ali i poštivanja pravila (poput 3R principa), legislativa i zakona.
- 4) Apsolutna zamjena svih testova toksičnosti na životinjama alternativnim testovima je nemoguća zbog složenosti organskih sustava koji sudjeluju u odgovoru na ksenobiotik, potrebe za visokom točnošću rezultata i nemogućnosti primjene nekih alternativnih metoda u određivanju toksičnosti pojedinih skupina spojeva (npr. pro-hapteni, soli metala).
- 5) Ispitivanje na životinjama se smatra etički opravdanim ukoliko je procijenjena potencijalna korist rezultata istraživanja za ljude veća od procijenjene štete koja se nanosi životinjama.
- 6) Zakonska regulativa koja ograničava korištenje životinja za znanstvena istraživanja ima ulogu u regulaciji, ali i potiče razvoj alternativnih testova toksičnosti.
- 7) Zabrana testiranja kozmetičkih proizvoda na životinjama u Europskoj uniji iz 2013. godine imala je za rezultat nagli porast razvoja alternativnih testova za ispitivanje dermalne toksičnosti.
- 8) Legislativa Europske unije znatno je stroža po pitanju zabrane i regulacije ispitivanja na životinjama, korištenja embrija i matičnih stanica, u usporedbi s ostalim razvijenim zemljama. Zakoni i pravilnici koji se donose na području Europske unije imaju za cilj i služiti kao uzor u sastavljanju sličnih u ostalim zemljama.
- 9) LLNA je, u usporedbi s GPMT i Buehlerovim testom, etički najprihvatljiviji *in vivo* test ispitivanja dermalne toksičnosti jer koristi manji broj životinja i njihova je patnja manja.
- 10) *In vitro* testovi toksičnosti razvijeni za ispitivanje kožne preosjetljivosti na kulturama stanica izvrstan su alat u ispitivanju toksičnosti bez korištenja pokusnih životinja, ali se ne mogu koristiti samostalno, već samo u kombinaciji s drugim testovima.
- 11) *In chemico* testovi za ispitivanje kožne preosjetljivosti, ADRA i DPRA, mogu brzo, točno i učinkovito ispitati potencijal neke tvari da uzrokuje kožnu preosjetljivost, ali nisu učinkoviti

za ispitivanje pro-haptena i pre-haptena pa ih je potrebno koristiti isključivo u kombinaciji s drugim testovima.

- 12) *In silico* metode za procjenu potencijalne toksičnosti mogu služiti kao alat za probir velikog broja kemijskih spojeva te predvidjeti potencijalnu toksičnost prije korištenja ostalih testova toksičnosti.
- 13) Razvijen je niz alternativnih metoda za ispitivanje kožne preosjetljivosti koje, kad se kombiniraju u integriranom pristupu, mogu uspješno u potpunosti zamijeniti *in vivo* testove toksičnosti.
- 14) Ispitivanje toksičnosti se provodi na životinjama, u Europskoj uniji, samo kada je to neizbježno i nužno te nema dostupnih podataka o toksičnosti iz prethodnih ispitivanja. Istraživanja na životinjama u znanstvene svrhe se ne mogu provoditi ukoliko njihova etičnost nije odobrena.

4. LITERATURA

- Abaci, H. E., Gledhill, K., Guo, Z., Christiano, A. M. Shuler, M. L. (2015) Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents. *Lab Chip* **15**, 882–888. doi: 10.1039/C4LC00999A.
- Ackerknecht, E. H., Haushofer, L. (2016) *A short history of medicine*, 9. izd., Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015) Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol. In Vitro* **30**, 373–382. doi: 10.1016/j.tiv.2015.09.028.
- Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y. (2008) Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization; results of the first japanese inter-laboratory study. *AATEX* **13**, 27-35.
- Avci, P., Sadasivam, M., Gupta, A., De Melo, W. C., Huang, Y.-Y., Yin, R., Chandran, R., Kumar, R., Otufowora, A., Nyame, T., Hamblin, M. R. (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin. Drug Dis.* **8**, 331–355. doi: 10.1517/17460441.2013.761202.
- Bal-Price, A., Coecke, S. (2011) Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). U: *Cell Culture Techniques*, (Aschner, M., Suñol, C., Bal-Price, A., ured.). Humana Press, Totowa, NJ, str. 1–25.
- Bateson, P. (1986) When to experiment on animals. *New Sci.* **20**, 30-32.
- Bergström, M., Grahnén, A., Långström, B. (2003) Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 357–366. doi: 10.1007/s00228-003-0643-x.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., Di Lisa, F. (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* **264**, 687–701. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00725.x.
- Bottini, A., Hartung, T. (2009) Food for thought... on the economics of animal testing. *ALTEX-altern. Anim. Ex.* **26**, 3–16. doi: 10.14573/altex.2009.1.3.
- Busquet, F. (2020) New European Union statistics on laboratory animal use – what really counts! *ALTEX-altern. anim. ex* **37**, 167–186. doi: 10.14573/altex.2003241.

- CCAC (2020) CCAC guidelines: Mice. CCAC - The Canadian Council on Animal Care, <https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Guidelines_Mice.pdf>. Pristupljeno 15. listopada 2020.
- Cheluvappa, R., Scowen, P., Eri, R. (2017) Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. *Pharmacol. Res. Perspect* **5**, e00332. doi:10.1002/prp2.332.
- Chipinda, I., Mbiya, W., Adigun, R. A., Morakinyo, M. K., Law, B. F., Simoyi, R. H., Siegel, P. D. (2014) Pyridoxylamine reactivity kinetics as an amine based nucleophile for screening electrophilic dermal sensitizers. *Toxicology* **315**, 102–109. doi:10.1016/j.tox.2013.11.009.
- Cho, S., Choi, M., Park, S., An, S., Park, J. (2020) Application of SpectroDPRA, KeratinoSensTM and hCLAT to estimation of the skin sensitization potential of cosmetics ingredients. *J. Appl. Toxicol.* **40**, 300–312. doi: 10.1002/jat.3904.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.-J., Johnson, J., Meisner, L., Lanza, R. (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* **439**, 216–219. doi: 10.1038/nature04277.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.-J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S, Krtolica, A, Lanza, R. (2008) Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell* **2**, 113–117. doi: 10.1016/j.stem.2007.12.013.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hay, R., Merten, O.-W., Price, A., Schechtman, L., Stokes, W. (2005) Guidance on Good Cell Culture Practice: A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *ALTA-Altern. Lab. Anim.*, **33**, 261-287.
- Croft, P. G. (1952) The assessment of pain perception. *Journal of Mental Science* **98**, 427-432.
- Daniel, A. B., Strickland, J., Allen, D., Casati, S., Zuang, V., Barroso, J., Whelan, M., Régimbald-Krnel, M. J., Kojima, H., Nishikawa, A., Park, H.-K., Lee, J. K., Kim, T. S., Delgado, I., Rios, L., Yang, Y., Wang, G., Kleinstreuer, N. (2018) International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul. Toxicol. Pharm.* **95**, 52–65. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.03.003.

- Dellambra, E., Odorisio, T., D’Arcangelo, D., Failla, C. M., Facchiano, A. (2019) Non-animal models in dermatological research. *ALTEX-altern. Anim. Ex* **36**: 177-202. doi: 10.14573/altex.1808022.
- Díaz, R. D., Larrondo, L. F. (2020) A circadian clock in *Neurospora crassa* functions during plant cell wall deconstruction. *Fungal Biol.-UK* **124**, 501–508. doi: 10.1016/j.funbio.2020.03.003.
- Doke, S. K., Dhawale, S. C. (2015) Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharm. J.* **23**, 223–229. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.
- Dresto-Alač, B. (2012) Radioaktivnost. Primjena u medicini. Autorizirana predavanja. <http://fzsri.uniri.hr/files/FAKULTET/KATEDRE/Katedra_temeljne/Microsoft%20Word%20-%20Radioaktivnost_Primjena%20u%20medicini_povjerenstvo_Z.pdf>. Pristupljeno 16. listopada 2020.
- Eaton, D., Gilbert, S. G. (2013) Principles of Toxicology. U: *Casarett & Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 8. izd. (Klaassen, C. D., ured.), McGraw-Hill Education, New York/Chicago/San Francisco/Lisbon/London/Madrid/Mexico City/Milan/New Delhi/San Juan/Seul/Singapore/Sydney/Toronto, str. 13-48.
- EC (2006) Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ, <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R1907&from=hr>> Pristupljeno 8. travnja 2020.
- EC (2010) Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32010L0063&from=HR>> Pristupljeno 28. lipnja 2020.
- EC (2012) Uredba Komisije (EU) br. 640/2012 od 6. srpnja 2012. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) radi prilagodbe tehničkom napretku, <[64](https://eur-lex.europa.eu/legal-

</div>
<div data-bbox=)

[content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0640&from=HR](https://eur-lex.europa.eu/content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0640&from=HR)>. Pristupljeno 23. lipnja 2020.

- EC (2017a) Skin sensitisation: the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). EC - Europska komisija, <<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-sensitisation/dpra>>. Pristupljeno 8. kolovoza 2020.
- EC (2017b) Skin Sensitisation: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). EC - Europska komisija, <<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-sensitisation/hclat>>. Pristupljeno 8. kolovoza 2020.
- EC (2019) Izvješće komisije Europskom parlamentu i vijeću o razvoju, potvrđivanju i pravnoj prihvatljivosti alternativnih metoda koje se primjenjuju umjesto ispitivanja na životinjama u području kozmetičke industrije (2018), <<https://op.europa.eu/hr/publication-detail/-/publication/faa77d79-ef30-11e9-a32c-01aa75ed71a1>>. Pristupljeno 29. svibnja 2020.
- EC (2020) Izvješće komisije europskom parlamentu i vijeću. Izvješće za 2019. o statističkim podacima o korištenju životinja u znanstvene svrhe u državama članicama Europske unije u razdoblju 2015.–2017., <<https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2020/HR/COM-2020-16-F1-HR-MAIN-PART-1.PDF>>. Pristupljeno 10. svibnja 2020.
- ECHA (2017) Guidance on the application of the CLP criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Version 5.0. ECHA – European Chemicals Agency, <https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/clp_en.pdf/58b5dc6d-ac2a-4910-9702-e9e1f5051cc5>. Pristupljeno 4. kolovoza 2020.
- EFPIA (2019) The Pharmaceutical Industry in Figures. EFPIA - European Federation of Pharmaceutical Industries Associations, <<https://www.efpia.eu/media/412931/the-pharmaceutical-industry-in-figures-2019.pdf>>. Pristupljeno 17. kolovoza 2020.
- EFPIA (2020) Clinical Trials. EFPIA - European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, <<http://www.efpia.eu/about-medicines/development-of-medicines/regulations-safety-supply/clinical-trials>>. Pristupljeno 27. travnja 2020.
- Eskes, C., Boström, A.-C., Bowe, G., Coecke, S., Hartung, T., Hendriks, G., Pamies, D., Piton, A., Rovida, C. (2017) Good cell culture practices & *in vitro* toxicology. *Toxicol. In Vitro* **45**, 272–277. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.022.

- EURL ECVAM (2015) EURL ECVAM Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. EURL ECVAM – European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/system/files/Published/h-CLAT%20Reccomendation_final%20version_02_2015.pdf>. Pristupljeno 8. kolovoza 2020. doi: 10.2788/29986.
- EURL ECVAM (2017) DB-ALM Protocol n°183: U937 Cell Line Activation Test for Skin Sensitization (U-SENS™). EURL ECVAM –European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, <<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2013-02>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2020.
- EURL ECVAM (2018) DB-ALM Protocol n°184: LuSens Assay. EURL ECVAM – European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, <https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/184_P_Lusens.pdf>. Pristupljeno 9. kolovoza 2020.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193–236. doi:10.1016/S0278-6915(01)00118-1.
- EP (2018) Prijedlog rezolucije podnesen nakon pitanja za usmeni odgovor B8-0017/2018 i B8-0018/2018 u skladu s člankom 128. stavkom 5. poslovnika o globalnoj zabrani ispitivanja na životinjama u kozmetičke svrhe (2017/2922(RSP)), <https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/B-8-2018-0217_HR.html>. Pristupljeno 28. svibnja 2020.
- EP (2020) Europski zeleni plan. Rezolucija Europskog parlamenta od 15. siječnja 2020. o europskom zelenom planu (2019/2956(RSP)), <https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2020-0005_HR.pdf>. Pristupljeno 12. listopada 2020.
- FELASA (2005) Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe. FELASA - Federation of European Laboratory Animal Science, <https://www.eslav.org/uploads/editor/Principles-practice-ethical-review_full_report_.pdf> Pristupljeno 10. svibnja 2020.
- Festing, S., Wilkinson, R. (2007) The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO rep.* **8**, 526–530. doi: 10.1038/sj.embor.7400993.

- Ford, K. A. (2016) Refinement, reduction, and replacement of animal toxicity tests by computational methods. *ILAR J.* **57**, 226–233. doi: 10.1093/ilar/ilw031.
- Forreryd, A., Norinder, U., Lindberg, T., Lindstedt, M. (2018) Predicting skin sensitizers with confidence - Using conformal prediction to determine applicability domain of GARD. *Toxicol. In Vitro* **48**, 179-187. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.021.
- Gerberick, G. F., Troutman, J. A., Foertsch, L. M., Vassallo, J. D., Quijano, M., Dobson, R. L. M., Goebel, C., Lepoittevin, J.-P. (2009) Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci.* **112**, 164–174. doi: 10.1093/toxsci/kfp192.
- Germain, P.-L., Chiapperino, L., Testa, G. (2017) The European politics of animal experimentation: from Victorian Britain to ‘stop vivisection’. *Stud. Hist. Philos. Sci.* **64**, 75–87. doi: 10.1016/j.shpsc.2017.06.004.
- Gibb, S. (2008) Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy. *Repr. Toxicol.* **25**, 136–138. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.10.013.
- Graham, D., Hampshire, V. (2016) Methods for measuring pain in laboratory animals. *Lab. Anim.* **45**, 99–101. doi: 10.1038/labani.962.
- Hagelin, J., Carlsson, H.-E., Hau, J. (2003) An overview of surveys on how people view animal experimentation: some factors that svibnja influence the outcome. *Public Underst. Sci.* **12**, 67–81. doi: 10.1177/0963662503012001247.
- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., Lewis, D. (2002) ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *ALTA-Altern. Lab. Anim.* **30**, 407–414. doi: 10.1177/026119290203000404.
- Hooyberghs, J., Schoeters, E., Lambrechts, N., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G., Van Den Heuvel, R. (2008) A cell-based *in vitro* alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol. Appl. Pharm.* **231**, 103–111. doi:10.1016/j.taap.2008.03.014.
- Hrvatska enciklopedija (2020a) Etika. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18496>> Pristupljeno 26. lipnja 2020.
- Hrvatska enciklopedija (2020b) Vivisekcija. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=64953>>. Pristupljeno 26. lipnja 2020.
- Ipsos MORI (2018) Public attitudes to animal research in 2018. <https://www.ipsos.com/sites/default/files/ct/news/documents/2019-05/18-040753-01_ols_public_attitudes_to_animal_research_report_v3_191118_public.pdf>. Pristupljeno 2. kolovoza 2020.

- Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R., Baumans, V. (2002) The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *ALTA-Altern. Lab. Anim.* **30**, 219–227. doi: 10.1177/026119290203000208.
- Johansson, H., Albrekt, A.-S., Borrebaeck, C. A. K., Lindstedt, M. (2013) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **27**, 1163–1169. doi: 10.1016/j.tiv.2012.05.019.
- JRC (2020a) LuSens Assay. JRC – Joint Research Centre, <<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2020.
- JRC (2020b) Genomic Allergen Rapid Detection test. JRC - Joint Research Centre, <<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2020.
- JRC (2020c) VITASENS. JRC - Joint Research Centre, <<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2008-04>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2020.
- JRC (2020d) The Electrophilic Allergen Screening Assay for the Detection of Substances Causing Allergic Contact Dermatitis. JRC - Joint Research Centre, <<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2016-07>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2020.
- Kimber, I., Dearman, R. J., Basketter, D. A., Ryan, C. A., Gerberick, G. F. (2002) The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* **47**, 315-328.
- Kimura, Y., Watanabe, M., Suzuki, N., Iwaki, T., Yamakage, K., Saito, K., Nakajima, Y., Fujimura, C., Ohmiya, Y., Omori, T., Kojima, H., Aiba, S. (2018) The performance of an *in vitro* skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). *J. Toxicol. Sci.* **43**, 741–749. doi: 10.2131/jts.43.741.
- Kaluđerović, Ž. (2009) Bioetički pristupi životinjama. *Socijalna ekologija* **18**, 311-322.
- Kaplan, B. L. I., Sulentic, C. E. W., Holsapple, M. P., Kaminski, N. E. (2013) Toxic Responses of the Immune System. U: *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 8. izd. (Klaassen, C. D., ured.), McGraw-Hill Education, New York/Chicago/San Francisco/Lisbon/London/Madrid/Mexico City/Milan/New Delhi/San Juan/Seul/Singapore/Sydney/Toronto, str. 559-638.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Krewski, D., Acosta, D., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J. C., Boekelheide, K., Brent, R., Charnley, Cheung G. V. G., Green Jr., S., Kelsey, K. T., Kerkvliet, N. I., Li., A. A., McCray, L., Meyer, O., Patterson, R. D., Pennie, W., Scala, R. A., Solomon, G. M.,

- Stephens, M., Yager, J., Zeise, L. (2010) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J. Toxicol. Env. Heal. B* **13**, 51–138. doi: 10.1080/10937404.2010.483176.
- Lane, N., Jennings, M. (2004) Supplementary resources for lay members of Local Ethical Review Processes. Projects involving genetically modified animals. RSPCA – Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, <<https://pdfs.semanticscholar.org/215a/89de439513baeea95b7f78a1fc9dddeb58c3.pdf>>. Pristupljeno 4. kolovoza 2020.
 - Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J. G., Kahl, R., Kramer, P.-J., Schweinfurth, H., Wollin, K.-M. (2008) Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch. Toxicol.* **82**, 211–236. doi: 10.1007/s00204-008-0279-9.
 - Marx-Stoelting, P., Adriaens, E., Ahr, H.-J., Bremer, S., Garthoff, B., Gelbke, H.-P., Piersma, A., Pellizzer, C., Reuter, U., Rogiers, V., Schenk, B., Schwengberg, S., Seiler, A., Spielmann, H., Steemans, M., Stedman, D. B., Vanparys, P., Vericat, J. A., Verwei, M., van de Water, F., Weimer, M., Schwarz, M. (2009) A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST): the report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Altern. Lab. Anim.* **37**, 313–328. doi: 10.1177/026119290903700314.
 - Natsch, A., Emter, R. (2015) Reporter cell lines for skin sensitization testing. *Arch. Toxicol.* **89**, 1645–1668. doi:10.1007/s00204-015-1555-0.
 - NAVS (2020) Animals used in research. NAVS - National Anti-Vivisection Society. <<https://www.navs.org/what-we-do/keep-you-informed/science-corner/animals-used-in-research/#.X04w9tIzapr>>. Pristupljeno 25. lipnja 2020.
 - OECD (1992) OECD guideline for the testing of chemicals, Section 4. Test No. 406: Skin sensitisation. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en>. Pristupljeno 10. kolovoza 2020.
 - OECD (2008) OECD guideline for the testing of chemicals, Section 4. Test No. 436 Acute inhalation toxicity - acute toxic class method. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. doi: 10.1787/9789264076037-en.
 - OECD (2014) OECD series on testing and assessment. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. doi: 10.1787/9789264221444-en.

- OECD (2020) OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 442C: *In chemico* skin sensitisation. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en#page1>. Pristupljeno 8. kolovoza 2020.
- Olejniczak, K., Günzel, P., Bass, R. (2001) Preclinical testing strategies. *Drug Inf. J.* **35**, 321–336. doi: 10.1177/009286150103500202.
- Olsson, A. S., Franco, N. H., Weary, D. M., Sandøe, P. (2012) The 3Rs Principle – Mind the Ethical Gap! Eighth World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC8), Montréal, str. 333-336.
- Ormandy, E., Schuppli, C. (2014) Public attitudes toward animal research: a review. *Animals* **4**, 391–408. doi: 10.3390/ani4030391.
- Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A. P., Aschberger, K. (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul. Toxicol. Pharm.* **82**, 147–155. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.007.
- Patwardhan, V., Ghaskadbi, S. (2013) Invertebrate alternatives for toxicity testing: hydra stakes its claim. *Proc ALTEX* **2**, 69-76.
- Rauch, C., Feifel, E., Amann, E. M., Spötl, H. P., Schennach, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2011) Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX - Altern. Anim. Ex.* **28**, 305-316.
- Ramirez, T., Mehling, A., Kolle, S. N., Wruck, C. J., Teubner, W., Eltze, T., Aumann, A., Urbisch, D., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2014) LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol. In Vitro* **28**, 1482-1497.
- Robinson, V., Jennings, M. (2004) Refinement and reduction in the production of genetically modified mice. *ALTA - Altern. Lab. Anim.* **32**, 373–375. doi: 10.1177/026119290403201s61.
- Roggen, E. L. (2011) *In vitro* toxicity testing in the twenty-first century. *Front. Pharmacol.* **2**, 1-3. doi: 10.3389/fphar.2011.00003.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique* [online], Methuen & Co LTD., London, <<https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>>. Pristupljeno 19. lipnja 2020.

- Sachana, M., Hargreaves, A. J. (2012) Toxicological testing. U: *Veterinary Toxicology*, 2. izd. (Gupta, R. C., ured.), Academic Press, London/Waltham/San Diego, str. 62–79.
- Seiler, A. E. M., Spielmann, H. (2011) The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro*. *Nat. Protoc.* **6**, 961–978. doi: 10.1038/nprot.2011.348.
- Sills, E., Takeuchi, T., Tanaka, N., Neri, Q. V., Palermo, G. D. (2005) Identification and isolation of embryonic stem cells in reproductive endocrinology: theoretical protocols for conservation of human embryos derived from *in vitro* fertilization. *Theor. Biol. Med. Model.* **2**, 25. doi: 10.1186/1742-4682-2-25
- Sharma, N. S., Jindal, R., Mitra, B., Lee, S., Li, L., Maguire, T. J., Schloss, R., Yarmush, M. L. (2012) Perspectives on non-animal alternatives for assessing sensitization potential in allergic contact dermatitis. *Cel. Mol. Bioeng.* **5**, 52–72. doi: 10.1007/s12195-011-0189-4.
- Stafleu, F. R., Tramper, R., Vorstenbosch, J., Joles, J. A. (1999) The ethical acceptability of animal experiments: a proposal for a system to support decision-making. *Lab. Anim.* **33**, 295-303.
- Stokes, W. S. (2011) Best practices for the use of animals in toxicological research and testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1245**, 17-20. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06334.x.
- Stokes, W. S. (2015) Animals and the 3Rs in toxicology research i testing: the way forward. *Hum. Exp. Toxicol.* **34**, 1297–1303. doi: 10.1177/0960327115598410.
- Strickland, J., Gordon, J., Hettick, J., Law, B., Petersen, E., Solomotis, N., Truax, J., Uhl, R., Yourick, J., Allen, D., Kleinstreuer, N. (2018) Phase 1 Validation of the Electrophilic Allergen Screening Assay (EASA). NTP - National Toxicology Program, <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/ascct-2018/strickland-poster.pdf>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2020.
- Štojs, T. (2014) Istraživanja na ljudskim subjektima - povijesni razvoj, načela i primjeri neetičnih postupanja. *Nova prisutnost: časopis za intelektualna i duhovna pitanja* **12**, 91-111.
- Thélu, A., Catoire, S., Kerdine-Römer, S. (2020) Immune-competent *in vitro* co-culture models as an approach for skin sensitisation assessment. *Toxicol. In Vitro* **62**, 104691. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104691.
- Tićac, I., Marinović, S. (2017) Eko-etika između biocentrizma i antropocentrizma. *Acta Iadertina* **9**, 47-59. doi:10.15291/ai.1260.

- Timbrell, J. A. (2009) *Principles of Biochemical Toxicology*, 4. Izd., Informa Healthcare, New York.
- Ukelis, U., Kramer, P.-J., Olejniczak, K., Mueller, S. O. (2008) Replacement of *in vivo* acute oral toxicity studies by *in vitro* cytotoxicity methods: opportunities, limits and regulatory status. *Regul. Toxicol. Pharm.* **51**, 108–118. doi: 10.1016/j.yrtph.2008.02.002.
- Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015) Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharm.* **71**, 337–351. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.12.008.
- USDA (2020) Annual report animal usage by fiscal year. USDA - United States Department of Agriculture, <<https://speakingofresearch.files.wordpress.com/2020/01/usda-annual-report-animal-usage-in-research-2018.pdf>>. Pristupljeno 3. svibnja 2020.
- UVSH (2019) EU statistical data of all uses of animals. member state: Croatia Year: 2018. UVSH - Uprava za Veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb, <<http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/dobrobitZivotinja/DZpokusi/Izvje%C5%A1%C4%87e%202018.%20godina.pdf>>. Pristupljeno 3. svibnja 2020.
- Willmann, J. K., van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., Gambhir, S. S. (2008) Molecular imaging in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 591–607. doi: 10.1038/nrd2290.
- Xu, J. J., Diaz, D., O'Brien, P. J. (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem. Biol. Interact.* **150**, 115–128. doi: 10.1016/j.cbi.2004.09.011.
- Xu, K.-P. (2000) Corneal organ culture model for assessing epithelial responses to surfactants. *Toxicol. Sci.* **58**, 306–314. doi: 10.1093/toxsci/58.2.306.

5. PRILOZI

5. 1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA:

- *AKR1C2* - gen koji kodira za aldo-keto reduktazu C2
- ATP - adenzin trifosfat
- CCL19 - kemokinski ligand 19
- CCL21 - kemokinski ligand 21
- cDNA - kružna deoksiribonukleinska kiselina
- DOTA - 1,4,7,10-tetraazaciklododekan 1,4,7,10-tetraoctena kiselina
- FDG - fluordeoksiglukoza
- HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
- LD₅₀ – doza toksikanta u krutom stanju u mg·kg⁻¹ t. m. kod koje je letalnost 50 %
- LC₅₀ – koncentracija u vodi topivog spoja u mg·L⁻¹ kod koje je letalnost 50 %
- NBT - 4-nitrobenzentiol
- *NQO1* - gen koji kodira za NAD(P)H kvinon dehidrogenazu 1
- PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
- PDA - piridoksil amin
- PET - pozitronska emisijska tomografija
- RT-PCR - lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*)
- TETA - 1,4,8,11- tetraazaciklotetradekan 1,4,8,11-tetraoctena kiselina

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Morana Roller

Morana Roller