

The 3R principle in the protection of animals used for scientific purposes

Schollenberger A.

This article aims at the presentation of 3Rs principle in the protection of animals used for scientific purposes. Replacement, Reduction and Refinement should be taken into consideration while planning a scientific project with the use of animals. Each "R" has a positive influence on other two "Rs" and improves the research quality. Availability of alternatives for *in vivo* studies were briefly described.

Keywords: animal welfare, animal protection, the 3Rs principle.

Bez zwierząt i doświadczeń z ich użyciem rozwój nauk, określanych ogólnie mianem biomedycznych, nie byłby możliwy. Wydaje się, że potrzeba prowadzenia takich badań zgodnie z zasadami etyki jest dla lekarza weterynarii oczywista. Przygotowanie zawodowe pozwala bowiem z łatwością zrozumieć, że

Zasada 3R w ochronie zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych

Ada Schollenberger

jakakolwiek ingerencja w żywy organizm musi wiązać się z poważnym naruszeniem dobrostanu zwierzęcia i z zadawaniem cierpienia, a ból, jak wiadomo, jest czynnikiem silnie stresogennym, oddziałującym negatywnie na wiele procesów życiowych. Nieprzemyślane doświadczenie z użyciem zwierząt oznacza narażenie ich na co najmniej dystres. Wartość naukowa takiego eksperymentu jest łatwa do zakwestionowania. Zwierzę nie jest rzeczą, lecz żywą, czującą istotą. Wykorzystanie zwierząt w eksperymencie powinno odbywać się w sposób zapewniający im najwyższy możliwy dobrostan, tak aby wynik zaplanowanego doświadczenia pozwolił na osiągnięcie maksimum korzyści naukowych przy minimum inwazyjności procedur badawczych i liczby użytych zwierząt.

Nowożytna historia rozwoju medycyny jest związana z filozofią początku XVII w. i poglądem Kartezjusza, który na długie dziesięciolecia utrwalił się wśród uczonych: zwierzę jest maszyną. Pogląd ten zdejmował z człowieka moralny nakaz przestrzegania norm etycznych w stosunku do zwierząt. Kwestia cierpienia żywych istot, mających jednak status przedmiotu, często była pomijana w rozważaniach naukowych i etycznych. Wprawdzie ostateczne rozwiązania eksperymentalne podejmowali ludzie, którzy niejednokrotnie przejawiali wiele zrozumienia i współczuli losowi zwierząt, z którymi pracowali, jednak nawet dla nich traktowanie zwierząt jako równorzędnych człowiekowi, gdy chodzi o odczuwanie bólu i cierpienia, miało znamiona sentymentalizmu. Stopniowo

jednak następowały zmiany w sposobie myślenia o zwierzętach. W XIX w. w środowiskach naukowców powoli upowszechniał się pogląd, że człowiek i zwierzęta, jako przedstawiciele gromady ssaków, dzielą liczne właściwości. W 1875 r. w Wielkiej Brytanii powstała pierwsza organizacja przeciwko wiwisekcji, National Anti-Vivisection Society (NAVS), założona przez Frances Power Cobbe, a już w rok później (15 sierpnia 1876 r.) zaaprobowano prawo zakazujące okrucieństwa wobec zwierząt (Cruelty to Animals Act). Państwem, które jako pierwsze wprowadziło prawo do zapewnienia dobrostanu zwierzętom, były Stany Zjednoczone (Animal Welfare Act w 1966 r.; 4, 5). Postęp nauki stale zwiększa możliwości rozpoznawania i leczenia wielu chorób ludzi i zwierząt, w warunkach możliwie najlepszej jakości życia pacjenta (quality of life – QOL). Ten postęp wymaga użycia zwierząt do oceny przydatności osiągnięć nauk biomedycznych (2).

Niezależnie od badań podstawowych, głównie z zakresu fizjologii i patofizjologii, najważniejsze prace doświadczalne związane są z opracowywaniem i wprowadzaniem do użytku nowych leków, biopreparatów, jak szczeniaki czy przeciwciała monoklonalne oraz innowacyjnych procedur medycznych. To uzasadnia wykorzystywanie zwierząt w nauce i jest akceptowane przez opinię publiczną pod warunkiem jednak, że w ślad za przyzwoleniem na prowadzenie eksperymentu tworzone jest prawne zabezpieczenie interesów i dobrostanu zwierząt doświadczalnych. Zgoda na eksperyment jest uzależniona od tego, czy został spełniony najwyższy nakaz etyczny wobec zwierzęcia (3).

Oszacowanie zysków i możliwych strat, jakie ponoszą zwierzęta w eksperymencie, wobec zysków i strat, jakie człowiek uzyskuje w wyniku takiego doświadczenia, jest wyrazem utylitaryzmu, poglądu, jaki dominuje w społeczeństwach zachodnich. Zgodnie z takim podejściem, u podstaw każdego eksperymentu powinna znajdować się ocena, czy w warunkach doświadczenia zachowany jest dobrostan gatunku wykorzystywanych zwierząt. Z naukowego punktu widzenia, korzyści muszą zdecydowanie przeważać nad ujemnymi skutkami eksperymentu, wszystkie niedogodności oraz inwazyjność procedur muszą być możliwie najmniejsze, a poziom dobrostanu zwierząt – możliwie najwyższy. Taka postawa bowiem najpełniej gwarantuje otrzymanie wiarygodnych wyników, pozwalających na obiektywną analizę założeń i celu projektu badawczego (5).

Z punktu widzenia obrońców praw zwierząt interes człowieka i zwierzęcia jest porównywalny. Przeciwnie do

utilitaryzmu jednak, nie uznają oni usprawiedliwiania korzyści naukowych niemoralnymi względami, bowiem nie wolno poświęcać interesu jednej istoty dla korzyści innej istoty. W warunkach laboratoryjnych zwierzę jest traktowane do słownie jak część doświadczenia, jak narzędzie, oddzielane od grupy wbrew jego naturalnemu instynktowi i zachowaniom przynależnym gatunkowi.

W eksperymencie wykorzystywane są żywe zwierzęta albo tylko ich narządy. To oznacza konieczność poddawania zwierząt doświadczalnych eutanazji. Również wtedy, gdy zwierzę przeżyje eksperyment, na koniec doświadczenia jest uśmiercane, ponieważ nie można go wykorzystać powtórnie, a możliwy dystres i cierpienie po stosowaniu procedur przemawiają jednoznacznie za takim rozwiązaniem. Pewne procedury, jak oznaczanie LD₅₀, z góry zakładają śmierć zwierząt w trakcie doświadczenia. Śmierć jest w istocie zawarta w celu doświadczenia lub testu (2).

Zasady prowadzenia humanitarnych i odpowiedzialnych badań *in vivo* jako pierwsi sformułowali Rex L. Burch i William Russell i ogłosili je w 1959 r. – „The principles of humane experimental technique” (6). W ciągu minionych 58 lat, zgodnie z przedstawioną przez nich zasadą 3R, znacząco zmniejszyło się bezrefleksyjne wykorzystywanie zwierząt i ograniczono wydatnie inwazyjność stosowanych procedur w doświadczeniach z ich użyciem. Pierwsze lata XXI w. przyniosły znaczący postęp w pracach nad opracowaniem jednolitej platformy prawnej, obowiązującej w krajach Wspólnoty Europejskiej odnośnie do ochrony interesów zwierząt, wykorzystywanych w doświadczeniu i doprowadziły do przyjęcia przez Parlament Europejski dyrektywy 2010/63 (Directive 2010/63 EU; 11).

Dyrektywa 2010/63 została przyjęta przez wszystkie kraje UE i stopniowo wprowadzana jest w życie, zgodnie z ustawodawstwem poszczególnych członków Wspólnoty. W Polsce została przyjęta w postaci ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych (Dz.U. 2015, z 26 lutego 2015 r. poz. 266) i weszła w życie 27 maja 2015 r. (7). W myśl przyjętych zobowiązań prawnych, nasz kraj podjął się przestrzegania postanowień dyrektywy, a więc także wprowadzania zasady 3R. W ciągu ostatnich 10 lat znajomość zasady 3R bardzo wzrosła w środowiskach naukowców i producentów preparatów leczniczych. Zaangażowanie w praktyczną realizację tej zasady przynosi wymierne korzyści w postaci rozwoju nowych biotechnologii oraz dokonywania odkryć naukowych i ich wykorzystywania w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt (3).

Trzy „R” to kolejno: Replacement, Reduction, Refinement

Replacement (zastąpienie/zastępowanie)

Oznacza to zastosowanie metod, które pozwalają uniknąć wykorzystania lub zastąpić zwierzęta w badaniach bądź testach, w których są albo mogłyby zostać użyte. W niektórych przypadkach, wstępne lub względne zastąpienie jest stosowane jako pierwszy etap bezwzględnej eliminacji zwierząt z doświadczenia – jest to zastąpienie wyższych zwierząt kręgowych przez hodowle tkankowe lub komórkowe, przez embriony kręgowców albo przez zwierzęta bezkręgowce. Przykładami takiego postępowania są: wykorzystanie ludzkich tkanek bądź komórek; stałych linii komórkowych lub komórek i tkanek pobranych od zwierząt, które użyto wyłącznie do tego celu, nieobjętych ochroną prawną płodów kręgowców czy zwierząt bezkręgowych, jak muszka owocowa *Drosophila melanogaster*, robaki – *Caenorhabditis elegans* lub śluzowce – *Dictyostelium*; oraz wykorzystanie modeli matematycznych lub komputerowych. Szczególnie chętnie naukowcy sięgają po modele komputerowe, te bowiem stanowią rodzaj zamkniętych układów badawczych, w których możliwa jest pełna kontrola warunków doświadczalnych i gdzie można uzyskać dużą pulę informacji wstępnych, co pozwala właściwie zaplanować przebieg koniecznego w badaniach eksperymentu *in vivo*. Symulacje komputerowe pozwalają przewidzieć różnorodne efekty biologiczne i toksyczne substancji o możliwych działaniach terapeutycznych. Programy Computer Aided Drug Design (CADD) są stosowane, gdy trzeba przewidzieć wiązanie substancji do centrum aktywnego receptora komórkowego i pozwalają uniknąć testowania tych związków, które nie będą wykazywać aktywności biologicznej. Użycie zwierząt nie jest w tym przypadku konieczne. Można też za pomocą programu komputerowego ustalić, jak dostosować testowany ligand (lek) do receptora i sprawdzić to w ostatniej fazie badań, już z użyciem zwierząt. Ich liczba będzie wówczas minimalna. Wprowadzanie modeli narządów (organ on chips) sprawdza się m.in. w kardiologii i w badaniach nad patomechanizmem astmy (1, 2, 3).

Takie modele są też używane w badaniach przerzutowania nowotworów złośliwych (8) i nad komórkami hematopoetycznymi (9). Obecnie testowanie drażniącego działania rozmaitych substancji stosowanych w kosmetyce i składników leków prowadzi się już tylko na komórkach hodowanych *in vitro*, a nie na oku królika, jak to było przez lata; 2, 3).

Reduction (zmniejszenie/ograniczenie)

Postępowanie to obejmuje metody, które pozwalają na zmniejszenie całkowitej liczby zwierząt użytych w doświadczeniu lub teście i uzyskanie porównywalnego zakresu danych (informacji) z użyciem mniejszej ich liczby lub większej liczby danych od tej samej liczby zwierząt. Przykłady tego postępowania to ulepszenie projektu doświadczenia i analizy statystycznej, dzielenie się wynikami i zasobami (np. zwierzętami i aparaturą) między grupami badawczymi, stosowanie technik, jak obrazowanie, które pozwala na prowadzenie długotrwałych obserwacji u zwierząt jednej grupy.

Refinement (udoskonalenie)

Postępowanie to obejmuje metody, które radykalnie minimalizują ból, cierpienie, dystres lub trwałe urazy, jakich mogą doświadczać zwierzęta, i równie znacząco poprawiają ich dobrostan. Udoskonalenie odnosi się do wszystkich aspektów wykorzystywania zwierząt, począwszy od warunków ich utrzymania do warunków, w jakich prowadzony jest eksperyment. Przykłady tego postępowania to stosowanie odpowiednich anestetyków i środków przeciwbólowych, zapobieganie stresowi przez przyuczenie zwierząt do pewnych procedur, jak pobieranie krwi; zapewnienie zwierzętom właściwych warunków utrzymania i wzbogacenie środowiska, co pozwala na utrzymanie zachowań typowych dla danego gatunku.

Zachowanie każdej z tych zasad z osobna jest jednocześnie krokiem w kierunku przestrzegania pozostałych. Przestrzeganie 3R z jednej strony gwarantuje, że dolegliwość procedur doświadczalnych dla zwierząt jest stale ograniczana, a z drugiej wymusza na naukowcach poszukiwanie nowych metod badawczych wysokiej jakości, skłania do współpracy, tak aby zwierzęta użyte podczas jednego eksperymentu mogły być wykorzystane jako źródło danych także przez inną grupę badawczą. Przemysłane i dobrze przygotowane 3R nie tylko zmniejszają cierpienia zwierząt, ale mogą wydatnie przyczynić się do lepszego zrozumienia procesu chorobowego i zwiększyć korzyści naukowe, jakie wynikają z badań – ku przyszłemu pożytkowi pacjentów. Gdy nie ma pewności, czy doświadczenie powoduje ból lub dystres, każda wątpliwość ma być rozważana z punktu widzenia korzyści i dobrostanu zwierzęcia.

W związku z wejściem w życie 7 maja 2015 r. ustawy o ochronie zwierząt

wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych, Polskie Stowarzyszenie Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (Polish Laboratory Animals Science Association – PolLASA; patrz: www.pollasa.pl) bezzwłocznie zorganizowało i przeprowadziło w naszym kraju liczne kursy i szkolenia dla osób zaangażowanych w prowadzenie badań i opiekę nad zwierzętami, biorącymi udział w doświadczeniach. Wśród szkolonych ważną grupę stanowili lekarze weterynarii, którzy po takim kursie są wyznaczani do wykonywania i nadzorowania przebiegu procedur oraz do uśmiercania zwierząt. Jest ze wszech miar pożądane, aby zespoły naukowe miały w swoim składzie lekarzy weterynarii lub podczas realizacji projektów korzystały ze stałej współpracy z lekarzami wyznaczonymi.

Na świecie liczba organizacji i stowarzyszeń zaangażowanych w ochronę i zapewnienie dobrostanu zwierząt wykorzystywanych dla celów naukowych jest bardzo duża. Wydawanych jest też wiele czasopism poświęconych metodom badań naukowych z wykorzystaniem zwierząt. Wśród krajów, które mają największe zasługi w tworzeniu prawnych ram ochrony zwierząt doświadczalnych, są: Wielka Brytania i Kanada. Oto przydatne adresy:

- Laboratory Animals Veterinary Association: <http://www.lava.uk.net/>
- National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs): <http://www.nc3rs.org.uk/>; Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA): <http://www.rspca.org.uk/>

A oto przykłady organizacji i czasopism tworzących forum wymiany poglądów i doświadczeń na tematy związane z zasadą 3R: Alternatives to Laboratory Animals (ATLA), Animal Welfare (Animal Welfare), Applied Animal Behaviour Science (AABS), BioMed Search (biomedsearch.com), Journal of Experimental Animal Science (JEAS), Lab Animal (LabAnimal), Laboratory Animals (Laboratory Animals), Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science (Scandinavian Journal), Animal Ethics Dilemma (Dilemma), Animal Ethics Infolink (Ethics), Doctors&Lawyers for Responsible Medicine (DLRM), Physicians Committee for Responsible Medicine (PCRM), Understanding Animal Research (UAR), SABRE Research UK (Sabre), Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI), European Chemicals Industry Council (CEFIC), In Vitro Testing Industrial Platform (IVTIP), Laboratory Animal Breeders Association (LABA), Animal Welfare Institute (AWI), Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC), Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching

(ANZCCART), British Veterinary Association Animal Welfare Foundation (BVA-AWF), Canadian Council on Animal Care (CCAC), Humane Society of the United States (HSUS), Institute of Animal Technology (IAT), Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), Naturewatch (Naturewatch), NIH Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW).

Piśmiennictwo

1. Baker M.: Tissue models: A living system on a chip. *Nature* 2011, **471**, 661–665.
2. Burden N., Chapman K., Sewell F., Robinson V.: Pioneering better science through the 3Rs: An introduction to the national centre for the Replacement, Refinement and Reduction of animals in research (NC3Rs). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2015, **54**, 198–208.
3. Doke S.K., Dhawale S.C.: Alternatives to animal testing. A review. *Saudi Pharm. J.* 2015, **23**, 223–229.
4. Franco N.H., Olsson I.A.S.: Scientists and the 3Rs: attitude to animal use in biomedical research and the effect of mandatory training in laboratory animal science. *Lab. Anim.* 2014, **48**, 50–60.
5. Graham M.L., Prescott M.J.: The multifactorial role of 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *Eur. J. Pharm.* 2015, **759**, 19–29.
6. Russell W.M.S., Burch R.L.: *The principle of humane experimental technique*. Universities Federation for Animal Welfare, 1959. Potters Bar, England.
7. http://www.nauka.gov.pl/g2/oryginal/2017_01/561a-b8714aa71c0f425e92c00200f7b.pdf.
8. http://www.nature.com/nrd/journal/v14/n4/fig_tab/nrd4539_F2.html.
9. http://www.nature.com/nrd/journal/v14/n4/fig_tab/nrd4539_F3.html.
10. http://www.nature.com/nrd/journal/v14/n4/fig_tab/nrd4539_F1.html.
11. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en>.

Dr Ada Schollenberger,
e-mail: ada_schollenberger@sggw.pl