

<p>Reducerea riscului pentru sănătate de la expunerea la produse chimice pe tot parcursul ciclului lor de viață prin intensificarea activităților de protejare a sănătății de către sectorul sănătății la nivelele național, regional și internațional, precum și un interes mai mare, sensibilizarea sectorului sănătății și a comunității în general.</p>	<p>Implicare sporită a sectorului sănătății în eforturile de cooperare, pentru a acoperi lacunele actuale în cunoștințele și metodologiile de evaluare a riscurilor, biomonitoring, supraveghere, estimând povara bolii, precum și de măsurare a progreselor. Aceasta include o mai mare participare la rețele și dezvoltarea unor noi mecanisme de cooperare, pentru a facilita schimbul de cunoștințe și colaborarea în cadrul sectorului sănătății cu privire la aspectele tehnice specifice.</p>	<p>Sporirea potențialului și a capacității de adaptare a sistemelor de sănătate, în scopul abordării aspectelor inofensivității chimice.</p>	<p>Creșterea gradului de conștientizare și de angajare a sectorului sănătății în activitățile de gestionare a substanțelor chimice la nivelele național, regional și internațional, inclusiv prin colaborarea cu alte sectoare, ceea ce duce la creșterea profilului și priorității pentru gestionarea inofensivă globală a substanțelor chimice pe parcursul ciclului lor de viață.</p>
---	--	--	--

Astfel, activitățile axate pe "Reducerea riscului, Cunoștință și evidență, Capacitate instituțională, Conducere și coordonare" sunt măsuri specifice pentru implicarea sectorului de sănătate în realizarea obiectivului 2020 al SAICM la nivel național.

Concluzii

Implicarea sectorului sănătății al Republicii Moldova în cadrul SAICM reprezintă un factor-cheie pentru punerea în aplicare efectivă a gestionării durabile a substanțelor chimice și pentru reducerea la minim a riscului și a impactului negativ asupra sănătății al substanțelor chimice pe parcursul ciclului lor de viață.

Bibliografie

1. *Strategic Approach to International Chemicals Management*. SAICM texts and Resolutions of the International conference on Chemicals Management, Geneva, 2007, p. 215.
2. *Strategy for strengthening the engagement of the health sector in the implementation of the Strategic Approach*.

http://www.who.int/ipcs/capacity_building/chemicals_management/saicm_iccm3_en.pdf

3. *The role of the health sector in the Strategic Approach to International Chemicals Management towards the 2020 goal and beyond*. The Sixty-ninth World Health Assembly. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_ACONF6-en.pdf
4. *2030 Agenda for Sustainable Development*. http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E
5. Resolution WHA69.4: *The role of the health sector in the Strategic Approach to International Chemicals Management towards the 2020 goal and beyond*. <http://www.who.int/ipcs/publications/wha/en/>
6. *The role of the health sector in the Strategic Approach to International Chemicals Management towards the 2020 goal and beyond*: Consultation with Member States. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/315927/66wd06e_Add.2_Chemicals_160631.pdf ua=1
7. *Priorities of the health sector towards achievement of the 2020 goal of sound chemicals management*. Results of WHO consultation. http://www.who.int/ipcs/consultation_health_sector_priorities.pdf

METODE DE ALTERNATIVĂ DE TESTARE A TOXICITĂȚII

Elena JARDAN, Raisa SÎRCU, Iurie PÎNZARU,
Centrul Național de Sănătate Publică
al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova

Summary

Alternative methods for toxicity testing

Were studied the alternative methods for toxicity testing of chemicals and mixtures. Replacement, reduction and refinement of animal testing alternatives are considered scientific principles "3R" required in order to protect animals used for experimental purposes. Implementation in vitro research is reflected in the activities of regulatory authorities.

Keywords: *alternative methods, toxicity, chemicals, in vitro*

Резюме

Альтернативные методы тестирования токсичности

Были изучены альтернативные методы тестирования токсичности веществ / химических смесей. Замена, восстановление и совершенствование являются научными принципами в целях защиты животных, используемых для экспериментальных целей. Внедрение исследований in vitro отражается в деятельности регулирующих органов.

Ключевые слова: *альтернативные методы, токсичность, химические вещества, in vitro*

Introducere

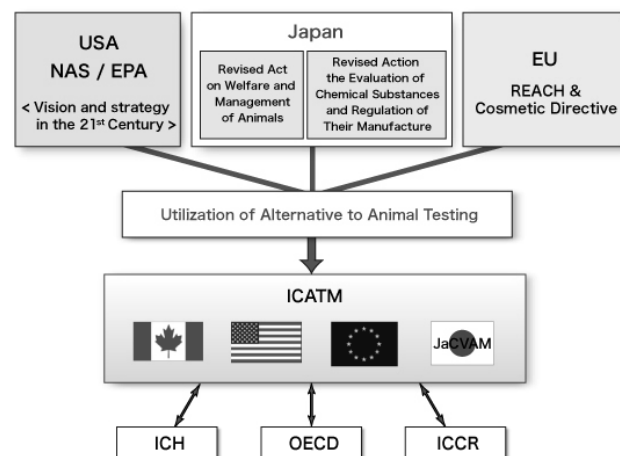
Pentru a preveni toxicitatea, iritarea și corozivitatea, precum și alți indicatori, testarea tradițională a substanțelor și amestecurilor chimice, a produselor de larg consum a implicat utilizarea animalelor. Astăzi însă, oamenii de știință au elaborat și au validat metode de alternativă, care să conducă spre utilizarea produselor mai sigure pentru sănătatea umană decât testarea pe animale. Metodele de alternativă de testare sunt elaborate și implementate pentru a evita sacrificarea animalelor.

O preocupare majoră cu privire la utilizarea animalelor de laborator pentru studiile de toxicitate și de alte efecte asupra sănătății a condus spre aderența la principiul "3R" (*Replacement, Reduction and Refinement*, ceea ce înseamnă *înlocuire, reducere și perfecționare*) de utilizare a animalelor în dezvoltarea metodelor de alternativă de testare, definit de către savanții William Russell și Rex Burch în *Principiile tehnice ale experimentelor umane* (1959). Ca urmare, au fost elaborate metode noi, pentru a înlocui utilizarea animalelor cu modele ne-animale, a reduce numărul de animale într-un test și a perfecționa procedurile de testare, în scopul cruțării animalelor luate în studiu. Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (publicată la 20 octombrie 2010) include o referire explicită la principiul "3R".

Conform Laboratorului Uniunii Europene de Referință în Metodele de Alternativă de Testare, termenul "de alternativă" este asociat în general cu principiile "3R". În acest context, o metodă de alternativă constă în înlocuirea pe deplin a unui test pe animale. Metodele de testare de alternativă sunt bazate fie pe sisteme *in vitro* sau *in silico*, *in situ* sau pe modele computerizate.

Așadar, metodele de alternativă de testare a toxicității sunt dezvoltate și implementate pentru a evita utilizarea animalelor. Există un consens că reducerea numărului de animale și perfecționarea metodelor de testare în scopul reducerii suferinței ar trebui să fie obiective importante pentru industriile implicate [3]. În acest sens, țările care fac parte din Cooperarea Internațională privind Metodele de Alternativă de Testare (ICATM), la 27 aprilie 2009 au semnat un memorandum de cooperare, care ar putea reduce numărul de animale necesare pentru testarea siguranței produselor de larg consum la nivel mondial (*vezi schema*) [4].

Cooperarea Internațională privind Metodele de Alternativă de Testare



Scopul lucrării de față constă în studierea și identificarea metodelor de alternativă de testare a toxicității, precum și implementarea acestora în cercetările autohtone.

Materiale și metode

A fost utilizată metoda de analiză a surselor bibliografice, cu selectarea bibliografiei la tema dată, evidențierea experienței țărilor și organismelor internaționale în domeniul cercetării substanțelor și amestecurilor chimice utilizând metode de alternativă de testare a efectelor toxice asupra sănătății.

Rezultate și discuții

Înlocuind testele efectuate pe animale nu înseamnă că populația umană este expusă unui risc. Însă dezvoltarea metodelor noi întotdeauna întâmpină obstacole birocratice în implementarea acestora.

Alternativele de bază pentru testarea pe animale *in vivo* sunt tehnicile de cultură celulară *in vitro* și *in silico* – simularea pe calculator [5].

Termenul *in vitro* ("în sticlă") se referă la tehnica de realizare a unui experiment într-un tub de testare, sau, în general, într-un mediu controlat, în afara unui organism viu. În instituțiile științifice, metodele *in vitro* se bazează pe utilizarea de celule sau țesuturi care sunt cultivate în condiții controlate, în butelii și plăci. Celulele / țesuturile sunt expuse la substanțe chimice și este măsurat efectul lor toxic. Culturile de celule sunt folosite tot mai des, deoarece acestea sunt capabile să anticipeze posibilele efecte asupra oamenilor. Metodele de testare *in vitro* utilizează țesuturi (reconstituite), celule întregi sau părți de celule, denumite *culturi celulare* provenite din ingineria tisulară. Aceste combinații *in vitro* permit o analiză cuprinzătoare a impactului unui produs chimic la

nivel molecular și pot determina căile potențiale de toxicitate, care pot duce la efecte negative asupra sănătății [6].

De curând, testele *in vitro* pentru evaluarea toxicității xenobioticilor sunt luate în considerare de instituțiile guvernamentale cheie (de exemplu, instituțiile de sănătate publică, agențiile pentru protecția mediului etc.) în scopul evaluării riscurilor umane.

Unii toxicologi cred că metodele de testare *in vitro* pot fi mult mai utile și cost-eficiente decât studiile de toxicitate pe animale vii (care sunt denumite *in vivo*). Din cauza constrângerilor de reglementare și din considerații etice, căutarea de alternative la testarea pe animale a câștigat un nou impuls. În multe cazuri, testele *in vitro* sunt mai bune decât testele pe animale, deoarece acestea pot fi folosite pentru a dezvolta produse mai sigure [10].

Expresia *in silico* semnifică "efectuate pe calculator sau prin simulare pe calculator". Sintagma a fost inventată în anul 1989 ca o analogie la expresiile latine *in vivo* și *in vitro*, care sunt frecvent utilizate și se referă la experimentele efectuate pe organisme vii și, respectiv, în afara organismelor vii. Abordările bazate pe computer (denumite adesea și metode *in silico*) devin din ce în ce mai răspândite și pot fi utilizate în mod eficient pentru a prezice toxicitatea unei substanțe chimice reieșind din proprietățile ei de bază.

Un șir de metode *in vitro* de testare a toxicității se folosesc pentru analiza citotoxicității. În acest scop, au fost elaborate aproape 50 de metode de alternativă diferite, strategii de testare validate și/sau acceptate de către autoritățile internaționale de reglementare. Iată câteva exemple:

- *EPISKIN™, EpiDerm™ și SkinEthic*, fiecare compus din piele artificială umană, pot salva iepuri/cobai în fiecare an de la testele dureroase de coroziune și iritare a pielii.
- *Opacitatea corneei la bovine, Testul de permeabilitate și Izolarea ochiului la pui* pot utiliza ochii de la animale sacrificate din industria cărnii în loc de iepuri vii, pentru a detecta produsele chimice care dispun de proprietăți de iritare asupra membranelor mucoase ale ochilor.
- *Testul redus pe ganglioni limfatici* pentru aprecierea sensibilizării pielii face posibilă reducerea utilizării animalelor cu până la 75%, comparativ cu testele tradiționale pe cobai și rozătoare.
- *Testele pe sânge de bovină și embrionii de găină* reprezintă metode de alternativă de testare a proprietăților alergice și a efectelor nefaste asupra sănătății condiționate de utilizarea produselor cosmetice, ceea ce va reduce cobaii în experiment.

În acest context, *Directiva privind produsele cosmetice* prevede cadrul de reglementare pentru

eliminarea treptată a testării pe animale a produselor cosmetice. Aceasta stabilește interdicții împotriva testării produselor finite și ingredientelor utilizate la producerea cosmeticelor pe animale (interzicerea testării) și interzicerea plasării pe piața Uniunii Europene a produselor finite și a ingredientelor cosmetice care au fost testate pe animale (interdicție de introducere pe piață). Aceleași prevederi sunt incluse și în Regulamentul Uniunii Europene 1223/2009 privind produsele cosmetice, care înlocuiește Directiva privind produsele cosmetice din data de 11 iulie 2013 [7].

În 2007 a intrat în vigoare legislația Uniunii Europene privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH EC 1907/2006). Scopul REACH este de a proteja sănătatea umană și mediul, prin identificarea timpurie a proprietăților toxice ale substanțelor chimice. Aceasta promovează utilizarea unor metode de alternativă pentru testarea pe animale prin articolul 25.1, care spune: „pentru a evita testarea pe animale, testele pe animale vertebrate, în sensul prezentului regulament, se efectuează numai în ultimă instanță. De asemenea, este necesar să se ia măsuri de limitare a duplicării altor teste”.

Odată cu adoptarea REACH, Comisia Europeană a publicat metodele standardizate și acceptate pentru testarea proprietăților periculoase ale substanțelor chimice. Acestea au fost scrise în *Regulamentul privind metodele de testare* [9].

Studiile pe persoane voluntare de asemenea reprezintă o alternativă la metodele de testare pe animale. Progresele rapide tehnologice au permis dezvoltarea unor proceduri de înregistrare, care pot fi folosite pentru a studia în siguranță voluntarii umani. Tehnologia de studiere a iritației / coroziunii pielii persoanelor umane le permite cercetătorilor să înțeleagă efectele toxice prin compararea cu voluntarii sănătoși [10].

În ultimii 10 ani, în Republica Moldova, toxicologia a progresat rapid, transformându-se dintr-o disciplină descriptivă în una capabilă să explice impactul efectelor toxice asupra sănătății publice. Cunoașterea mecanismelor prin care se produc efectele toxice este importantă, deoarece permite identificarea cauzei toxicității, contribuie la prevenirea toxicității prin metode chimice sau biologice, precum și crearea unei baze de date privind toxicitatea *in vivo/in vitro* [15].

Metodele de alternativă de testare a toxicității se regăsesc și pe agenda de activitate a Laboratorului *Toxicologie Experimentală* din cadrul Centrului Național de Sănătate Publică din Republica Moldova, unde se organizează testări experimentale pe

modele biologice, utilizând metode contemporane preluate din ghidurile OECD (Organizația pentru Dezvoltare și Cooperare Economică), aprobate în modul stabilit prin ordinul Ministerului Sănătății nr. 189 din 13.03.2014 *Cu privire la aprobarea pentru utilizare pe teritoriul Republicii Moldova a metodelor de testări toxicologice din domeniul supravegherii de stat a sănătății publice*. În laboratorul nominalizat, cu excepția testelor la toxicitate acută, subacută efectuate *in vivo*, se utilizează metode de alternativă de studiere a toxicității produselor și articolelor de larg consum *in vitro*, și anume: determinarea DL50 și a proprietăților de sensibilizare pe cultura celulară, determinarea indicatorului de toxicitate a produselor pe cultură. Este implementată metoda de evaluare a toxicității acute și subcronice pe cultura celulară *Tetrahymena Pyriformis*, care este o metodă *in vitro* destul de progresistă, oferind un coeficient de cumulare și clasa de pericol a extractelor de substanțe chimice pentru sănătatea umană, precum și metoda de determinare a indicatorului de toxicitate pe material semincer de bovine.

Astfel, în anul 2014 au fost supuse cercetărilor toxicologice pe *Tetrahymena Pyriformis* 7 probe și 84 investigații, iar în anul 2015 – 25 probe și 300 investigații. Concomitent, se atestă o creștere considerabilă a numărului absolut al cercetărilor privind indicatorul de toxicitate al produselor alcătuite din mase plastice, hârtie, textile etc. – de la 10 mostre în anul 2014 la 265 mostre în 2015.

Conform domeniului de acreditare (Certificatul de Acreditare nr. LÎ-044 din 10.09.2015), sunt organizate încercări de laborator *in vitro*, iar rezultatele cercetărilor toxicologice sunt descrise într-un raport bine structurat și recunoscut în țările unde se utilizează metode simetrice. Procedurile de testare pe modele de alternativă sunt descrise în indicațiile metodice aprobate [11, 12, 13].

Datele statistice arată că, în anul 2014, în laborator erau cercetate anual 737 probe, pe când în anul 2015 numărul probelor cercetate a constituit 1229 ori cu 59% mai multe, comparativ cu 2014. Evaluarea datelor privind cercetările toxicologice ale produselor cosmetice, chimice de menaj, materialelor polimerice etc. a demonstrat că numărul probelor investigate este într-o continuă creștere, constituind 13 probe în anul 2000, față de 737 în 2014, și 1229 în 2015, iar numărul de investigații a sporit de la 150 la 4420. În Laboratorul *Toxicologie Experimentală* au fost implementate 7 metode [14].

Concluzii

Astfel, a fost dovedit faptul că metodele de alternativă de testare a toxicității prezintă un interes

deosebit pentru sistemul de sănătate publică din Republica Moldova. Prin testele de toxicitate *in vitro* se realizează o analiză științifică a efectelor substanțelor chimice toxice asupra celulelor de mamifere. Metodele de testare sunt folosite pentru a identifica substanțele chimice potențial periculoase și/sau pentru a confirma absența anumitor proprietăți toxice în stadiile incipiente ale dezvoltării unor noi substanțe utile, cum ar fi medicamente, produse de uz fitosanitar și fertilizanți, aditivi alimentari.

Bibliografie

1. Russell W., Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959.
2. Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.
3. R. E. Hester, R. M. Harrison et al. *Alternatives To Animal Testing (Issues in Environmental Science and Technology)*. Royal Society of Chemistry; 1 edition, June 7, 2006.
4. NIH. *Reducing the Number of Animals in Research Testing*. Retrieved 24 Apr. 2014.
5. Lipinski Christopher; Hopkins A. *Navigating chemical space for biology and medicine*. In: *Nature*, 2004, 432 p.
6. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/glossary/glossary/alternative-test-methods>.
7. Regulamentul Parlamentului European și al Consiliului Uniunii Europene nr. 1223/2009 privind produsele cosmetice.
8. Regulamentul Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, restricționarea și autorizarea substanțelor chimice (REACH).
9. Regulamentul nr. 440/2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH).
10. *National Toxicology Program*. Vision and Roadmap for the 21st Century.
11. Iurie Pînzaru, Elena Jordan, Ala Oatu. *Evaluarea toxicologică rapidă de laborator a articolelor polimerice, pe cultura celulară Tetrahymena Pyriformis*. Indicații metodice nr. 352 din 13.05.2016, 18 p.
12. Iurie Pînzaru, Ștefan Constantinovici, Valeriu Penedelcu, Elena Jordan. *Metode de determinare și evaluare a unor indici toxicologici și clinici ai siguranței și inofensivității unor categorii de produse cu impact potențial asupra sănătății*. Indicații metodice nr. 341 din 15.04.2014, 21 p.
13. T. Stratulat, R. Sîrcu, Șt. Constantinovici ș.a. *Determinarea indicelui de toxicitate al produselor polimerice, chimice de menaj, cosmetice și articolelor din hârtie*. Indicații metodice nr. 5 din 18.10.2011, 12 p.
14. *Supravegherea de stat a sănătății publice în Republica Moldova* (Raport Național, 2015), p. 44-57.
15. Felicia Loghin. *Toxicologie generală*. Cluj-Napoca: Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", 2002, 213 p.