

БІОЕТИЧНІ АСПЕКТИ МЕТОДОЛОГІЇ ГІДРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Романенко О.В., Груша М.М.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
пр. Перемоги, 34, 03057, м. Київ
g_mykhaylo@meta.ua

У статті висвітлюється розвиток уявлень про біоетичні аспекти дослідницької діяльності. Враховуючи актуальність розроблення моделей, що характеризують перебіг процесів у гідроєкосистемах загалом, а також в окремих гідробіонтах, потребу у вивченні механізмів адаптації організмів до чинників навколишнього середовища, у з'ясуванні характеру біотичних зв'язків у екосистемах, у впровадженні методів біотестування та біоіндикації, авторами розглядаються застосування норм і принципів біоетики в методології гідробіологічних досліджень, сучасні вимоги до умов використання в науковій та освітній роботі водяних тварин. Акцентується увага на питаннях планування і проведення відповідних досліджень з урахуванням дотримання ключових біоетичних аспектів організації наукової діяльності, з якими мають кореспондуватися: наукові або освітні цілі роботи і її спрямування на забезпечення потреб у підтриманні належного стану навколишнього природного середовища, представників тваринного світу, в отриманні нових знань у галузях гідроекології та гідробіології; мета експерименту й обґрунтування вибору виду, джерела та кількості водяних тварин для його проведення; передбачені експериментальні процедури і способи мінімізації та попередження дискомфорту, больових відчуттів, тривалого погіршення функціонального стану в досліджуваних водяних тварин; вибір гуманних кінцевих точок експерименту; необхідні для проведення експериментального дослідження обізнаність персоналу, інфраструктура, ресурси тощо. Обговорюються запропоновані міжнародною науковою спільнотою новітні вимоги до методології експериментальної роботи з використанням хребетних і безхребетних тварин, а також змістовне наповнення рекомендацій із цього питання. Деталізується значення документування дотримання біоетичної складової частини під час планування та проведення наукових досліджень, а також оприлюднення їх результатів. Обговорюються сучасні тенденції щодо розширення переліку таксономічних груп водяних безхребетних тварин, включення яких у дослідження має супроводжуватися дотриманням чинних норм і принципів біоетики. *Ключові слова:* гідробіологічні дослідження, методологія, біоетика, водяні тварини, ракоподібні.

Bioethical aspects of hydrobiological research methodology. Romanenko O., Hrusha M.

The article highlights the development of conception about bioethical aspects of research. Given the relevance of developing models that characterize the processes in hydroecosystems in general, as well as in individual aquatic animals, the need to study the mechanisms of adaptation of organisms to environmental factors, to clarify the nature of biotic relationships in ecosystems, to implement methods of biotesting and bioindication, the authors consider the application of norms and principles of bioethics in the methodology of hydrobiological research, modern requirements for the conditions of use in scientific and educational work of aquatic animals. Emphasis is placed on planning and conducting relevant research, taking into account compliance with key bioethical aspects of the organization of scientific activities, which should correspond, inter alia: scientific or educational goals of research and its direction to meet the needs of maintaining the proper environment, wildlife, gaining new knowledge in the fields of hydroecology and hydrobiology; the purpose of the experiment and justification of the choice of species, source and number of aquatic animals for its implementation; experimental procedures and methods of minimization and prevention of discomfort, pain, long-term deterioration of the functional state in the studied aquatic animals are provided; selection of humane endpoints of the experiment; infrastructure, resources, staff awareness necessary for the experimental study. The latest requirements to the methodology of experimental work with the use of vertebrates and invertebrates proposed by the international scientific community are discussed, as well as the content of recommendations on this issue. The importance of documenting compliance with the bioethical component in the planning and conduct of research, as well as the publication of their results is detailed. Current trends to expand the list of taxonomic groups of aquatic invertebrates, the inclusion of which in the study should be accompanied by compliance with modern norms and principles of bioethics, are discussed. *Key words:* hydrobiological research, methodology, bioethics, aquatic animals, crustaceans.

Для розроблення моделей, що характеризують перебіг процесів у гідроєкосистемах загалом, а також в окремих організмах гідробіонтів, актуальним є використання результатів відповідних експериментальних досліджень [1, 2]. Вони необхідні для з'ясування особливостей фізіологічних і біохімічних процесів у водяних тварин, зокрема пов'язаних з адаптацією організмів до чинників навколишнього середовища, для моделювання відносин між гідробіонтами в екосистемах, для розроблення і впровадження методологій біотестування та біоіндикації тощо.

Оскільки практична спрямованість відповідних наукових напрямів і сучасної біологічної та екологічної освіти передбачає використання водяних тварин в експериментальній роботі, особливої актуальності набувають питання, пов'язані з біоетичними аспектами проведення досліджень у галузях гідробіології та гідроекології [3, 4]. Такі дослідження мають бути етично виправданими і відбуватися лише після попереднього науково обґрунтованого визначення необхідного для досягнення відповідних наукових або освітніх цілей мінімуму кількості залучених тварин.

При цьому ключовим питанням організації згаданих досліджень має бути забезпечення заподіювання якомога меншого болю та/або страждань останнім. Виходячи з відзначеного вище, безпосереднє використання тварин в експериментальній роботі та в освітньому процесі зумовлює необхідність урахування та безумовного дотримання у структурі відповідних досліджень саме сучасних біоетичних норм, спрямованих, зокрема, на уникнення використання хребетних тварин, за можливості застосування інших методичних підходів, а якщо за останнього саме досягнення планованих цілей дослідження неможливе, тоді потрібно спрямувати зусилля на удосконалення його протоколу з метою мінімізації як чисельності піддослідних тварин, так і больових відчуттів і страждань у них [5, 6]. На ці питання ми звертали увагу в наших попередніх працях [3, 4], проте стрімкий розвиток науково обґрунтованих уявлень про особливості життєдіяльності представників тваринного світу, чутливості водяних тварин до широкого кола чинників навколишнього середовища актуалізує необхідність подальшого обговорення проблеми дотримання біоетичних норм у плануванні та проведенні експериментальних досліджень із використанням хребетних та безхребетних тварин.

Окрім вже згаданих принципів, що мають братися до уваги як на етапі планування дослідницької роботи, так і на етапі безпосереднього проведення експериментів із використанням водяних тварин, варто звернути увагу і на інші питання, які безпосередньо пов'язані зі згаданими вище. До них можна віднести: 1) наукові або освітні цілі, досягнення яких передбачається з використанням піддослідних тварин; 2) урахування відповідності експерименту потребам підтримання здоров'я чи добробуту людей, стану навколишнього природного середовища, належних умов існування тварин; 3) вдосконалення екологічних та біологічних знань тощо. Окрім того, з метою зменшення кількості залучених до проведення експериментальної роботи водяних тварин варто визначити можливість їх повторного використання. Водночас останнє не повинно супроводжуватися збільшенням рівня стресового навантаження на тварин. З метою запобігання впливу на тварин чинників, здатних викликати в них стресові реакції, під час планування експериментальної роботи, розроблення та виконання її протоколу необхідно спиратися на ті методи, що дозволяють уникнути болю або мінімізувати біль, дискомфорт, страждання, тривале погіршення функціонального стану в досліджуваних організмів, при цьому слід звернути увагу й на можливість сучасних методів анестезії водяних тварин [3, 4]. Також у разі обмеження рухової активності тварин, виникнення в них дискомфорту внаслідок змін температурного режиму навколишнього середовища або хімічного складу останнього необхідним є врахування потреби в обґрунтованій мінімізації впливу на організм стресогенного чинника. Окрема

увага повинна надаватися тим передбаченим протоколом дослідження процедурам у кінцевих точках експерименту, за досягнення яких відбувається виведення водяних тварин зі стану тимчасового знерухомлення, анестезії, а за певних умов може відбуватися процедура евтаназії [7]. За відсутності чітко визначених і затверджених цілей та умов проведення експериментального дослідження з використанням водяних тварин варто переглянути його дизайн, звернувши увагу на пов'язані з ним ключові біоетичні аспекти, з якими мають, зокрема, кореспондуватися: 1) наукові або освітні цілі дослідження з урахуванням відповідності експерименту потребам підтримання здоров'я чи добробуту людей, належного стану навколишнього природного середовища, представників тваринного світу, отриманню нових знань в галузі екології та біології тощо; 2) мета розроблення плану експерименту, включаючи обґрунтування вибору виду, джерела та кількості тварин для проведення дослідження, урахування можливості їх повторного використання у подальшому; 3) детальний опис експериментальних процедур; 4) передбачені методи уникнення або мінімізації болю, дискомфорту, страждань або тривалого погіршення функціонального стану досліджуваних водяних тварин, наприклад методи анестезії; 5) вибір гуманних кінцевих точок та остаточного розпорядження досліджуваними тваринами, включаючи за необхідності методи евтаназії; 6) необхідні для виконання експериментального дослідження інфраструктура або ресурси (наприклад, відповідне обладнання), компетентність персоналу, який буде брати участь в його забезпеченні [7].

Відповідність планування, організації та проведення експериментальної роботи сучасним біоетичним нормам є обов'язковою умовою не лише для виконання безпосередньо наукового дослідження, а й для можливості оприлюднення його результатів у подальшому. У сучасних тенденціях розвитку методології досліджень із залученням тварин можна простежити акцентуацію уваги на надійності експериментальних методів, на відтворюваності отриманих з їх застосуванням даних, на адекватності використання біологічного матеріалу, на валідації результатів наукових пошуків, на ресурсах для покращення дизайну дослідження. З метою стандартизації методології проведення дослідницької роботи на тваринах та подальшого представлення отриманих даних у наукових виданнях групою вчених у 2010 році було запропоновано низку рекомендацій, відомих як *The ARRIVE Guidelines-2010* [8]. Відзначається, що обізнаність із ними науковців зумовила ширше використання біоетичних норм під час планування та проведення відповідних експериментальних досліджень, а також під час аналізу отриманих результатів [9]. Водночас у низці наукових праць, присвячених аналізу проблем звітності за результатами експериментальної роботи з біоло-

гічними об'єктами та підготовки до оприлюднення отриманих даних, звертається увага на недостатній рівень обізнаності частини виконавців із біоетичними аспектами планування та проведення дослідницької роботи з використанням тварин та на негативні наслідки цього [10–13].

Нещодавно оприлюднений оновлений варіант згаданих вище рекомендацій: *The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research* [14]. За змістовим наповненням в ньому виділяються дві частини: “*ARRIVE Essential 10*” та “*ARRIVE Recommended Set*”:

– в частині “*ARRIVE Essential 10*” наведено мінімальний перелік вимог, виконання яких є необхідною умовою для проведення оцінки надійності отриманих за результатом експериментальної роботи даних і зроблених на цій підставі висновків [14]. До нього входять описи деталей проекту наукового дослідження, у тому числі обґрунтування вибору тварин для його проведення, розміру відповідної вибірки, заходів з об'єктивізації отримуваних даних (зокрема критерії включення та виключення тварин із відповідних груп дослідження, рандомізації тощо), методів статистичної обробки отримуваних даних, експериментальних процедур; також наводяться результати дослідження. При цьому акцентується увага на приналежності вибраних для дослідження організмів певній таксономічній групі (виду, штаму тощо), на їх статі, віку або стадії розвитку, а крім того, за потреби також і на їхній вазі; важливе місце займає інформація про походження тварин, їх стан здоров'я чи імунний статус, генотип та особливості їх генетичної модифікації за умови наявності такої, про процедури, яким тварини піддавалися раніше. Також для кожної групи тварин, що бере участь в дослідженні, наводяться детальні описи тих процедур, до яких вони залучаються в ньому, що дає можливість відтворення останніх. При цьому звертається увага на доцільності проведення кожної з таких процедур із чітким формулюванням її мети та обґрунтованості;

– у частині “*ARRIVE Recommended Set*” акцентується увага дослідників на пов'язаних з експериментальною роботою із тваринами, яка планується до виконання, Заяві про дотримання в ній біоетичних норм, а також на Декларації стосовно можливого конфлікту інтересів, на питаннях, пов'язаних із уточненням реєстрації протоколу дослідження та з регламентом доступу до первинних даних, із деталізацією інформації про методологію експериментальної роботи та про особливості утримання досліджуваних тварин, догляду за ними [14]. При цьому окремі увазі підлягає детальний опис в експериментальних протоколах втручань та дій, спрямованих на зменшення можливості болю та страждань у досліджуваних тварин, визначення гуманних кінцевих точок окремо для кожного досліджуваного ознак, за якими відбувається контроль їх досягнення, і частоти відпо-

відного моніторингу (за відсутності визначення для дослідження гуманних кінцевих точок необхідним є пояснення причини цього). Схвалення на використання в дослідженні конкретного виду тварин надається відповідним комітетом з етичного контролю (або аналогічною за повноваженнями структурою), а за відсутності такої ухвали в тій заяві, що стосується дотримання дослідниками біоетичних норм, виконавці роботи мають аргументувати можливість проведення дослідження за її відсутності (наприклад, у разі залучення до дослідження саме тих безхребетних тварин, на використання яких у наукових цілях на цей час не поширюються відповідні визнані міжнародною науковою спільнотою обмеження). Таким чином, вже на етапі планування структури дослідження мають бути науково обґрунтованим його контекст і пояснені потреба у використанні експериментального підходу для вирішення проблеми, якій воно присвячене, та залучення для цього конкретного виду тварин, що має кореспондуватися з визначеними науковими цілями дослідження і відповідати сучасним нормам біоетики. Водночас будь-які очікувані або несподівані несприятливі події, що виникають під час проведення дослідження, підлягають реєстрації.

Під час підготовки протоколу проведення наукової роботи увага його розробників має бути акцентованою на таксономічній приналежності запланованих для дослідження тварин, зважаючи й на те, що з нею пов'язане застосування комплексу заходів біоетичного змісту, передбачених відповідними документами, до яких належать, зокрема, Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей», «Договір про функціонування Європейського Союзу», Директива Європейського Парламенту та Ради 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях, а також інші нормативні акти [5, 15–18]. Вони містять конкретні положення стосовно практичного застосування норм і принципів біоетики. Причому, як підкреслюється в одному зі згаданих вище документів, під дію останніх підпадає «будь-яка жива хребетна тварина, яка не належить до людського роду, включаючи непаразитуючі та/або відтворюючі личинкові форми» [5], більше того, певні положення відносяться «до будь-якої тварини, що використовується або призначена для використання у будь-якій дослідній або іншій науковій процедурі, якщо така процедура може спричинити біль, страждання, занепокоєння чи завдати тривалої шкоди» [5].

У зв'язку з наведеним вище звернемо увагу, що чинною Директивою Європейського Парламенту та Ради 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях [18], розширено визначений раніше, у 1999 році, «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються

для дослідних та інших наукових цілей» [5] перелік таксономічних груп, на представників яких поширюються норми і принципи біоетики, шляхом включення до нього таксону Круглороті (Cyclostomata), а крім того, таксону Головоногі молюски (Cephalopoda). Внесення до названого переліку представників головоногих молюсків пов'язане зі з'ясуванням розвитку в цих водяних безхребетних тварин когнітивних функцій на достатньо високому рівні [19].

З огляду на тенденції до розвитку сучасних уявлень щодо чутливості безхребетних тварин до різноманітних екологічних чинників, можна передбачати розширення переліку таксономічних груп, на представників яких будуть поширюватися відповідні норми і принципи біоетики в майбутньому. При цьому звернемо увагу на ракоподібних з ряду Десятиногі (Decapoda). З урахуванням біологічних особливостей цих водяних безхребетних тварин, зручності їх вилування в дикій природі, їхньої відносно невибагливості до умов культивування [20–22] представники ряду Десятиногі (Decapoda) широко використовуються в гідробіологічних, гідроекологічних, екофізіологічних, екотоксикологічних, біохімічних дослідженнях як модельні організми [23–30], причому чинними законодавчими нормами не передбачено обмежень на використання згаданих тварин у наукових чи освіт-

ніх цілях [31]. Проте отримані останнім часом дані з вивчення особливостей реагування представників ракоподібних з ряду Десятиногі (Decapoda) на низку подразників свідчать на користь можливості перегляду такого положення. Так, у цих тварин були зареєстровані захисні поведінкові реакції у відповідь на подразнення ударом електричного струму, спрямовані на уникнення цього [32], а також захисні рухові реакції, спричинені нанесенням на окремі ділянки їхнього тіла агресивних хімічних агентів [33], що в сукупності може розглядатися як свідчення притаманності больових відчуттів десятиногим ракам. З урахуванням наведених вище даних, особливостей функціонування нервової системи та поведінки ракоподібних з ряду Десятиногі (Decapoda) у наукових колах обговорюється питання про внесення цих тварин до переліку організмів, на яких поширюються законодавчо закріплені норми і принципи біоетики [34].

Таким чином, під час планування та проведення наукових досліджень, а також під час організації освітнього процесу у сферах гідробіології та гідроекології необхідним є безумовне дотримання прийнятих міжнародною науковою спільнотою підходів, що базуються на засадах чинних уявлень про біоетику, враховуючи при цьому сучасні погляди на розвиток цього питання.

Література

1. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М. Арсан, О.А. Давидов, Т.М. Дьяченко та ін.; за ред. В.Д. Романенка. Київ: ЛОГОС, 2006. 408 с.
2. Романенко О.В., Арсан О.М., Кіпніс Л.С., Ситник Ю.М. Екологічні проблеми київських водойм і прилеглих територій; за ред. О.В. Романенка. Київ: Наукова думка. 2015. 192 с.
3. Романенко О.В., Груша М.М. Біоетичні аспекти іхтіологічних та екофізіологічних досліджень. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск "Гідроекологія", 2010. № 2 (43). С. 420–423.
4. Романенко О.В., Груша М.М. Біоетичні аспекти гідроекологічних досліджень. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія. 2015. № 3-4 (64). С. 572–575.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 24 August 1999. No L 222. P. 31–37.
6. Russell W.M.S., Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique (Special edition). South Mimms: UFAW, 1992. 238 p.
7. OIE - Terrestrial Animal Health Code, Twenty-eighth edition. Paris: WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019. 491 p.
8. Killkeny C., Browne W., Cuthill I. C. et al. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 2010; Vol. 160, No 7. P. 1577–1579.
9. Reichlin T. S., Vogt L., Wurbel H. (2016). The researchers' view of scientific rigor-survey on the conduct and reporting of in vivo research. *PLoS One*. 2016. Vol 11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165999>.
10. Reproducibility and reliability of biomedical research: improving research practice. London: Academy of Medical Sciences, 2015. 78 p.
11. Hurst V., Percie du Sert N. The ARRIVE guidelines survey. *Open Science Framework*. 2017 DOI: <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/G8T5Q>.
12. Fraser H., Parker T., Nakagawa S., Barnett A., Fidler F. Questionable research practices in ecology and evolution. *PLoS One*. 2018. Vol 13. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200303>.
13. Hair K., Macleod M. R., Sena E. S. et al. A randomised controlled trial of an intervention to improve compliance with the ARRIVE guidelines (PICARus). *Res. Integr. Peer Rev.* 2019. Vol. 4, No 12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41073-019-0069-3>.
14. Percie du Sert N., Ahluwalia A., Alam S. et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020. Vol. 18, No 7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>.
15. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV. *Відомості Верховної Ради України*. 2006. № 27. – Ст. 230.
16. Bate M., Chippendale C., Lucas A. Australian code for the care and use of animals for scientific purposes, 8th edition. Canberra: NHMRC, 2013. 92 p.

17. Consolidated versions of the Treaty on European Union and on the Treaty on the Functioning of the European Union. *Official Journal of the European Union*. 30 March 2010. No C 83. P. 1–388.
18. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010. No L 276. P. 33–79
19. Darmaillacq A., Dickel L., Mather J. Cephalopod Cognition. Cambridge: CUP, 2014. 247 p.
20. Elwood R. Evidence for pain in decapod crustaceans. *Anim. Welf.* 2012. Vol. 21. P. 23–27.
21. Hauton C. The scope of the crustacean immune system for disease control. *J. Invertebr. Pathol.* 2012. Vol. 110. P 251–260.
22. McGaw I.J. The decapod crustacean circulatory system: A case that is neither open nor closed. *Microsc. Microanal.* 2005. Vol. 11. P. 18–36.
23. Derby C.D., Sorensen, P.W. Neural processing, perception, and behavioral responses to natural chemical stimuli by fish and crustaceans. *J. Chem. Ecol.* 2008. Vol. 34. P. 898–914.
24. Derby C., Thiel M. Nervous systems and control of behavior. The natural history of the crustacea. New York, Oxford University Press, 2014. Vol. 3. P. 263–292.
25. Reynolds J.D., Souty-Grosset C. Management of freshwater biodiversity: crayfish as bioindicators. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. 384 p.
26. Stensmyr M.C., Erland S., Hallberg E. et al., Insect-like olfactory adaptations in the terrestrial giant robber crab. *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 116–121.
27. Vogt G. Functional anatomy in biology of freshwater crayfish. / Ed. Holdich, D.M. Oxford: Blackwell Science, 2000. P. 53–151.
28. Belanger R.M., Lahman S.E., Moore P.A. Chapter 6. Crayfish: An experimental model for examining exposure to environmental contamination. *Ecotoxicology and genotoxicology: Non-traditional aquatic models*. / Ed. M.L. Larramendy. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017. P. 124–156.
29. El Assal F. M., Abdel-Meguid Z. A. Impact of heavy metal pollution on *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) from Egypt. *Int. J. Waste Resour.* 2017. Vol. 7. P. 1–4.
30. Zhang F., Wei J., Li Q. et al Effects of perfluorooctane sulfonate on the immune responses and expression of immune-related genes in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2015. Vol. 172. P. 13–18.
31. Elwood R. W., Barr, S., Patterson, L. Pain and stress in crustaceans? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2009. Vol. 118. P. 128–136.
32. Magee B., Elwood R. W. Trade-offs between predator avoidance and electric shock avoidance in hermit crabs demonstrate a non-reflexive response to noxious stimuli consistent with prediction of pain. *Behav. Process.* 2016. Vol. 130. P. 31–35.
33. Elwood R. W., Dalton N., Riddell G. Aversive responses by shore crabs to acetic acid but not to capsaicin. *Behav. Process.* 2017. Vol. 140. P. 1–5.
34. Passantino A., Elwood R. W., Coluccio P. Why protect decapod crustaceans used as models in biomedical research and in ecotoxicology? Ethical and legislative considerations. *Animals*. 2021. Vol. 11, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11010073>.