

Merili Raunio

IHMISSOLUPOHJAISET EPIDERMIS- MALLIT IHOÄRSYTYKSEN TESTAUK- SESSA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Huhtikuu 2024

TIIVISTELMÄ

Merili Raunio: Ihmissolupohjaiset epidermismallit ihoärsytyksen testauksessa
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2024

Ihoärsytys kuvastaa iholle aiheutuvaa palautuvaa vahinkoa, joka syntyy kemikaalin läpäistessä marraskeden ja vahingoittaessa epidermisen soluja. Mahdollinen kemikaalien ja lääkinnällisten laitteiden aiheuttama ihoärsytys on selvitettävä ennen myyntiluvan saamista. Ihoärsytys on tyypillisesti testattu in vivo -menetelmillä, mutta näitä rajoittavat eettiset haasteet sekä tulosten epäluotettavuus. Korvaavaksi menetelmäksi on kehitetty ihmissolupohjaisia in vitro -epidermismalleja. Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdytään näiden epidermismallien rakenteeseen ja käyttöön. Lisäksi selvitetään, kuinka hyvin epidermismallien tuottamat tulokset vastaavat in vivo -menetelmillä saatuja ihoärsytystuloksia.

Ihmisen ja ärsytystestauksessa tyypillisesti käytetyn kanin ihot koostuvat epidermiksestä, dermiksestä ja hypodermiksestä. Epidermis on näistä kerroksista uloin, ja se rakentuu enimmäkseen keratinosyyteistä. Kanin epidermis on huomattavasti ihmisihoa ohuempi, mikä tekee siitä herkän ihoärsytykselle. Epidermismallit ovat ihmisen keratinosyyteistä kasvatettuja epidermistä vastaavia rakenteita. Näiden rakenne vastaa ihmisepidermistä tarkemmin kuin kanin epidermis, mutta solu koostumus on yksipuolisempi. Seitsemän epidermismallia on saanut kaupallisen hyväksynnän.

Puhtaiden kemikaalien ja lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystestauksille tarvitaan erilaiset testiohjeet muun muassa erilaisten koostumuksien vuoksi. Puhtaat kemikaalit testataan sellaisenaan, kun taas lääkinnällisistä laitteista valmistetaan uutteen sekä poolittomaan että pooliseen liuottimeen, ja näitä uutteen testataan pidennetyllä vaikutusajalla. Ihoärsytys määritetään solujen elävyyksimittauksella, jonka avulla saadaan huomattavasti objektiivisempia tuloksia kuin in vivo -menetelmillä.

Puhtaiden kemikaalien ihoärsytystutkimuksissa epidermismallien tuottamat ärsytysluokittelut vastasivat kanin ihon pintakokeista saatuja luokituksia melko hyvin. Mallien vastaavuus ihmisen iho kokeisiin oli puolestaan erittäin hyvä, jopa parempi kuin kanikokeilla. Kanikokeet olivat kuitenkin herkempiä tunnistamaan kaikki ärsyttävät kemikaalit. Toisaalta tulosten toistettavuus oli näillä huomattavasti heikompi kuin epidermismalleilla.

Myös lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystutkimuksissa mallien tuottamat ärsytysluokitukset vastasivat melko tarkasti in vivo -menetelmien tuottamia luokituksia. Suurin vastaavuus oli suhteessa kanin ihonsisäisiin kokeisiin. Mallien tarkkuus oli hyvä, mutta toisaalta testikemikaaleja oli melko vähän. Tarkkuutta voisi mahdollisesti parantaa tarkkailemalla sytokiinin tuotantoa ärsytyksen aiheuttaman tulehdusreaktion seurauksena. Sytokiinimarkkerit ja muut epidermismallien parannukset saattaisivat tulevaisuudessa mahdollistaa ihoärsytyksen tarkemman luokittelun myös epidermismalleilla.

Avainsanat: Epidermismalli, ihoärsytys, in vitro, keratinosyytti, lääkinnällinen laite

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kirjallisuuskatsaus on tehty osana bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan kandidaattiohjelman Tampereen yliopistossa.

Haluan kiittää erityisesti ohjaajaani Maiju Juusela tuesta ja avusta kirjoitusprosessissa. Kiitos myös erittäin mielenkiintoisesta aiheesta, jonka parissa on ollut innostavaa työskennellä. Eläinkokeita korvaavien menetelmien kehitys vie meitä askeleen lähemmäksi kestäväää tulevaisuutta.

Kiitän myös perhettäni ja ystäviäni kannustuksesta ja vertaistuesta läpi työn.

Tampereella, 2.4.2024

Merili Raunio

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4
2. IHON JA EPIDERMISMALLIEN RAKENNE	5
2.1 Ihmisen ja kanin ihojen rakenne	5
2.2 Epidermismallien rakenne	6
3. IN VIVO- JA IN VITRO -ÄRSYTYSTESTIMENETELMÄT	8
3.1 In vivo -protokollat	8
3.2 In vitro -protokollat	10
4. EPIDERMISMALLIEN JA IN VIVO -MENETELMIEN TULOSTEN VERTAILU	12
4.1 Kemikaalien ihoärsytystulokset	12
4.2 Lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystulokset	17
5. YHTEENVETO	21
6. LÄHTEET	23

1. JOHDANTO

Ihoärsytys kuvastaa iholle aiheutuvaa palautuvaa vahinkoa sen altistuttua ärsyttävälle yhdisteelle. Ihoärsytyksen synty on tapahtumaketju, joka alkaa kemikaalin läpäistessä epidermisen uloimman kerroksen, marraskeden (OECD 2021). Alemmissa kerroksissa kemikaali vahingoittaa ihon soluja, minkä seurauksena ihossa voi syntyä tulehdusreaktioita (OECD 2021). Ulkoisesti ärsytys taas ilmenee tyypillisesti punoituksena ja turvotuksena. Yhdisteen ärsyttävyyteen vaikuttavat muun muassa sen happamuus, konsentraatio ja vaikutusaika iholla (ISO 2021). Ihoärsytystä voivat aiheuttaa esimerkiksi kemikaalit ja kosmetiikka, mutta myös erilaisista lääkinnällisistä laitteista voi käytössä liueta ärsyttäviä ainesosia. Lääkinnällisiin laitteisiin kuuluu laaja kirjo aineita, joita käytetään lääketieteellisiin tarkoituksiin esimerkiksi diagnostiikassa ja sairauksien hoidossa.

Ennen myyntiluvan saamista yhdisteiden ärsyttävyys tulee olla tiedossa, ja tämän selvittämiseksi yhdiste on tyypillisesti testattu pieneläimillä (ISO 2021). Jo pitkään käytössä olleessa Draizen kaniokokeessa käytetään terveitä albiinokaneja, joiden ihoon testattava yhdiste lisätään joko pinnalle tai ihon sisempiin kerroksiin. (ISO 2021). Eläinkokeiden jälkeen tai niiden sijaan tutkittava yhdiste voidaan testata myös suoraan ihmisillä ihon pintatestillä, jolloin saadaan tarkin tulos yhdisteen vaikutuksesta ihmisiin. Tällöin yhdisteen tulee olla jo valmiiksi tarpeeksi turvalliseksi todettu ja myrkytön ennen kuin yhdistettä testataan terveiden vapaaehtoisten ihoon (ISO 2021).

Eläin- ja ihmiskokeisiin liittyy lukuisia ongelmia koskien niin eettisyyttä kuin myös käytännön haasteita ja tulosten luotettavuuksia. EU:n koe-eläindirektiiviin onkin lisätty 3R-periaate, joka ohjaa vähentämään testattavien eläinten määrää, parantamaan näiden hyvinvointia sekä suosimaan eläinkokeettomia menetelmiä (Heinonen ja Tähti 2013). Kosmetiikan suhteen Euroopassa on eläinkoekiello, jonka seurauksena Euroopassa ei saa markkinoida uusia kosmetiikkatuotteita, joiden mikään komponentti on testattu eläimillä (Heinonen ja Tähti 2013). Kielto ei koske kemikaaleja ja lääkinnällisiä laitteita, mutta tästä huolimatta eläinkokeiden määrä on ollut viime vuosina laskussa myös näiden ihoärsytystestauksissa (Pellevoisin ym. 2022).

Myös kansainvälisen standardoimisjärjestö ISO:n (International Organization for Standardization) uusi ISO 10993-23 -standardi vuodelta 2021 kehottaa korvaamaan ihoärsyttävyyden eläinkokeita mahdollisuuksien mukaan eläinkokeettomilla vaihtoehdoilla, mikäli ne pystyvät antamaan yhtä luotettavia tuloksia (ISO 2021). Erilaisia korvaavia menetelmiä on kehitetty, ja niistä paikkansa ovat vakiinnuttaneet erityisesti ihmissolupohjaiset epidermismallit. Nämä in vitro -mallit ovatkin pitkälti saaneet jo virallisen hyväksynnän ihoärsytyksen testauksessa, erityisesti puhtaiden kemikaalien ja lääkinnällisten laitteiden osalta (ISO 2021). Tästä huolimatta myös epidermismalleissa on omat haasteensa ja rajoitteensa, jotka vaikuttavat testausmahdollisuuksiin ja -tarkkuuksiin.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdytään näihin ihmissolupohjaisiin epidermismalleihin ja selvitetään, millaisia erilaiset in vitro -epidermismallit ovat rakenteeltaan ja käytöltään verrattuna aikaisempiin in vivo -menetelmiin. Katsauksessa tarkastellaan myös, kuinka tarkasti epidermismallit vastaavat nykyään ihoärsytyksen mallintamisessa ihmisen ja kanin ihoja, ja mitä haasteita näillä malleilla yhä on. Ihoärsytyksen tarkastelussa pääpaino on puhtaiden kemikaalien sekä lääkinnällisten laitteiden aiheuttamissa ihoärsytyksissä.

2. IHON JA EPIDERMISMALLIEN RAKENNE

2.1 Ihmisen ja kanin ihojen rakenne

Iholla on tärkeitä tehtäviä muun muassa kehon suojaamisessa, immuunipuolustuksessa, diffuusion säätelyssä sekä D-vitamiinin tuotossa. Ihmisen iho muodostuu kolmesta kerroksesta: epidermiksestä, dermiksestä sekä hypodermiksestä. Näistä alin kerros, hypodermis, on löyhä kudus, joka liittyy dermiksen luustoon ja lihaksiin (Hofmann ym. 2023). Se sisältää runsaasti muun muassa verisuonia, hermoja, sidekudosta ja rasvasoluja (Hofmann ym. 2023). Hypodermis toimii muun muassa energiavarastona, suojana lämmönmuutoksia ja iskuja vastaan sekä hormonituotannossa (Hofmann ym. 2023).

Ihon keskeisin kudus on dermis, joka muodostuu sidekudoksesta, verisuonista, hermoista, karvatupista ja rauhasista (Hofmann ym. 2023). Dermiksen tehtäviin kuuluvat muun muassa ihon lämmönsäätely, veden ja immuunisolujen varastointi, hapen ja muiden aineiden kuljetus epidermikseen sekä soluväliaineen proteiinien tuotto (Hofmann ym. 2023).

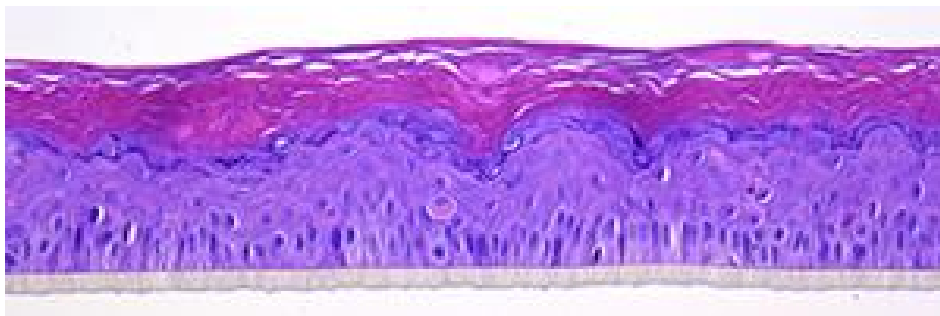
Dermiksen ja epidermiksen yhdistää toisiinsa tyvikalvo, joka on soluväliaineen proteiineista koostuva puoliläpäisevä kalvo (Hofmann ym. 2023). Sen yläpuolella sijaitseva epidermis koostuu 4–5 kerroksesta, joissa on eri erilaistumisasteen soluja (Dijkhoff ym. 2021). Epidermis alkaa tyvikalvon jälkeisestä kantasoluja sisältävästä tyvikerroksesta ja päättyy kuolleeseen marrasketeen, jonka solujen tuma ja soluelimet on hajotettu (Dijkhoff ym. 2021). Epidermis uusiutuu 5–6 viikon välein vanhan marraskesikerroksen irrotessa uuden tieltä ihon pinnalla (Dijkhoff ym. 2021). Epidermis sisältää enimmäkseen toisiinsa desmosomeilla liittyneitä keratinosyyttejä, jotka kykenevät jakautumaan ja erilaistumaan (Dijkhoff ym. 2021). Keratinosyytit myös tuottavat keratiineja, jotka tekevät ihosta kestävämmän ja osallistuvat solusignaalointiin (Hofmann ym. 2023). Keratinosyyttien lisäksi epidermiksessä on muun muassa melanosyyttejä, Langerhansin soluja sekä Merkelin soluja (Hofmann ym. 2023). Toisin kuin alemmat ihokerrokset, epidermis ei sisällä lainkaan verisuonia, vaan hapen

ja kuona-aineiden vaihto tapahtuu diffuusiolla tyvikalvon kautta dermiksen verisuonista (Hofmann ym. 2023).

Myös kanin iholla on melko samankaltainen rakenne. Ihoärsytys onkin tyypillisesti testattu käyttäen kanin ihoa, sillä se reagoi herkästi ärsyttäviin aineisiin ja mahdollistaa suhteellisen helpon ärsytys-testauksen (Jírová ym. 2010). Kanin ihon epidermis on kuitenkin hyvin ohut, vain parin solukerroksen paksuinen, mikä osaltaan selittää kanin ihoärsytysherkkyuden, sillä ohuempi epidermis läpäisee kemikaaleja paksua epidermistä helpommin (Uhm ym. 2023). Kanin iho on kiinnittynyt hyvin löyhästi hypodermikseen, mikä myös altistaa voimakkailla ihoärsytysreaktioille (Uhm ym. 2023).

2.2 Epidermismallien rakenne

Ihoärsytystä kuvantavien in vitro -epidermismallien rakenne vastaa myös melko tarkasti ihmisen epidermiksen rakennetta morfologisilta, biokemiallisilta sekä fysiologisilta ominaisuuksiltaan (Hofmann ym. 2023). Mallit kasvatetaan kuitenkin pääosin vain keratinosyyteistä, joten niistä puuttuu osa epidermiksessä luontaisesti esiintyvistä solutyypeistä (Dijkhoff ym. 2021). Epidermismalleilta puuttuu myös yhteys ihon alempiin kerroksiin, mikä tuo rajoitteita sen sovelluskohteisiin. Malleissa on vastaavat kerrokset kuin ihmisen epidermiksessä, mutta vanha marrakesikerros ei irtoile uusien solujen kasvamisen myötä, mikä lyhentää näiden mahdollista käyttöaikaa noin viikkoon (Dijkhoff ym. 2021). Epidermismallin rakenne näkyy Kuvassa 1. Mallin marrakedessä on myös hieman erilainen rasvakoostumus, ja osin tämän vuoksi mallien läpäisevyys poikkeaa ihmisihosta (Dijkhoff ym. 2021). Läpäisevyyttä voidaan kuitenkin jonkin verran säädellä muuttamalla rasvahapokoostumusta, happipitoisuutta ja kosteutta (Dijkhoff ym. 2021). Käytön kannalta olennaista on, että epidermismallin rakenne mahdollistaa testattavien aineiden lisäämisen mallin apikaalipuolelle (ISO 2021).

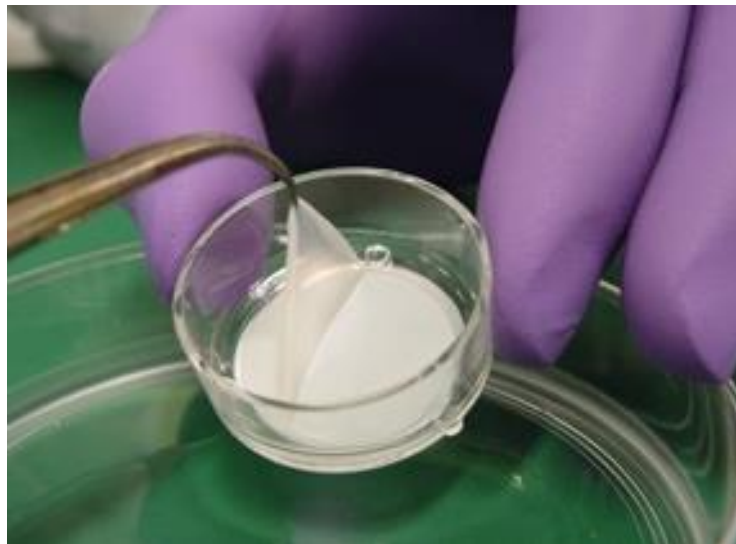


Kuva 1. Epidermismallin rakenne. (<https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE>, 26.2.2024)

Kun verrataan kanin epidermistä ihmisolupohjaiseen epidermismalliin, huomataan erityisesti ero paksuuksissa. Siinä missä kanin epidermis on paksuudeltaan noin kolmasosan ihmisepidermik-

sestä, KeraSkin™-epidermismalli on taas lähes kaksinkertainen paksuudeltaan verrattuna ihmisepidermikseen (Uhm ym. 2023). Epidermismallien suuri paksuus todennäköisesti kompensoi näiden marraskesien tavallista suurempaa läpäisevyyttä (Jírová ym. 2010). Toisaalta KeraSkin-epidermismalli ilmentää useita ihmisihon kanssa samanlaisia suojakerroksen proteiineja, jotka taas puuttuvat kanin ihosta (Uhm ym. 2023). Epidermiksen kerroksia ja paksuuksia vertailemalla kanin iho ja epidermismalli poikkeavatkin merkittävästi toisistaan. Näistä kuitenkin epidermismalli vastaa rakenteensa puolesta tarkemmin ihmisepidermistä, joskin kanin epidermiksen etuna on yhteys alempiin ihon kerroksiin.

Epidermismallit kasvatetaan ihon keratinosyyteistä, jotka saadaan terveiltä luovuttajilta yleensä esinahasta tai vatsan ihosta leikkauksien yhteydessä (Hofmann ym. 2023). Eristetyt keratinosyytit istutetaan huokoisen kalvon kahtia rajaaman kasvatusinsertin apikaalipuolelle (Dijkhoff ym. 2021). Insertin basolateraalille puolelle puolestaan lisätään tarvittavia ravinteita sisältävää elatusainetta (Dijkhoff ym. 2021). Solut muodostavat yksinkertaisen kerroksen, joka muutaman päivän upotettuna kasvattamisen jälkeen tarttuu kalvoon kiinni (Dijkhoff ym. 2021). Tämän jälkeen solujen päältä poistetaan elatusaine, jolloin ilma- ja nestefaasien välissä kasvavat keratinosyytit alkavat erilaistumaan ja muodostamaan epidermiksen kerroksia (Dijkhoff ym. 2021; Hofmann ym. 2023). Elatusaineeseen lisätään tässä vaiheessa kasvutekijöitä, insuliinia, kalsiumia ja askorbiinihappoa, jotka tukevat syntyvän epidermiksen jakautumista, erilaistumista ja läpäisynestävyyttä (Dijkhoff ym. 2021). Valmiin epidermismallin kasvattaminen keratinosyyteistä kestää yhteensä noin kaksi viikkoa (Hofmann ym. 2023). Kuvassa 2 on kypsä epidermismalli kasvatusinsertillään.



Kuva 2. Epidermismalli kasvatusinsertillä. Kuvassa puoliksi irti oleva kalvo on keratinosyyteistä kasvatettu epidermismalli. (<https://www.episkin.com/frequently-asked-questions>, 26.2.2024)

Ihoärsytyksen testaukseen on valmiita kaupallisia malleja, mutta myös ohjeita omien mallien valmistamiseen. Itse valmistetun epidermismallin etuina ovat edullisemmän hinnan lisäksi mahdollisuus säädellä tarkemmin mallin alkuperää, ominaisuuksia ja kasvatusympäristöä (Dijkhoff ym. 2021). Mallia kyetään tällöin myös tarvittaessa kehittämään eteenpäin esimerkiksi lisäämällä epidermikseen melanosyytteja ja immuunisoluja (Dijkhoff ym. 2021). Haasteena kuitenkin itse valmistetuissa malleissa on pitkä kasvatusaika sekä mahdolliset eroavaisuudet malleissa eri laboratorioiden välillä (Dijkhoff ym. 2021).

Uuden kaupallisen mallin hyväksyminen edellyttää tarkkaa tutkimusta, jossa selvitetään mallin tarkkuus sekä koetulosten variaatio eri laboratorioiden ja kokeiden välillä (ISO 2021). Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö OECD vastaa kemikaalien ihoärsytyksien testiohjeista, ja on hyväksynyt vuoteen 2021 mennessä seitsemän validaatiokriteerit täyttäneitä kaupallista epidermismallia: EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, LabCyte, epiCS®, Skin+® ja KeraSkin™ (OECD 2021). Eri kaupallisten epidermismallien testauskäytänteet ovat hyvin samanlaisia, mutta pieniä eroja esiintyy muun muassa testikemikaalien määrissä sekä vaadituissa vaikutusajoissa (OECD 2021). Myös rakenteidensa puolesta mallien perusversiot ovat hyvin samanlaisia, mutta osasta malleista on saatavilla lisäksi esimerkiksi eri kypsyyssasteen epidermiksiä sekä pigmentoituja epidermiksiä. Mallien koko vaihtelee hieman sekä eri mallien välillä että myös mallien sisällä. Esimerkiksi SkinEthic-mallia on saatavilla sekä 0,5 cm² että 4 cm² kokoisina (<https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE>, 26.2.2024). Myös muut mallit sijoittuvat pääosin tälle pinta-alavälille.

3. IN VIVO- JA IN VITRO -ÄRSYTYSTESTIMENETELMÄT

3.1 In vivo -protokollat

Yleisimmin ihoärsytyksen testaukseen on käytetty albiinokania. Kanikoeprotokollat perustuvat Draizen kokeisiin vuodelta 1944, mutta protokollia on myöhemmin päivitetty (OECD 2017). Kanikokeessa ärsytystä mitataan kvalitatiivisesti sen ulkoisten tunnusmerkkien, eli punoituksen ja turvotuksen, perusteella (OECD 2021). Kvantitatiivisen mittauksen puute kanikokeissa tekeekin menetelmästä varsin subjektiivisen. Protokolla ihoärsytyksen testaamiseen kanin ihon pinnalla on samankaltainen puhtaille kemikaaleille ja lääkinnällisille laitteille.

Kunkin aineen testaamiseen käytetään 3 nuorta albiinokania, jotka painavat vähintään 2 kg (ISO 2021). Mikäli on syytä epäillä testattavan aineen olevan voimakkaasti ärsyttävä, suositellaan koe

aloittamaan vain yhdellä kanilla (ISO 2021). Ihon pintatestissä testialueelta ajellaan karvat 4–24 tuntia ennen koetta, ja testattavaa jauhetta tai nestettä lisätään alueelle 500 mg tai 500 µl (OECD 2015; ISO 2021). Aineen annetaan vaikuttaa vähintään 4 tuntia, jonka jälkeen punoitus ja turvotus pisteytetään 1, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua aineen poistosta (OECD 2015; ISO 2021). Pisteytysten perusteella voidaan laskea keskiarvo ärsytystulokselle, ja tämän perusteella luokitella aine sopivaan ärsyttävyysskategoriaan (OECD 2015; ISO 2021). Puhtailla kemikaaleilla kanien seuraamista suositellaan jatkettavaksi vielä 14 päivää kemikaalin poiston jälkeen, jotta mahdollinen ihon reaktioiden palautuminen voidaan havaita (OECD 2015).

Mikäli lääkinällistä laitetta käytetään ihonsisäisesti tai rikkinäiselle iholle, kanin ihonsisäinen koe antaa tarkempia tuloksia kuin ihon pintakoe (ISO 2021). Kanit valikoidaan samoilla ehdoilla kuin ihon pintakokeessa, ja karvat ajellaan 4–18 tuntia ennen koetta (ISO 2021). Kustakin testattavasta lääkinällisen laitteen materiaalista valmistetaan poolinen uute 0,9 % natriumkloridiliuokseen eli fysiologiseen suolaliuokseen, sekä pooliton uute seesamiöljyyn (ISO 2021). Uutteita annostellaan ihon sisälle 200 µl (ISO 2021). Eri liuottimien käyttö takaa riittävän liukenemisen riippumatta testattavan aineen poolisuudesta. Joitakin aineita, kuten ihon täyteaineita, voidaan injektoida myös suoraan ilman uuttamista (ISO 2021). Ärsyttävyys arvioidaan samoilla pisteytyksillä kuin pintatestissä (ISO 2021).

Toinen tyypillinen ihoärsytyksen in vivo -testimenetelmä on ihmisihokoe eli HPT (human patch test). Tämä koe antaa tarkkaa ja laadukasta tietoa kemikaalien vaikutuksista ihmisiholle, mutta OECD ei suosittele HPT:n käyttämistä primäärisenä ihoärsytysdatan hankintamenetelmänä (OECD 2017). HPT on harvoin mahdollinen koemuoto, ja sitä käytetään pääasiallisesti vain kemikaalien kanssa, joiden käyttökohde edellyttää kontaktia ihon kanssa (OECD 2017). Vain tarpeeksi turvalliseksi tunnettuja kemikaaleja saa testata ihmisillä (OECD 2017). Haasteidensa ja eettisten kysymystensä vuoksi suositellaankin käyttämään ensisijaisesti aikaisempia HPT-datoja ja suorittamaan uusia kokeita vain harkitusti (OECD 2017).

Mikäli uuden HPT-datan tuottamiseen kuitenkin päädytään, ohjeistaa ISO 10993-23:2021 -standardi valitsemaan kokeeseen vähintään 30 aikuista vapaaehtoista niin, että miehiä ja naisia on vähintään kolmasosa kumpaakin (ISO 2021). Testiaineina voi olla nesteitä sekä kiinteitä aineita jauhattuna, uutettuna tai tietyissä tapauksissa sellaisenaan (ISO 2021). Koska eri ihmiset reagoivat ärsyttäviin aineisiin eri tavoin, käytetään testeissä myös positiivista kontrollia (ISO 2021). Aineet lisätään tyypillisesti käsivarren yläosaan, ja niiden annetaan vaikuttaa tutkimuksesta riippuen jopa 24 tuntiin asti tai kunnes havaitaan ärsytysreaktio (ISO 2021). Kemikaalin poiston jälkeen ihon ulkoiset reaktiot pisteytetään kanikokeen tavoin eri aikapisteissä, ja näiden perusteella luokitellaan kemikaalin ärsyttävyys (ISO 2021).

3.2 In vitro -protokollat

Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö OECD on laatinut yleisohjeet puhtaan kemikaalin aiheuttaman ihoärsytyksen testaukseen epidermismalleilla testiohjeeseensa numero 439 (OECD 2021). Lähtökohtana on valmis epidermismalli, esimerkiksi OECD:n kaupalliseen käyttöön hyväksymä malli. Lääkinnällisten laitteiden aiheuttaman ihoärsytyksen testaukselle on puolestaan laadittu OECD:n testiohje 439:n sekä muiden standardien pohjalta ISO 10993-23:2021 -standardi (ISO 2021). Eri standardit puhtaiden kemikaalien ja lääkitsevien laitteiden välillä johtuvat materiaalien ja käyttötapojen eroavaisuuksista. Siinä missä puhdas kemikaali koostuu vain yhdestä aineesta, lääkitsevät laitteet ovat monimutkaisempia ja voivat sisältää keraameja, metalleja, polymeereja sekä biologisia materiaaleja (ISO 2021). Laitteista tuleekin testata pääkomponenttimateriaalit sekä lisäksi valmistuksessa käytetyt lisäaineet (ISO 2021). Lääkitsevissä laitteissa ärsyttävää ainetta on myös yleensä melko pieninä pitoisuuksina, joten testausmenetelmän on oltava herkempi havaitsemaan näitä (ISO 2021). Lääkitseviä laitteita käytetään myös usein ihonsisäisesti, minkä vuoksi aikaisempi in vivo -testaus on painottunut kanin ihonsisäiseen testiin, kun taas puhtaalle kemikaalille riittää tyyppillisesti ihon pintatesti (ISO 2021).

Ennen testausta OECD:n testiohje ohjaa varmistamaan epidermismallin laadun. Tähän kuuluvat histologinen tutkimus, jolla varmistetaan tarpeeksi suuri vastaavuus ihmisepidermiksen kanssa, sekä mallin läpäisevyyden arviointi (OECD 2021). Läpäisevyys muodostuu marraskeden oikeanlaisesta lipidikompositiosta, ja sitä voidaan testata myrkyllisillä testikemikaaleilla, kuten Triton X-100:lla ja natriumdodekyylisulfaatilla (OECD 2021).

Epidermismalleilla on rajoitteita sen suhteen, mitä niillä pystytään testaamaan luotettavasti. Ensinnäkin mallit vastaavat vain ihmisihoa, eikä niillä siis pystytä luotettavasti testaamaan esimerkiksi silmän tai limakalvojen reaktiota ärsyttäviin aineisiin (ISO 2021). Puhtaiden kemikaalien testausmenetelmää voidaan soveltaa nesteille, kiinteille aineille, puolikiinteille aineille ja vahoille (OECD 2021). Kiinteiden aineiden tapauksessa on suositeltavaa jauhaa aine ja kostuttaa epidermismalli sopivan kontaktin takaamiseksi (OECD 2021). Testausohjetta voidaan mahdollisesti soveltaa myös muuntyyppisille aineille, mutta tällöin tulee erikseen varmistaa, että testi tuottaa luotettavia tuloksia (OECD 2021). ISO-standardi puolestaan ei suosittele kiinteiden aineiden testausta epidermismallilla lääkitsevien laitteiden testauksessa, sillä tarpeeksi läheistä kontaktia testialueeseen ei voida tällöin taata (ISO 2021). Lääkitsevien laitteiden ärsyttävyydestä testauksessa optimaalisinta on testata laitteiden materiaaleista valmistettua uutetta epidermismalliin (ISO 2021). Kustakin testattavasta aineesta valmistetaan kanikokeen tapaan poolinen uute fysiologiseen suolaliuokseen sekä pooliton uute seesamiöljyyn (ISO 2021). Uuttoon sopimattomia materiaaleja, kuten nesteitä ja geelejä, pystytään myös joissain tapauksissa testaamaan epidermismalleilla, mutta tällöin tulee ensin selvittää kyseisen materiaalityypin soveltuvuus kyseiseen testiin (ISO 2021).

Tutkittavien kemikaalien lisäksi kokeessa tulee aina olla myös positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte, joihin saatuja tuloksia voidaan verrata. Puhtaita kemikaaleja testattaessa suositeltu positiivinen kontrolli on 5 % natriumdodekyylisulfaattiliuos (SDS) ja negatiivinen kontrolli vettä tai fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos (PBS) (OECD 2021). Lääkinnällisten laitteiden ärsytystestauksessa puolestaan positiivisena kontrollina toimii laimeampi 1 % SDS fysiologisessa suolaliuoksessa ja negatiivisena kontrollina puolestaan DPBS tai PBS ilman kalsium- ja magnesiumioneja (ISO 2021). Positiivisena kontrollina voidaan käyttää vieläkin laimeampia SDS-liuoksia, mikäli nämä liuokset on tutkittu ja todettu sopiviksi tarkoitukseen. Lääkinnällisten laitteiden testauksessa tarvitaan positiivisen ja negatiivisen kontrollin lisäksi vielä uutosluiosten eli fysiologisen suolaliuoksen sekä seesamiöljyn kontrollikokeet (ISO 2021).

Tärkeimpiä eroavaisuuksia puhtaiden kemikaalien ja lääkinällisten laitteiden ihoärsytystestauksessa on testattavan aineen vaikutusaika epidermismallilla. Puhtaan kemikaalin tulee vaikuttaa 15-60 minuuttia 20-37°C:n lämpötilassa mallista riippuen, kun taas lääkinällisten laitteiden uutteen tulee antaa vaikuttaa epidermismallilla 18-24 tuntia 37°C lämpötilassa (ISO 2021; OECD 2021). Lääkinällisten laitteiden testauksen pidempi vaikutusaika selittyy niiden pienemmällä ärsyttävien aineiden pitoisuuksilla. Pidempi vaikutusaika mahdollistaa sen, että pienetkin pitoisuudet kykenevät käynnistämään ärsytysreaktion. Lääkinällisten laitteiden käyttöaika iholla on myös tyypillisesti pidempi kuin kemikaaleilla, mikä edelleen lisää tarvetta pidemmälle testausajalle. Vaikutusajan jälkeen epidermismallit huuhdotaan testiaineista, ja puhtaita kemikaaleja testattaessa epidermiksiä inkuboidaan 42 tuntia ennen solujen elävyyden mittausta, kun taas lääkinällisiä laitteita testatessa elävyydsmittaukseen voidaan siirtyä suoraan huuhtelun jälkeen (ISO 2021; OECD 2021). Jälki-inkubaatio mahdollistaa puhtaiden kemikaalien selkeämmät tulokset korjaamalla pienimmät ihon reaktiot sekä toisaalta vahvistamalla voimakkaimpia reaktioita (OECD 2021). ISO-standardin ohjeistama pitkä vaikutusaika ajanee saman asian tehden jälki-inkubaation tarpeettomaksi.

Siinä missä in vivo -menetelmät mittaavat ihoärsytystä kvalitatiivisesti ulkoisten tunnusmerkkien pohjalta, epidermismalleissa ihoärsytys voidaan mitata kvantitatiivisesti mittaamalla kemikaalille altistuneiden solujen elävyys ja vertaamalla sitä negatiiviseen kontrolliin (ISO 2021; OECD 2021). Mittauksessa käytetään tetratsolipohjaista MTT-väriainetta, jonka mitokondriaaliset dehydrogenaasit pelkistävät siniseksi formatsaalisuolaksi, joka puolestaan voidaan eristää ja mitata esimerkiksi spektrofotometrillä (ISO 2021; OECD 2021). Testattavalle kemikaalille altistuneen epidermismallin väriaineen mittaustulos jaetaan negatiivisen kontrollin epidermismallin mittaustuloksella, jolloin saadaan kullekin mallille elävyytulos prosentteina (ISO 2021; OECD 2021). MTT:tä pelkistävien tai värillisten testikemikaalien tapauksessa tarvitaan erinäisiä lisätoimenpiteitä tulosten korjaamiseksi (OECD 2021).

Mikäli altistuksen seurauksena solujen elävyys suhteessa negatiiviseen kontrolliin on pienempi tai yhtä suuri kuin 50 %, testattu aine luokitellaan ärsyttäväksi (ISO 2021; OECD 2021). Mikäli tulokset ovat selkeitä, virallista luokitusta varten riittää aineen testaus kolmella erillisellä kudoksella (ISO 2021; OECD 2021). Lääkinnällisten laitteiden testauksessa ihoärsytyksen luokitteluun riittää, jos kolminkertainen positiivinen tulos tulee joko poolisesta tai poolittomasta liuksesta (ISO 2021). Epidermismalleilla kyetään luokittamaan testattavat yhdisteet ärsyttäviin ja ei-ärsyttäviin yhdisteisiin, mutta menetelmä ei vielä salli ärsyttävien aineiden luokittelua eri alakategorioihin ärsytyksen intensiivisyyden mukaan (OECD 2021).

Esitetyistä testausprotokollista ihmisellä tehtävä HPT on selkeästi tarkin, mutta myös kaikista haastavin toteuttaa. Lisäksi ihmisillä suoritetaan ärsytuskokeita vain ihon pinnalla, joten lääkitsevien laitteiden ihonsisäistä ärsytystestausta ei voida suorittaa ihmisillä. Epidermismallien puhtaiden kemikaalien ja lääkitsevien laitteiden ihoärsytystestausten protokollat eroavat jonkin verran toisistaan, mikä kompensoi näiden testimateriaalien eroja materiaaleissa, pitoisuuksissa ja käyttökohteissa. Näissä on eroja myös kanikokeiden kohdalla, ja kanikokeille onkin laadittu erilliset protokollat ihon ulkoiseen ja sisäiseen testaamiseen.

Epidermismallien huomattava etu suhteessa kanikokeisiin on niiden helppous ja objektiivisuus. Kun ei tarvita erillistä koe-eläinlaboratoriota, kustannuksetkin pienenevät merkittävästi. Kanikokeiden protokollissa ongelmia tuottavat myös muun muassa arvioinnin subjektiivisuus, kemikaalien annostelu painon perusteella tiheydestä riippumatta sekä standardoinnin puute kemikaalin poistomenetelmissä (OECD 2017). Epidermismallien käyttö ihoärsytyksen testauksessa onkin yleistynyt nopeasti viime vuosina, ja se on nykyään selkeästi in vivo -menetelmiä yleisempi testausmenetelmä (Pellevoisin ym. 2022).

4. EPIDERMISMALLIEN JA IN VIVO -MENETELMIEN TULOSTEN VERTAILU

4.1 Kemikaalien ihoärsytystulokset

In vitro -epidermismallien ja in vivo -menetelmien vertailuun puhtaiden kemikaalien aiheuttamassa ihoärsytyksessä valittiin neljä artikkelia. Jírová ym. (2010) tutkivat EpiSkin ja EpiDerm -mallien tarkkuutta suhteessa kanidataan ja HPT-dataan. Sugiyama ym. (2018) vertasivat kosmetiikan

kemikaalien aiheuttamaa ihoärsytystä EpiSkin, SkinEthic, EpiDerm ja LabCyte -epidermismalleilla kosmetiikkavalmistajien tuottamaan kani- ja HPT-dataan. Han ym. (2020) julkaisivat validaatiotutkimuksen nykyisin jo OECD:n hyväksymälle KeraSkin-mallille, jossa mallin ärsytystuloksia verrattiin in vivo -menetelmillä saatuihin tuloksiin sekä muihin hyväksytyihin epidermismalleihin. Samantyyppinen validaatiotutkimus on julkaistu myös EPiTRI-mallista, joka tosin ei vielä ole saanut OECD:n hyväksyntää (Liao ym. 2021).

Tutkimusten koemenetelmät olivat melko samankaltaisia, sillä kaikissa tutkimuksissa testattiin kemikaalien aiheuttamaa ihoärsytystä epidermismalleilla, ja saatua dataa verrattiin joko tietokannoista tai samasta tutkimuksesta saatuun in vivo -dataan. Jírová ym. (2010) valitsivat tutkittaviksi 25 kemikaalia, joiden tietokannoista saatu kanikoedata viittasi ihoärsyttävyyden olevan lähellä raja-arvoa, ja joista oli aiemmilla in vitro -tutkimuksilla saatu epäjohdonmukaisia tuloksia. Tutkimuksessa kemikaalien ihoärsytystä testattiin neljän tunnin HPT:lla, ja tuloksia verrattiin aikaisempiin ärsytyskoetuloksiin EpiSkin ja EpiDerm -malleilla sekä eri tietokantojen kanidatojen keskiarvoihin (Jírová ym. 2010). Kosmetiikan kemikaalien ihoärsytystutkimuksessa puolestaan testattiin 40 kemikaalia, joiden aikaisempi 24 tunnin kanikoedata sekä 24 tunnin HPT-data kerättiin kosmetiikkayrityksiltä (Sugiyama ym. 2018). Koska HPT:lla testataan vain kemikaaleja, jotka eivät aiheuta voimakasta ärsytystä, tutkittavista kemikaaleista vain 31 testattiin ihmisillä ja näistäkin osaa matalammilla pitoisuuksilla kuin kanikokeissa (Sugiyama ym. 2018). Kemikaalien ärsyttävyyttä testattiin lisäksi EpiSkin, SkinEthic, EpiDerm ja LabCyte -malleilla, ja näiden testien suorittajina toimivat mallien kehittäjät ja tuottajat (Sugiyama ym. 2018).

Kummassakin uuden mallin validaatiotutkimuksissa testikemikaaleina olivat samat OECD:n ohjeistamat 10 ärsyttävää ja 10 ei-ärsyttävää kemikaalia, jotka on aikaisemmin luokiteltu kanikoedatan perusteella (Han ym. 2020; Liao ym. 2021). Tämän lisäksi KeraSkinin tutkimukseen otettiin 46 lisäkemikaalia, jotka oli myös luokiteltu aikaisemman kanikoedatan perusteella (Han ym. 2020). Uuden epidermismallin virallinen hyväksyntä vaatii, että malli kykenee tunnistamaan ihoärsytyksen yhtä hyvin kuin aikaisemmin hyväksytyt mallit, joten tutkimustuloksia verrattiin myös hyväksytyjen mallien tuloksiin (Han ym. 2020; Liao ym. 2021; OECD 2021). Samoin on kyettävä osoittamaan tulosten tarpeeksi suuri toistettavuus saman laboratorion eri kokeiden välillä sekä eri laboratorioden kokeiden välillä. KeraSkinin tutkimukseen osallistui 20:n peruskemikaalin osalta 3 laboratoriota, joissa tehtiin kemikaalia kohden 3 koetta, sekä lisäkemikaalien kohdalla 2 laboratoriota, joissa kemikaalia testattiin 1-2 kertaa (Han ym. 2020). EPiTRI:n tutkimukseen puolestaan osallistui 4 laboratoriota, joissa kutakin kemikaalia testattiin vähintään kolme kertaa (Liao ym. 2021).

Koeasetelmien mukaiset tutkimustulokset on esitetty Taulukossa 1. Taulukossa on tutkittavien mallien tarkkuudet, herkkyudet ja spesifisyydet suhteessa kanidataan ja HPT-dataan, mikäli se oli

tutkimuksessa ilmoitettu. Tarkkuudella tarkoitetaan tässä vertailussa sitä, kuinka suuri osuus kyseisen epidermismallin tuottamista ihoärsytyslukuista vastasi verrokkimenetelmillä eli kanikokeella tai HPT:lla saatuja luokituksia. Herkkyys puolestaan kuvastaa sitä osuutta in vivo -luokituksen mukaisista ärsyttävistä testikemikaaleista, jotka epidermismalli tunnisti oikein. Spesifisyys taas viittaa siihen osuuteen negatiivisista eli ei-ärsyttävistä testikemikaaleista, jotka epidermismalli tunnisti oikein.

Taulukko 1. Puhtaiden kemikaalien ihoärsytystulosten tarkkuudet, herkkyudet ja spesifisyydet.

Tutkimus	Epidermis malli	Malli vs kanikoe			Malli vs HPT		
		Tarkkuus	Herkkyys	Spesifisyys	Tarkkuus	Herkkyys	Spesifisyys
Jírová ym. (2010)	<i>EpiSkin</i>	56,5 %	50,0 %	66,7 %	69,6 %	100 %	65 %
	<i>EpiDerm</i>	56,0 %	43,8 %	77,8 %	76,0 %	80 %	75 %
Sugiyama ym. (2018)	<i>EpiSkin</i>	79,5 %	62,5 %	91,3 %	93,3 %	80,0 %	96,0 %
	<i>SkinEthic</i>	76,9 %	62,5 %	87,0 %	93,3 %	80,0 %	96,0 %
	<i>EpiDerm</i>	72,5 %	50,0 %	87,5 %	90,3 %	80,0 %	92,3 %
	<i>LabCyte</i>	73,0 %	40,0 %	95,5 %	92,0 %	60,5 %	100,0 %
Han ym. (2020)	<i>KeraSkin (20*)</i>	84,4 %	98,9 %	70 %	-	-	-
	<i>KeraSkin (66*)</i>	86,4 %	95,2 %	82,2 %	-	-	-
Liao ym. (2021)	<i>EPiTRI</i>	83 %	96 %	70 %	-	-	-
	<i>EpiSkin**</i>	75 %	80 %	70 %	-	-	-
	<i>EpiDerm**</i>	80 %	80 %	80 %	-	-	-
	<i>SkinEthic**</i>	85 %	90 %	80 %	-	-	-
	<i>LabCyte**</i>	77 %	82 %	70 %	-	-	-

***Testattujen kemikaalien lukumäärä **Tulokset kerätty muista validaatiotutkimuksista**

Tuloksista selkeästi heikoimmat vastaavuudet mallien ja in vivo -menetelmien välille on saatu Jírován ym. (2010) tutkimuksessa. Tuloksia selittää osin se, että testikemikaalien valintakriteerinä on ollut niiden aikaisemmat epäjohdonmukaiset in vitro -tulokset ja lähellä ärsyttävyyden rajaa olevat kanikoetulokset, kun taas hyviä tuloksia tuottaneissa EPiTRI ja KeraSkin -malleissa käytetyt OECD:n ohjeistamat kemikaalit ovat alunperinkin selkeämpiä luokitukseltaan (Jírová ym. 2010;

Han ym. 2020; Liao ym. 2021). Jírován ym. (2010) tuloksiin voi myös vaikuttaa se, että tutkimus on verrattavista tutkimuksista vanhin, joten mallit ovat voineet kehittyä tutkimusten välisenä aikana.

Taulukosta nähdään, että epidermismallien tarkkuus suhteessa kanin ihoon on melko korkea, vaikkei tarkkuus ylläkään täyteen vastaavuuteen minkään mallin kohdalla. Kuitenkin havaitaan, että tarkkuus on suurempi suhteessa HPT:n tuloksiin kuin kanikokeen tuloksiin. Sama ilmiö toistuu myös herkkyyksillä ja spesifisyyksillä. Validaatiotutkimuksia lukuun ottamatta mallien herkkyys suhteessa kanidataan on melko matala (Jírová ym. 2010; Sugiyama ym. 2018). Tämä tarkoittaa sitä, että vain noin puolet kanille ärsyttävistä aineista aiheutti ärsytystä epidermismalleille. Herkkyys kuitenkin kasvaa merkittävästi, kun malleja verrataan HPT-dataan. Tulos selittyy kanin ihon suuremmalla herkkyydellä suhteessa ihmisiin, eli jotkin kemikaalit, jotka eivät ole ärsyttäviä ihmisiholle aiheuttavat kuitenkin ihoärsytystä kanille (Jírová ym. 2010). Referenssikemikaaleilla testatut mallit osoittivat kuitenkin suurta herkkyyttä (Han ym. 2020; Liao ym. 2021). Tämä on olennaista uusien malleja kehitellessä, sillä tunnistamatta jääneet ärsyttävät kemikaalit voivat aiheuttaa huomattavan terveysriskin. Tutkimuksissa saadut spesifisyydet ovat myös melko hyvät, mikä tarkoittaa, että vääriä positiivisia tuloksia ei ole paljon. Myös spesifisyydet pääosin kasvavat, kun mallia verrataan kanin sijaan ihmisiin. Kemikaalien luokittelujen perusteella epidermismallit vastaavat siis selkeästi paremmin ihmisiä kuin kanin ihoa.

Jotta uusi malli voi tulla OECD:n hyväksymäksi, sen tulee saavuttaa 20:n määrätyn testikemikaalin kanssa vähintään 75 % tarkkuus, 80 % herkkyys ja 70 % spesifisyys (OECD 2021). EPI TRI ja KeraSkin -malleilla tarkkuus ja herkkyys ovat vaadittuja merkittävästi paremman, mutta spesifisyys on kummassakin tismalleen vähimmäismäärän verran (Han ym. 2020; Liao ym. 2021). Muista malleista myös EpiSkin ja LabCyte -mallien spesifisyys on samalla tasolla (Liao ym. 2021). On perusteltua sallia spesifisyydelle muita määreitä matalampi raja-arvo, sillä matalan spesifisyyden tuomat väärät positiiviset tulokset haittaavat lähinnä tuottajia, mutta eivät aiheuta riskiä käyttäjille.

OECD:n raja-arvo laboratorion sisäiselle toistettavuudelle on 90 % ja laboratorioden väliselle toistettavuudelle 80 % (OECD 2021). Nämä toistettavuudet viittaavat siihen, kuinka samanlaisina ärsytysluokitukset pysyvät samalle kemikaalille eri kokeiden välillä samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa. KeraSkinin keskiarvot olivat sisäiselle toistettavuudelle 98,3 % ja laboratorioden väliselle toistettavuudelle 100 % (Han ym. 2020). EPI TRI-mallin vastaavat arvot olivat 100 % ja 95 % (Liao ym. 2021). Myös muut hyväksytyt mallit ylittävät nämä rajat, joten saatujen ärsytysluokitusten voidaan luottaa olevan tietyille kemikaalille ja mallille hyvin samat eri kokeiden välillä.

Kokeissa, joissa epidermismalleja verrattiin sekä kanin että ihmisen ihoon, huomattiin epidermismallien kuvaavan kanikokeita tarkemmin ihmisiin reaktioita (Jírová ym. 2010; Sugiyama ym. 2018). Kanikokeiden tarkkuus suhteessa HPT-kokeisiin oli 56 % (Jírová ym. 2010) ja 84,6 % (Sugiyama ym. 2018), kun taas epidermismallien tarkkuudet suhteessa HPT-kokeisiin olivat 69,6 % - 76,0 % (Jírová ym. 2010) ja 90,3 % - 93,3 % (Sugiyama ym. 2018). Toisaalta kanikokeen herkkyyks suhteessa HPT-kokeeseen oli kummassakin tutkimuksessa 100 % eli kanikokeella tunnistettiin kaikki ihmisiholle ärsyttävät aineet (Jírová ym. 2010; Sugiyama ym. 2018).

Kanin ihoärsytyskokeessa on tunnetusti haasteita, jotka horjuttavat sen luotettavuutta. Ensinnäkin ärsytyksen luokittelu on subjektiivista, sillä arviointi perustuu vain punoituksen ja turvotuksen kvalitatiiviseen tarkasteluun (Jírová ym. 2010). Arvioinnista myös puuttuvat osa ärsytyksen seurauksista, kuten rakkuloiden, rupien ja haavojen muodostuminen (Jírová ym. 2010). Kanikoe on saanut osakseen kritiikkiä myös sen tuottamien tulosten suuresta vaihtelevuudesta sekä eri kaniyksilöiden että eri laboratorioiden välillä (Rooney ym. 2021). Vaihtelevuutta tutkittiin tarkemmin vertaamalla tietokannoista kemikaalien eri kanikoetuloksia keskenään ja laskemalla todennäköisyyksiä sille, että luokitus pysyy samana eri tutkimuksissa (Rooney ym. 2021).

Siinä missä epidermismalleilla kemikaalit voidaan luokitella ärsyttäviin ja ei-ärsyttäviin aineisiin, kanikokeella ärsyttäviä aineita voidaan luokitella välikategorioihin. Ärsyttävyys voidaan jakaa kanikokeen perusteella EPA-kategorioihin I, II, III ja IV tai UN-GHS-kategorioihin 1, 2, 3 ja ei-kategoriala (Rooney ym. 2021). Näistä ensimmäiset kategoriat ovat syövyttäviä, ja IV sekä ei-kategoriala -luokitukset taas ovat ei-ärsyttäviä (Rooney ym. 2021). Epidermismallit eivät kykene luotettavasti erottamaan toisistaan kategorioita II ja III eikä kategorioita 2 ja 3, jotka vastaavat ärsyttäviä ja lievästi ärsyttäviä kemikaaleja (Rooney ym. 2021).

Kanikokeen toistettavuustutkimuksessa havaittiin, että kategorioiden I, IV, 1 ja ei-kategoriala toistettavuus oli pääosin hyvä, eli ne todennäköisesti luokitellaan samoin eri tutkimuksissa (Rooney ym. 2021). Sen sijaan välikategorioissa tulos oli selkeästi heikompi. Eri kriteereillä valitut datat antoivat kategorioille II ja 2 toistettavuusiksi 28,1 % - 47,8 % ja 63,6 % (Rooney ym. 2021). Luokkien III ja 3 toistettavuudet puolestaan olivat 42,5 % - 53,6 % ja 45,5 % (Rooney ym. 2021). Välikategorioissa oli siis lähes yhtä todennäköistä saada seuraavalla testikerralla eri luokitus kokeelle kuin saada uudelleen sama luokitus. Lievän ihoärsytyksen luokitus muuttui todennäköisimmin ei-ärsyttäväksi, kun taas kohtalaisen ihoärsytyksen luokitus muuttui todennäköisemmin vähemmän ärsyttäviin kategorioihin, mutta monesti myös syövyttävään luokkaan (Rooney ym. 2021). Kanikokeiden toistettavuus on siis merkittävästi heikompi kuin epidermismalleilla, mutta toistettavuuksien vertailuissa tulee huomioida kanikokeiden useammat kategoriat. Mikäli kanikokeiden tulokset jaettaisiin epidermismallien tapaan vain kahteen

katteeseen, toistettavuus olisi merkittävästi lähempänä epidermismallien toistettavuuksia, vaikkei siltikään yhtä korkea (Rooney ym. 2021).

Kanikokeen epätarkkuuksista huolimatta uusilta ihoärsytysmalleilta vaaditaan kanikokeita vastaavia tuloksia (Jírová ym. 2010; Rooney ym. 2021). Tämä tuottaa haasteita mallien validaatioille, sillä vaikka mallit vastaisivat hyvin ihmisihoa, ne saattavat tuottaa liian erilaisia tuloksia kanikokeisiin verrattuna. HPT-dataan on kuitenkin kanidataa vähemmän saatavilla, johtuen esimerkiksi vaatimuksista testata vain turvallisiksi tiedettyjä kemikaaleja, joten vaatimus ihmisihoa vastaavista tuloksista on hankalampi toteuttaa ja testata. Toisaalta kanikokeen herkkyyden etuna on matala riski ärsyttävän aineen tunnistamatta jäämiselle, mikä suojaa kuluttajia ja tuottajia. Kuitenkin liian suuri herkkyys aiheuttaa omat haasteensa esimerkiksi tuottajille, mikäli kemikaaleja hylätään väärän datan perusteella.

4.2 Lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystulokset

Epidermismallien ja in vivo -menetelmien vastaavuutta lääkitäyttöjen laitteiden aiheuttaman ihoärsytyksen mallintamisessa tutkittiin vertailemalla neljää viimeaikaista tutkimusta. Kandárová ym. (2018) tutkivat ärsyttävyyksiä 4:n ja 18:n tunnin HPT:lla, ja vertasivat tuloksia aikaisempaan ihonsisäiseen ja -ulkoiseen kanikoedataan sekä aiemman tutkimuksen EpiDerm-mallin tuloksiin. De Jong ym. (2018) toteuttivat kansainvälisen monilaboratoriokokeen, jossa ärsyttävyyden luokaltaan tunnettujen polymeeristen lääkitäyttöjen materiaalien ihoärsytystä arvioitiin EpiDerm- ja SkinEthic-malleilla. Jatkotutkimuksessa De Jong ym. (2020) tutkivat ihoärsytystä näiden mallien lisäksi myös kanin ihonsisäisellä ja -ulkoisella kokeella. Tutkimuksista uusimmassa Pellevoisin ym. (2022) tutkivat lääkitäyttöjen laitteiden lievästi ärsyttävien aineiden ja uuttoon sopimattomien aineiden ihoärsytystä SkinEthic-mallilla.

Puhtaiden kemikaalien ihoärsytystutkimuksiin verrattuna testimateriaaleja on käytössä huomattavasti vähemmän lääkitäyttöjen laitteiden ihoärsytystestaukseen. Ensimmäisessä tutkimuksessa käytettiin neljää polymeerien valmistuksessa käytettävää ärsyttävää kemikaalia, jotka olivat heptaanihappo, natriumdodekyylisulfaatti (SDS), Genapol X-80 ja DL-maitohappo (Kandárová ym. 2018). Kemikaaleja testattiin joko seesamiöljyssä tai fysiologisessa suolaliuoksessa, ja lisäksi testimateriaalina käytettiin polyvinyylidikloridia ja Genapol X-80:tä sisältävää Y-4-polymeeriä uutettuna kumpaankin liuottimeen (Kandárová ym. 2018). Monilaboratoriokokeessa sekä sen jatkotutkimuksessa puolestaan testimateriaaleina oli polymeereja, joista osaan lisättiin polymeeraatioprosessissa ärsyttäviä kemikaaleja (De Jong ym. 2018; 2020). Kokeissa ärsyttävinä kemikaaleina olivat Genapol X-80, Genapol-X-100, heptaanihappo sekä natriumdodekyylisulfaatti, ja näistä valmistetuista polymeereista tehtiin uutteen seesamiöljyyn sekä fysiologiseen suolaliuokseen (De Jong ym. 2018; 2020). Viimeisessä

tutkimuksessa materiaaleina olivat yhdeksän kanikokeella lievästi ärsyttäväksi todettua kemikaalia, joita lisättiin eri pitoisuuksina lääkinällisten laitteiden uutteisiin (Pellevoisin ym. 2022). Lisäksi testattiin yhdeksää ei-uutettavaa lääkinällisten laitteiden materiaalia, joihin lisättiin vahvasti ärsyttävää heptaanihappoa ja lievästi ärsyttävää 2-etoksietyylimetakrylaattia (Pellevoisin ym. 2022).

Testimateriaalit olivat tutkimuksissa pääosin samat, joskin lievästi ärsyttävien aineiden tutkimuksessa materiaalit olivat täysin erilaiset kuin muissa tutkimuksissa, joissa käytettiin huomattavasti vahvempia ärsyttäviä aineita (Pellevoisin ym. 2022). Ei-uutettavien aineiden tutkimuksessa pohjamateriaalit olivat myös hyvin eri tyyppisiä kuin toisissa tutkimuksissa, mutta näihin lisättävää heptaanihappoa käytettiin myös muissa tutkimuksissa. Kandárová ym. (2018) tutkimuksen ärsyttävät kemikaalit olivat DL-maitohappoa lukuun ottamatta samat kuin De Jong ym. (2018; 2020) tutkimuksissa, mutta kemikaalit testattiin Y-4-polymeeriä lukuun ottamatta seesamiöljyyn ja fysiologiseen suolaliuokseen liuotettuina nesteinä eikä polymeereistä tehtyinä uutteina. Kemikaalien pitoisuudet olivat kuitenkin hyvin matalat, jotta nämä vastaisivat lääkinällisten laitteiden uutteisissa esiintyviä pitoisuuksia (Kandárová ym. 2018). Toisin kuin puhtaiden kemikaalien ihoärsytystutkimuksissa, lääkinällisten laitteiden tutkimuksissa tuloksien kuvaamisessa ei juurikaan käytetty tarkkuuksia, herkkyksiä ja spesifisyyksiä vastaavia tunnuslukuja, johtuen mahdollisesti huomattavasti pienemmistä tutkittavien aineiden määrästä.

Kandárován ym. (2018) tutkimuksessa kanin ihon pintatesti tunnisti ärsyttävien aineiden laimeista liuoksista ärsyttäväksi ainoastaan 1 % SDS -liuoksen. Kanin ihonsisäinen testi puolestaan tunnisti kaikkien paitsi laimeimpien Genapol-liuosten ärsytyspotentiaalin. 4:n tunnin HPT:lla ärsytysreaktioita syntyi SDS-liuoksista sekä yksittäisille koehenkilöille myös Genapol-liuoksista. 18:n tunnin HPT odotetusti tunnisti useammat SDS-liuokset ärsyttäväiksi, mutta tässäkin kokeessa muut testiaineet aiheuttivat ärsytysreaktioita pääosin vain yksittäisille koehenkilöille. Sen sijaan EpiDerm-malli tunnisti muutamaa Genapol-liuosta lukuun ottamatta kaikki kokeen ärsyttävät kemikaalit. Y-4-polymeeriuutteen ärsyttävyyden tunnistivat menetelmistä EpiDerm sekä osa kanin ihonsisäisistä testeistä. Sen sijaan kanin ihon pintatesti ja HPT luokittelivat polymeerin ei-ärsyttäväksi. (Kandárová ym. 2018)

Koska aineita ei eettisistä syistä testattu ihmisillä ihonsisäisesti, on aineiden aiheuttamia reaktioita ihonsisäisissä lääkinällisissä laitteissa vaikea määrittää tarkasti. Tällöin myös muiden menetelmien vertailu ihmisiin reaktioihin aiheuttaa haasteita. Käytetyistä menetelmistä herkimpiä olivat EpiDerm-malli sekä kanin ihonsisäinen testi, jotka olivat lähes yhtä herkkiä. Tutkimuksen perusteella EpiDerm-malli vastaa siis hyvin lääkinällisten laitteiden tyyppistä in vivo -testausmenetelmää. On kuitenkin mahdollista, että kaikki mallilla ja kanikokeella ärsyttäväksi luokitellut aineet eivät todellisuudessa aiheuttaisi ärsytystä ihonsisäisesti pienten pitoisuuksiensa vuoksi, mutta toisaalta menetelmien suuri herkkyys suojaa kuluttajaa huomaamatta jääneiltä ärsytysreaktioilta.

De Jong ym. (2018) monilaboratoriokokeessa EpiDerm ja SkinEthic -mallit tuottivat myös lupaavia tuloksia tunnetuilla testimateriaaleilla. EpiDerm-malli arvioi ihoärsytyksen oikein 16:n laboratorion otannan perusteella 99,7 % tapauksista fysiologisissa suolaliuosuutteissa ja 94,0 % tapauksista seesamiöljyuutteissa. SkinEthic-malli puolestaan arvioi 8:n laboratorion otannalla ihoärsytyksen oikein 90,5 % tapauksista fysiologisissa suolaliuoksissa ja 98,2 % seesamiöljyuutteissa. Kummankin mallin kohdalla suurin osa vääristä luokituksesta tapahtui silikoni + 25 % heptaanihappo -liuoksen kohdalla. Liuos on aiempien tutkimusten mukaan ärsyttävä poolittomissa liuoksissa, eli kokeen tapauksessa seesamiöljyssä, ja ei-ärsyttävä poolisissa liuoksissa, kuten fysiologisessa suolaliuoksessa. Kokeessa epidermismallit kuitenkin luokittelivat liuosta jonkin verran väärin sekä seesamiöljyuutteena sekä fysiologisen suolaliuoksen uutteenä. (De Jong ym. 2018)

Monilaboratoriokokeessa laboratorion sisäiselle toistettavuudelle saatiin tuloksiksi EpiDerm-mallille 99,1 % fysiologisissa suolaliuosuutteissa ja 85,3 % seesamiöljyuutteissa. Vastaavat tulokset SkinEthic-mallille olivat 89,3 % ja 100 %. Laboratorioiden välisen toistettavuuden tulokset olivat EpiDerm-mallille 100 % fysiologisissa suolaliuosuutteissa ja 92,4 % - 96,2 % seesamiöljyuutteissa. SkinEthic-mallin vastaavat tulokset olivat 89,3 % - 92,9 % ja 100 %. Kaikissa toistettavuuskokeissa silikoni + 25 % heptaanihappo -liuos aiheutti suurimman osan poikkeamista. (De Jong ym. 2018)

Jatkotutkimuksessa De Jong ym. (2020) suorittivat vielä lisätutkimuksia kanikokeilla ja samoilla epidermismalleilla. Tutkimuksessa verrattiin SkinEthic-mallin ihoärsytystuloksia kanin ihonsisäisiin ärsytystuloksiin ja havaittiin, että luokitukset olivat näiden välillä samat, joskin kumpikin menetelmä arvioi väärin heptaanihapollisen silikonin ärsytyksen (De Jong ym. 2020). Tutkimuksen toisessa osiossa arvioitiin 45:n lääkinällisen laitteen materiaalin ihoärsyttävyyksiä EpiDerm-mallilla ja kanin ihonsisäisellä kokeella. Kummallakin menetelmällä kaikki materiaalit luokiteltiin ei-ärsyttäviksi, joten eroja ei ilmennyt epidermismallin ja kanikokeen välillä (De Jong ym. 2020). Epidermismallit vaikuttavatkin vastaavan melko tarkasti kanin ihonsisäistä koetta lääkinällisten laitteiden ihoärsytystestauksessa.

Monilaboratoriokokeen ja sen jatkotutkimuksen tulokset viittaavat mallien toimivan hyvin in vivo -menetelmien korvaajina lääkinällisten laitteiden ihoärsytystestauksessa. Toistettavuus vaikuttaa olevan hyvällä tasolla, ja pääosin tulokset olivat erittäin johdonmukaisia. Heptaanihapollinen silikoni aiheutti kuitenkin paljon heittelyä tuloksiin. Aikaisemmassa Kandárován ym. (2018) tutkimuksessa heptaanihappo ilman silikonia aiheutti ärsytysreaktion sekä kanissa että epidermismallissa. Samoin jatkotutkimuksessa heptaanihappo itsessään aiheutti positiivisen ärsytysreaktion kanin ihonsisäisessä testissä, mutta heptaanihapollinen silikoni ei aiheuttanut reaktiota kanilla eikä epidermismalleilla (De Jong ym. 2020). Myös monilaboratoriotutkimuksessa heptaanihapollinen silikoni tuotti eri kokeissa hyvin vaihtelevia tuloksia (De Jong ym. 2018). Heptaanihapollinen silikoni saattaaakin soveltua huonosti validaatiotutkimuksen positiiviseksi testimateriaaliksi.

Pellevoisinin ym. (2022) tutkimuksessa lievästi ärsyttävien aineiden ihoärsytystutkimus paljasti, että SkinEthic-mallin solujen elävyys väheni, kun lievästi ärsyttävän aineen konsentraatiota kasvatettiin. Fysiologisessa suolaliuosuutteessa pitoisuus, jolla aine luokiteltiin ärsyttäväksi, oli aineesta riippuen 1,0 % - 10,1 % (Pellevoisin ym. 2022). Ärsyttäviä aineita tunnistettiin siis lääkinnällisistä laitteista melko pienilläkin pitoisuuksilla, mikä vahvistaa menetelmän olevan varsin herkkä.

Myös ei-uutettujen aineiden testissä solujen elävyydet laskivat pääosin konsentraatioriippuvaisesti (Pellevoisin ym. 2022). Kun ei-uutettaviin aineisiin lisättiin heptaanihappoa 0,5 % - 1 %, solujen elävyydet laskivat huomattavasti (Pellevoisin ym. 2022). Testissä kuitenkin havaittiin kahden aineen aiheuttavan voimakkaan ärsytysreaktion jo ilman ärsyttävän aineen lisäämistä. Kun aineisiin lisättiin lievästi ärsyttävää 2-etoksietyylimetakrylaattia, tulokset olivat hieman epäselvempiä. Pääosin elävyydet laskivat edelleen ärsyttävän aineen konsentraation kasvaessa, mutta yksi täyteaine tuotti negatiivisen tuloksen kaikilla konsentraatioilla, ja toinen täyteaine puolestaan muuttui positiivisesta negatiiviseksi konsentraation kasvaessa, mutta tämä saattoi johtua sekoitusvirheestä (Pellevoisin ym. 2022). Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että myös ei-uutettavien lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystä voitaisiin testatata ISO-protokollan menetelmin. Kahden kaupallisesti hyväksytyyn aineen luokittelu ärsyttäväksi voi viitata menetelmän olevan aiempia menetelmiä herkempi. Kuitenkin tarkempaa tutkimusta tarvitaan, jotta erityisesti lievästi ärsyttävien ei-uutettavien aineiden ihoärsytystulosten johdonmukaisuus pystytään varmistamaan ja tarvittaessa optimoimaan menetelmää soveltumaan paremmin tähän käyttötarkoitukseen.

Kaikissa käsitellyissä tutkimuksissa epidermismalleilla on tunnistettu suurimmaksi osaksi oikein eri aineiden ärsyttävyydet. Joitakin väärin luokiteltuja aineita kuitenkin ilmeni, esimerkiksi tilanteissa, joissa solujen elävyys on ollut hyvin lähellä raja-arvoa. Epidermismallien luotettavuuden parantamiseksi solujen elävyyden rinnalle on kehitetty myös toisenlaisia tapoja arvioida ihoärsytystä. Lupaavia tuloksia on saatu muun muassa sytokiinimittauksista (Kato ym. 2020). Sytokiinit ovat viestimolekyyliä, jotka ohjailevat myös ihoärsytykselle tyypillistä tulehdusreaktiota.

Aikaisemmat tutkimukset ovat ehdottaneet IL-1 α -sytokiinin käyttöä ihoärsytyksen vaihtoehtoisena arviointimenetelmänä, mutta myöhemmät tutkimukset ovat osoittaneet, että tämä ei välttämättä korreloi tarpeeksi solujen elävyyden kanssa (Kato ym. 2020). Kato ym. (2020) tekemässä tutkimuksessa EpiDerm, LabCyte ja SkinEthic -malleista mitattiinkin muiden vaihtoehtoisten sytokiinien pitoisuuksia ärsyttävyyksiluokiltaan erilaisten aineiden lisäyksen seurauksena. Tutkimuksessa havaittiin, että erityisesti makrofagimigraation inhibiitiofaktori (MIF) voisi toimia lupaavana toisiomarkkerina ihoärsytyksen arvioinnille (Kato ym. 2020).

Tutkimuksessa MIF:n avulla tehdyt ärsytyslukitukset vastasivatkin pääosin solujen elävyyksien perusteilla tehtyjä luokituksia, kun MIF:n raja-arvoina olivat 300 ng/ml EpiDerm-mallille sekä 100 ng/ml LabCyte-mallille (Kato ym. 2020). Siinä missä LabCyte luokitteli heptaanihapollisen silikonin

epäjohdonmukaisesti eri testeissä, MIF:n avulla saatiin tälle selkeästi positiivinen tulos sekä seesamiöljyssä että fysiologisessa suolavesiliuoksessa (Kato ym. 2020). Kuitenkin aikaisempien tutkimusten mukaan heptaanihapollisen silikonin tulisi olla ärsyttävä vain poolittomissa uutteisissa eli tässä tapauksessa seesamiöljyssä (De Jong ym. 2018). Sytokiinimarkkereiden ongelmana on myös niiden määrän lasku liian vahvoilla kemikaaleilla testatessa, sillä mikäli solut kuolevat liian nopeasti, ei sytokiineja ehdi muodostumaan (Kato ym. 2020). MIF-sytokiinit kestivät tutkimuksen mukaan kuitenkin suurempia ärsyttävien aineiden pitoisuuksia kuin aiemmin tutkitut IL-1 α -sytokiinit, mikä vahvistaa MIF:n soveltuvuutta ihoärsytyksen testaukseen (Kato ym. 2020). Sytokiinien rajoitteena ovat vielä lisäksi niiden erilaiset raja-arvot eri malleilla, minkä vuoksi arvot pitäisi vielä erikseen tutkia ja säätää muille malleille, joille sytokiinimarkkereita halutaan soveltaa.

MIF on siis lupaava vaihtoehtoinen ihoärsytyksen toteamistapa elävyyksien tarkastelun rinnalle, ja se voisikin auttaa etenkin tapauksissa, joissa solujen elävyydet eivät anna johdonmukaista tulosta ihoärsytyksestä. Menetelmässä on kuitenkin vielä useita haasteita, joten se vaatii yhä kehitystä ennen sen mahdollista validointia. Myös muita parannuksia malleille ja solujen elävyydelle vaihtoehtoisia mittaustapoja on kehitteillä, joten epidermismallit kehittynevät tulevaisuudessa yhä tarkemmiksi ihoärsytyksen mittausten menetelmiksi.

5. YHTEENVETO

In vitro -epidermismallit ovat ihmisen keratinosyyteistä kasvatettuja keinotekoisia epidermiksiä, joita käytetään ihoärsytyksen testaukseen erityisesti puhtailla kemikaaleilla ja lääkinnällisillä laitteilla. Rakenteeltaan mallit vastaavat melko tarkasti ihmisen epidermistä, mutta siitä poiketen osa luontaisista epidermisen solutyypeistä puuttuu malleista. Eroina ovat lisäksi epidermismalleilla alemman ihokerroksen puute, erilainen rasvahappokoostumus ja läpäisevyys sekä suurempi paksaus. Näistä huolimatta mallien rakenne vastaa ihmisihoa paremmin kuin ärsytystutkimuksissa perinteisesti käytetty kanin iho.

Ihoärsytyksen testauksen ohjeista vastaavat puhtailla kemikaaleilla OECD:n testiohje 439 ja lääkinnällisillä laitteilla ISO-standardi 10993-23:2021. Ärsyttävyys määritellään epidermismalleilla mittaamalla kemikaalille altistuneiden solujen elävyys suhteessa negatiivisen kontrollin soluihin. In vivo -menetelmien kvalitatiivisiin arviointeihin verrattuna tämä on huomattavasti objektiivisempi mittaustapa ja tuottaa toistettavampia tuloksia. Mallien käyttörajoitteina ovat muun muassa menetelmien soveltumattomuus tietyntyyppisille aineille, kuten esimerkiksi kaasuille, sekä mahdollisuus vain ihon ärsytyksen mallintamiseen, jolloin ulkopuolelle jäävät esimerkiksi limakalvot. Etuina

malleilla puolestaan on niiden helppokäyttöisyys ja objektiivisuus suhteessa in vivo -kokeisiin sekä kustannustehokkuus.

Puhtaiden kemikaalien ihoärsytystestauksessa epidermismallit vastaavat varsin tarkasti ihmisiin reaktioita. Tarkkuus on saatu jopa korkeammaksi kuin kanin ihokokeessa, joskin epidermismalleilla on hieman suurempi todennäköisyys sille, että jokin ärsyttävistä aineista jää tunnistamatta. Tarkkuuden lisäksi epidermismallien etuina suhteessa kanikokeeseen on niiden toistettavuus. Kaniko-keiden yhtenä ongelmana on niiden tuottamien tulosten suuri vaihtelevuus, mikä taas on saatu korjattua epidermismalleihin.

Lääkinnällisten laitteiden ihoärsytystestaus epidermismalleilla on selkeästi uudempi tutkimus-kohte, mikä näkyy pienemmässä määrässä tutkimustuloksia. Tulokset ovat keskenään melko samanlaisia, johtuen myös testimateriaalien pienestä määrästä ja vaihtelevuudesta. Tutkimukset kuitenkin osoittavat, että epidermismallit vastaavat myös lääkinällisten laitteiden testauksen osalta varsin hyvin in vivo -malleja. Tarkkuudet ovat jopa suurempia kuin puhtaiden kemikaalien testissä, mutta tämäkin voi johtua pienemmästä testimateriaalien määrästä. Tärkeä tulevaisuuden kehitys-kohte olisikin uusien positiivisten testimateriaalien kehittäminen kattavampien tutkimustulosten saamiseksi. Tutkimusten perusteella kokeet epidermismalleilla vastaavat melko tarkasti kanin ihon-sisäisiä kokeita, jotka ovatkin olleet tähän asti tärkeimpiä mallinnusmenetelmiä lääkinällisille lait-teille. Tarkkuuksia voisi mahdollisesti parantaa entisestään mittaamalla solujen elävyyden rinnalla myös sytokiineja, mutta tämä vaatii vielä lisää tutkimusta.

Epidermismallien rajoitteena on ennen kaikkea se, että näillä ei kyetä luokittelemaan ihoärsytystu-loksia eri kategorioihin. Tämä rajoittaa käyttöä etenkin maissa, joiden lainsäädäntö vaatii ihoärsy-tyksen tarkan kategorian selvittämisen. Toisaalta kanikokeissa, joissa tarkka kategorisointi on mah-dollista, toistettavuus on huono ja ärsyttävällä aineella on suuri todennäköisyys saada eri kategoria seuraavalla testikerralla. On siis perusteltua kyseenalaistaa tarkan luokittelun merkityksellisyys. On myös mahdollista, että epidermismalleille kyetään tulevaisuudessa kehittämään keinoja ihoärsy-tyksen tarkempaan luokitteluun. Kenties sytokiinimarkkereita tutkimalla voisi löytyä sopivat mark-kerit ja raja-arvot eri voimakkuuden ihoärsytyksille.

Epidermismalleja käytetään yleisimmin ihoärsytyksen testaukseen, mutta niillä on sovelluskohteita myös muun muassa ihokorroosion, valotoksisuuden, lääkkeiden ja ihon läpäisevyyden testauk-sissa (Dijkhoff ym. 2021). Muokkaamalla malleja esimerkiksi niiden solukoostumuksen osalta mah-dolliset sovelluskohteet laajenevat entisestään. Epidermismallit ovat jo nyt korvanneet pitkälti in vivo -ihoärsytyskokeita, ja tulevaisuudessa näillä on potentiaalia korvata myös muunlaisia eläinko-keita.

6. LÄHTEET

- De Jong WH, Carraway JW, Liu C ym. (2020). "The suitability of reconstructed human epidermis models for medical device irritation assessment: A comparison of In Vitro and In Vivo testing results". *Toxicology in Vitro* 69 (joulukuuta): 104995. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104995>.
- De Jong WH, Hoffmann S, Lee M ym. (2018). "Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts". *Toxicology in Vitro* 50 (elokuuta): 439–49. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.001>.
- Dijkhoff IM, Petracca B, Prioux R ym. (2021). "Cultivating a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis at a Large Scale". *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, nro 171 (toukokuuta). <https://doi.org/10.3791/61802>.
- Han J, Kim S, Lee S ym. (2020). "Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin™ for OECD test guideline 439". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 117 (marraskuuta): 104725. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104725>.
- Heinonen T ja Tähti H (2013). "Eläinkokeeton toksikologia kemikaalien turvallisuustestauksessa". *Duodecim*, 2013.
- Hofmann E, Schwarz A, Fink J ym. (2023). "Modelling the Complexity of Human Skin In Vitro". *Biomedicines* 11 (3): 794. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030794>.
- ISO (2021). "Biological evaluation of medical devices. Part 23: Tests for irritation (ISO 10993-23:2021)". *International Organization for Standardization, Geneva*. <https://online.sfs.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/984149.html.stx>.
- Jírová D, Basketter D, Liebsch M ym. (2010). "Comparison of Human Skin Irritation Patch Test Data with in Vitro Skin Irritation Assays and Animal Data". *Contact Dermatitis* 62 (2): 109–16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01640.x>.
- Kandárová H, Bendova H, Letasiova S ym. (2018). "Evaluation of the medical devices benchmark materials in the controlled human patch testing and in the RhE in vitro skin irritation protocol". *Toxicology in Vitro* 50 (elokuuta): 433–38. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.009>.
- Kato R, Miyajima A, Komoriya K ym. (2020). "Novel cytokine marker available for skin irritation testing of medical devices using reconstructed human epidermis models". *Toxicology in Vitro* 68 (lokakuuta): 104919. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104919>.
- Liao C, Wu C, Lin M ym. (2021). "Validation study of a new reconstructed human epidermis model EPiTRI for in vitro skin irritation test according to OECD guidelines". *Toxicology in Vitro* 75 (syyskuuta): 105197. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105197>.
- OECD (2015). "Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion". *Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264242678-en.

- OECD (2017). "Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation". *Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-an-integrated-approach-on-testing-and-assessment-iata-for-skin-corrosion-and-irritation_9789264274693-en.
- OECD (2021). "Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method". *Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en.
- Pellevoisin C, Coleman KP, ja Hoffmann S (2022). "ISO 10993-23 In vitro irritation testing for medical devices: Substantiating applicability to mild irritants and non-extractables". *Toxicology in Vitro* 82 (elokuuta): 105371. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105371>.
- Rooney JP, Choksi NY, Ceger P ym. (2021). "Analysis of variability in the rabbit skin irritation assay". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 122 (kesäkuuta): 104920. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104920>.
- Sugiyama M, Akita M, Alépée N ym. (2018). "Comparative Assessment of 24-Hr Primary Skin Irritation Test and Human Patch Test Data with in Vitro Skin Irritation Tests According to OECD Test Guideline 439 (For Quasi-Drugs in Japan)". *Journal of Toxicological Sciences* 43 (12): 751–68. <https://doi.org/10.2131/jts.43.751>.
- Uhm C, Jeong H, Lee SH ym. (2023). "Comparison of Structural Characteristics and Molecular Markers of Rabbit Skin, Pig Skin, and Reconstructed Human Epidermis for an Ex Vivo Human Skin Model". *Toxicological Research* 39 (3): 477–84. <https://doi.org/10.1007/s43188-023-00185-1>.