



UNIVERSITY
OF TAMPERE

This document has been downloaded from
TamPub – The Institutional Repository of University of Tampere

 *Publisher's version*

The permanent address of the publication is <http://urn.fi/URN:NBN:fi:uta-201501051009>

Author(s): Heinonen, Tuula; Tähti, Hanna
Title: Eläinkokeeton toksikologia kemikaalien turvallisuustestauksessa
Year: 2013
Journal Title: Duodecim
Vol and number: 129 : 16
Pages: 1686-1694
ISSN: 0012-7183
Discipline: Pharmacy
School /Other Unit: School of Medicine
Item Type: Journal Article
Language: fi
URN: URN:NBN:fi:uta-201501051009
URL: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo11156.pdf>

All material supplied via TamPub is protected by copyright and other intellectual property rights, and duplication or sale of all part of any of the repository collections is not permitted, except that material may be duplicated by you for your research use or educational purposes in electronic or print form. You must obtain permission for any other use. Electronic or print copies may not be offered, whether for sale or otherwise to anyone who is not an authorized user.

Eläinkokeeton toksikologia kemikaalien turvallisuustestauksessa

Kemikaalien turvallisuutta ihmiselle pyritään parantamaan in vitro -tutkimusmenetelmillä, joissa käytetään koe-eläinten asemesta tai niiden rinnalla ihmisen solu- ja kudostalleja. Uutta testaustapaa (AOP) hyödynnettäessä kemikaalin haitta arvioidaan vaikutusreittein eri kohdissa. In vitro -testit ovat nopeita ja tehokkaita, ja niihin voidaan soveltaa automaatiota. Testaustavan muutosta ajavat kaikki intressitahot: tiedemaailma, viranomaiset ja eläinsuojelijat. Uusien menetelmien syntyminen ovat nopeuttaneet EU-lainsäädännön eläinkokeille ja eläinten käytölle asettamat rajoitteet, yleinen eettinen mielipideilmasto ja teollisuuden tehokkuusvaatimukset. Tavoitteena on ennen kaikkea kemikaalien turvallisuustestauksen ennustavuuden parantaminen ihmisbiologiaan perustuvilla testimenetelmillä. Kemikaaliturvallisuuden arviointi ihmisolujen käyttöön pohjautuvissa tutkimusmalleissa onkin nykytoksikologiassa keskeinen periaate.

Kemikaalien turvallisuustutkimuksessa, lääketutkimuksessa ja laadunvalvonnassa on tavallisesti käytetty eläinkokeita. Viime vuosina on pyritty löytämään eläinkokeettomia ja paremmin ihmisvaikutuksia kuvaavia tutkimusmalleja useasta eri syystä. Näitä ovat EU:n koe-eläinten käyttöön liittyvän lainsäädännön asettamat velvoitteet, kosmetiikan ja kemikaalien turvallisuutta säätelevien lakien asettamat rajoitteet sekä eläintestien heikko saatavuus ja niiden puutteellinen luotettavuus ihmiselle koituvien riskien arvioinnissa. Kemikaalien turvallisuuden lisäämiseksi on vuonna 2007 tullut voimaan uusi laki (REACH), joka vel-

voittaa tutkimaan suuren määrän teollisuuskemikaaleja vuoteen 2018 mennessä (EC 2006). On arvioitu, että markkinoilla olevista teollisuuskemikaaleista lähes 90 %:sta on riittämättömästi turvallisuustietoa.

Myös lääkekehitystä ja lääkkeiden turvallisuutta halutaan parantaa luomalla uusia ihmisolujen ja kudosten käyttöön perustuvia testausmalleja. Eläinkokeet ennustavat haitallisia vaikutuksia ihmisessä arviolta vain 5–25 %:n varmuudella (Heywood 1990). Syy epäonnistumisiin markkinointivaiheessa ja lääkkeen vetämiseen pois markkinoilta on yleensä valmisteen eläintoksikologisessa tutkimuksessa, jossa haittaa ei ole havaittu (Schoonen ym. 2011). Lääkkeen kehittämissivaiheessa keskeyttämisen syitä ovat olleet lääkkeen heikko teho (51 %), toksisuus (19 %), farmakokinetiikka, biologinen saatavuus (1 %) sekä strategiset tekijät (29 %) (Arrowsmith 2011).

Edistysaskeleet soluviljelyssä ja kudosteknologiassa ovat mahdollistaneet uusien ihmisolupohjaisten tutkimusmenetelmien kehittämisen. Tähän ovat vaikuttaneet myös ihmisen kudosten ja solujen saatavuuden lisääntyminen ja kantasolutekniikoiden parantuminen. Suomessa tulee 1.9.2013 voimaan ihmisperäisen materiaalin käyttöä ja tallentamista säätelevä biopankkilaki.

Koe-eläinlainsäädännön vaikutukset

Maailmassa käytetään vuosittain noin 110–130 miljoonaa koe-eläintä (Taylor ym. 2008). Euroopassa vuosittainen käyttö oli 2005 hie- man yli 12 miljoonaa eläintä. Tästä määrästä biologiseen perustutkimukseen käytettiin noin 33 %, lääketieteelliseen ja eläinlääketie-

teelliseen tutkimukseen sekä kehittämiseen 31 %, lääketieteellisten tuotteiden laadunvalvontaan ja kehittämiseen arviolta 15 %, kemikaalien turvallisuustutkimukseen noin 8 % ja loput erilaisiin pienempiin alueisiin (Liebsch ym. 2011).

Hiljattain uudistettu EU:n koe-eläindirektiivi (2010) painottaa niin sanottujen 3R-periaatteiden huomioon ottamista. Niiden mukaan koe-eläinten käyttöä pitää vähentää ja korvata sekä lisäksi koe-eläinten hyvinvointia tulee lisätä. Direktiivin tavoitteena on luopuminen elävien eläinten käytöstä tieteellisessä tutkimuksessa ja opetuksessa. Direktiivi on sisällytettävä kansalliseen lainsäädäntöön EU:n jäsenmaissa vuoden 2013 alusta lähtien. Aivan uutena asiana direktiivi edellyttää, että jäsenmaat ottavat osaa vaihtoehtoisten menetelmien kehittämiseen ja validointiin sekä niitä koskevan tiedon jakamiseen tutkijoille.

Jäsenmaiden pitää myös nimetä kansallinen yhteyshenkilö, joka edistää ja koordinoi uusien menetelmien arviointiprosessia. Eri maiden yhteyshenkilöt muodostavat niin sanotun PARERE-verkoston, joka vie eteenpäin kansainvälistä yhteistyötä vaihtoehtoisten menetelmien kehittämisessä. Suomen PARERE-henkilöksi on nimitetty dosentti Tuula Heinonen (toinen tämän artikkelin kirjoittajista), joka toimii Tampereen yliopiston lääketieteen yksikköön vuonna 2008 perustetun FICAM:n (Finnish Centre for Alternative Methods) johtajana. FICAM kehittää ja validoi ihmisen solu- ja kudasmalleja, toimii asiantuntijana ja tekee yhteistyötä EU:n tutkimuskeskuksen, (EURL ECVAM, European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) kanssa.

Kemikaalilain ja kosmetiikkalain vaikutukset

Kemikaalilaki REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) vaatii, että kaikkien markkinoilla olevien kemikaalien turvallisuus on arvioitava vuoteen 2018 mennessä. Koska lähes 90 %:sta markkinoilla olevista arviolta 100 000:sta direktiivin piiriin kuuluvasta kemikaalista on riittämättömästi tietoa, koe-eläinten käytön on arvioitu lisääntyvän huomattavasti lakiin sisältyvien tietovaatimusten takia. Aluksi turvallisuuden testaamiseen arveltiin tarvittavan 2,6 miljoonaa koe-eläintä ja 1,6 miljardia euroa (van der Jagt ym. 2004). Myöhemmän laskelman mukaan tarve olisi 54 miljoonaa koe-eläintä ja kustannukset olisivat kuusinkertaiset alkuperäiseen arvioon verrattuna (Hartung ja Rovida 2009). REACH-kemikaalilaki edellyttää, että vaihtoehtoista menetelmää käytetään aina kun se on mahdollista ja että uusia eläinkokeita saa tehdä vain kemikaaliviraston (ECHA) luvalla. Tuloksen tulee kuitenkin olla vähintään yhtä luotettava kuin eläinkokeen tulos. REACH kannustaa myös hyödyntämään olemassa olevaa tietoa, käyttämään in silico -menetelmiä (tietokonemallintamista, rakenne-aktiivisuustutkimusta) ja in vitro -menetelmiä. Testausvaatimusten laajuus on sidottu kemikaalin vuosittaiseen tuotanto- tai tuontimäärään (tonniluokkaan).

Kosmetiikkadirektiivi (76/768/EEC) ja sen jatkosäädös (EC 1223/2009) ovat asettaneet tarkat aikarajat, joiden jälkeen EU:n alueella ei voi markkinoida sellaista tuotetta, jossa lopputuotteen tai sen komponenttien testauksessa on käytetty eläinkokeita (Adler ym. 2011). Eläinkokeilla testattujen kosme-

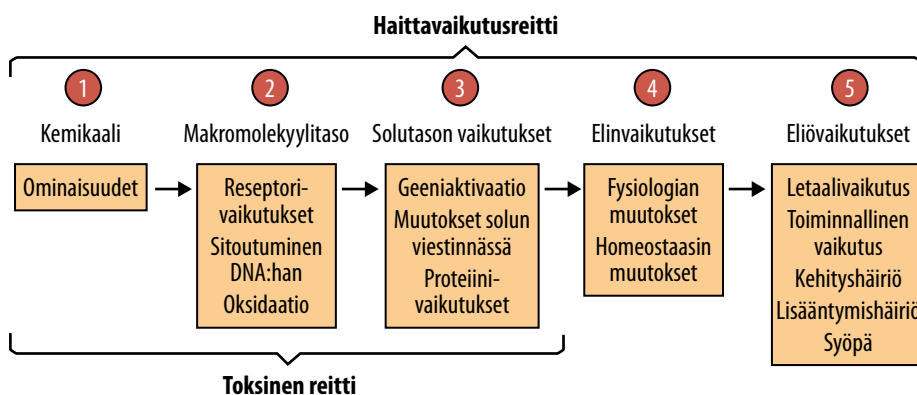
tiikan lopputuotteiden markkinointi on ollut kiellettyä vuodesta 2004 lähtien. Kosmetiikkatuotteen komponenttien tutkimiselle on asetettu kaksi aikarajaa testauksen luonteen mukaan. Akuutteja ja paikallisia vaikutuksia (akuutit vaikutukset, ihosyövyttävyyys, iho-ärsyttävyyys ja silmä-ärsyttävyyys) koskeva eläinkoekielto astui voimaan vuonna 2009. Täydellinen markkinointikielto tuli voimaan 11.3.2013, ja se koskee uusia tuotteita, joiden testauksessa käytetään eläinkokeita. Tämän aikarajan jälkeen eläintestejä ei voi käyttää myöskään toistuvan altistuksen ja pitkäkestoisien vaikutusten (krooninen toksisuus, syöpävaarallisuus, ihoherkistävyyys, lisääntymistoksisuus) testaukseen. Ongelmana on, että korvaavat menetelmät eivät ole läheskään valmiina (Adler ym. 2011).

In vitro -menetelmät ja uusi testausstrategia

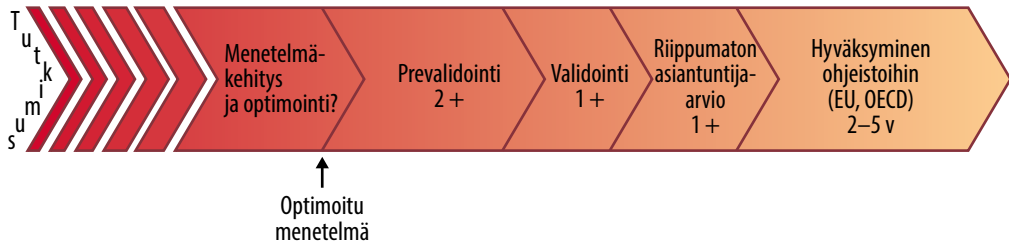
Vasta parin viime vuosikymmenen ajan on pyritty järjestelmällisesti kehittämään eläinkokeettomia testausmenetelmiä ja strategioita toksikologiseen turvallisuustutkimukseen. In vitro -menetelmissä käytetään solulinjoja, kantasoluista erilaistettuja soluja ja primaarisoluviljelmia, eri solutyypin yhteisviljelmia sekä kudos- ja elinmalleja. In silico -tutkimuksissa on käytössä useita erilaisia tietokoneohjel-

mia, joilla voidaan määrittää tietyn molekyylin kulkeutuminen elimistössä, kun tiedetään sen kineettiset ominaisuudet (rasvaliukoisuus, molekyylikoko jne.). QSAR-analyysi (quantitative structure activity research) on usein ensimmäinen tutkimusvaihe, kun selvitetään aineen haitallisuutta. Kemikaalin käyttötarkoituksen mukaan suositellaan tai edellytetään käytettäväksi portaittaista testausta. Siinä QSAR-analyysiä seuraa in vitro -tutkimusvaihe ja sen jälkeen mahdollisesti eläinkoe edellisten vaiheiden tuloksen varmistamiseksi.

Uusi testausstrategia edellyttää ihmisen biologiaa mallintavien kudos- ja elinmallien sekä portaittaisen testauksen käyttöä. Toksisuuden arviointi pohjautuu muutoksiin solutasolla kriittisissä haittavaikutusreiteissä (adverse outcome pathway, AOP) (NRC 2007, Hartung 2009 ja 2010, OECD 2011 ja 2012). Tietty toksikologinen vaikutus saattaa syntyä monien eri reittien kautta, joissa puolestaan voi olla useita vaikutuskohtia (KUVA 1). Sen vuoksi tarvitaan useita testejä kuvaamaan koko tapahtumasarja solu-, kudos- ja elintasolla (Ankley ym. 2010). Kun yhdistetään tiedot eri testeistä, saadaan selville koko elimistöön kohdistuvat vaikutukset. Heikkoutena eläinkokeeseen verrattuna on moduulimainen lähestymistapa, joka vaikeuttaa eri elinten vuorovaikutusten arviointia. Vahvuutena on ihmisen biologiaa mallintavien testien käyttö. Li-



KUVA 1. Kaavio haittavaikutusreiteistä (AOP, adverse outcome pathway). Haittavaikutus alkaa molekyyli-tason reaktiosta, jossa toksinen kemikaali sitoutuu biologiseen makromolekyyliin. Tästä seuraa tapahtumasarja, joka johtaa haitallisiin muutoksiin kudos-, elin- ja eliötasolla. Kolme ensimmäistä vaihetta määräävät toksisen vaikutuksen reitin. (Kaavio: Tarja Toimela, FICAM, Ankley ym. 2010 ja OECD:n 2011 mukaan).



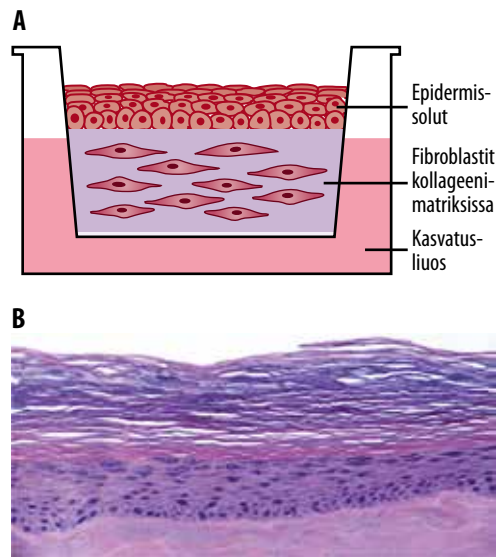
KUVA 2. Testin kehittäminen ja sen tie OECD:n ohjeistoihin. Menetelmän keksimisestä ja optimoinnista saattaa kuluja kymmenen vuotta ennen kuin menetelmä päätyy ohjeistoihin. Validointivaiheet sekä erityisesti asiantuntija-arviointi ja hyväksymisvaihe ovat hitaita, ja viimeksi mainittuja onkin pyritty nopeuttamaan.

säksi voidaan rakentaa malleja, joissa otetaan huomioon geneettiset vaihtelut (esim. maksan entsyymien aktiivisuus) tai eri sairauksien aiheuttamat muutokset kohdekudoksessa (esim. tautimallien rakentaminen).

Testin hyväksyminen ohjeistoihin on usein pitkä prosessi. Testin keksimistä (julkaisemista) seuraa perusteellinen tutkimusvaihe, jossa menetelmää kehitetään ja optimoidaan (KUVA 2). Sen jälkeen testi validoidaan toisistaan riippumattomissa laboratorioissa käyttäen tarkalleen samoja olosuhteita, testiaineita ja testaussuunnitelmia. Testin tulee pystyä ennustamaan haluttua vaikutusta riittävän hyvin ja sen on oltava luotettava ja toistettava. Validoinnissa päteviksi todetut testit joutuvat vielä asiantuntijaryhmien arviointiin. Testin kehittämisestä sen hyväksymiseen ohjeistoihin saattaa kuluja useita vuosia. Esimerkiksi iho-korroosiotestin ensimmäisestä julkaisemisesta 1990-luvun alussa sen hyväksymiseen vuonna 2002 kului kymmenen vuotta. Monille tärkeille alueille on vasta kehitteillä in vitro -menetelmiä. Maksa- ja sydäntoksisuus ovat useimmiten pääsyitä siihen, että lääke on jouduttu vetämään pois kehityksestä tai markkinoilta (Barbaric ja Andrews 2011). Kantasoluista on voitu kehittää sydänsoluja ja maksasoluja (Mandenius ym. 2011a, 2011b). On vaikea luoda mallia, joka sisältäisi kaikki maksan kaltaisen monimutkaisen elimen toiminnot. Solut tarvitsevat ympäristön, joka on samanlainen kuin normaalissa maksakudoksessa. Parhaaseen tulokseen on päästy kehittämällä kolmiulotteinen viljelmä maksakudokselle spesifiseen ympäristöön. Lisäksi yhteisviljely

maksakudoksen muiden solutyyppejen kanssa on lisännyt maksasolujen erilaistumista ja elinikää (Wobus ja Löser 2011, Messner ym. 2013).

Omassa tutkimusryhmässämme on kehitetty ja validoitu verisuonimalli, jota voidaan soveltaa lääketutkimukseen ja toksikologiseen



KUVA 3. A) 3D-ihomallin kasvatuserä. Keratinosyytit muodostavat monikerroksisen epiteelin kaksoiskuoppalevyn suodatininsertille kollageenin päälle. Fibrosyytit muodostavat yhdessä kollageenin kanssa ihon alemman kerroksen. (Kuva: Tarja Toimela, FICAM). B) Ihomalli (SkinEthic) kymmenen vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Histologisessa leikkeessä näkyy hyvin uloimpien keratinosyyttien sarveistuminen. Rakente vastaa in vivo -rakennetta. Tämä kaupallinen ihomalli on hyväksytty OECD:n ohjeistoihin iholäpäisevyyden, iho-korroosion ja iho-ärsyttävyyden testaamiseen. (Kuva: Philippe Gotte-land, SkinEthic).

TAULUKKO. OECD:n ohjeistoihin hyväksytyjä eläinkokeettomia kemikaalien turvallisuustestejä (OECD 2012b).

Testauksen kohde	Menetelmä / in vitro -malli	Testin numero	Voimaantulo
Iholäpäisevyys	Ihonäyte (ihmis- tai eläinperäinen), merkityn yhdisteen läpäisevyys	TG 428	2004
Ihosyövyttävyyden	Ihonäyte, ihon sähköisen vastuksen mittaaminen	TG 430	2004
	Ihmisen ihomallit	TG 431	2006
	– EpiDerm		
	– EpiSkin		
	– SkinEthic		
	Corrositex (keinotekoinen iho)	TG 435	2006
Ihoärsyttävyyden	Ihmisen ihomallit (reconstructed human epidermis, RHE)	TG 439	2010
	– EpiDerm		
	– EpiSkin		
	– SkinEthic		
Silmäsyövyttävyyden / voimakas ärsyttävyyden	Irritettu naudan silmä, BCOP (bovine corneal opacity and permeability)	TG 437	2009
	Irritettu kanan silmä, ICE (isolated chicken eye)	TG 438	2009
	Munuaistubuluksen epiteelisolujen läpäisevyys (FL, fluorescein leakage)	TG 460	2012
Valotoksisuus	3T3-neutraalipunatesti, neutraalipunan sisäänotto 3T3-soluihin	TG 432	2004
Genotoksisuus	Useita geeni-, kromosomi- ja kromosomistomutaatio-testejä in vitro	TG 479 TG 471 TG 473 TG 476 TG 480–482	1986 1997 1997 1997 1986
	Nisäkässolun mikrotumatesti	TG 487	2010
Karsinogeenisuus	CTA-testi (cell transformation assay)	TG-luonnos	2012

TG = Test Guideline, OECD = Organisation for Economic Co-operation and Development

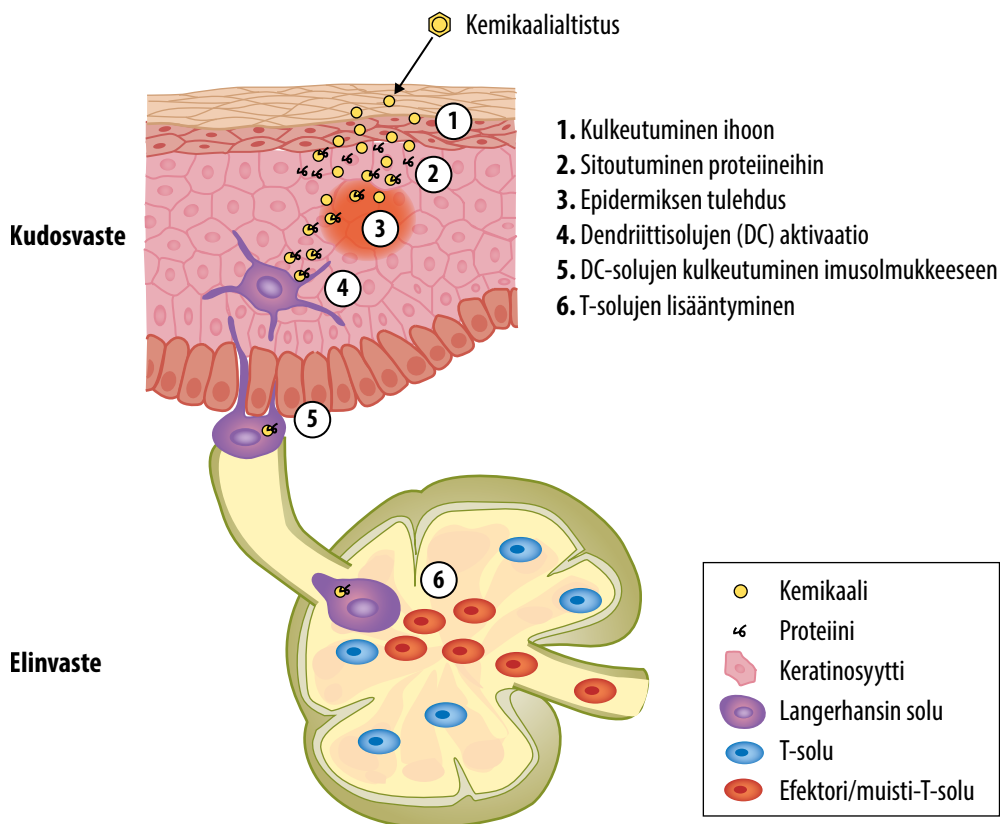
tutkimukseen (Sarkanen ym. 2011). Mallissa mitataan, onko tutkittavalla kemikaalilla tai lääkemolekyylillä verisuonten muodostusta lisäävä vai sitä estävä vaikutus. Kyseessä on erittäin lupaava koe myös osaksi testistöä, jolla arvioidaan kemikaalien aiheuttamia sikiönkehityksen aikaisia vaurioita.

OECD:n ohjeistoihin hyväksytyjä eläinkokeettomia testejä on tarjolla lähinnä akuutin ja paikallisen toksisuuden arviointiin. Pitkäkestoisten vaikutusten ja toistuvaa altistusta vaativien vaikutusten selvittämiseen ei vielä ole eläinkokeet kokonaan korvaavia testejä (TAULUKKO).

1690 *Ihosyövyttävyyden ja -ärsyttävyyden* testaamiseen on saatavilla kaupallisia iho-

malleja, jotka on hyväksytty ohjeistoihin. EpiDerm-ihomalli on kolmiulotteinen. Siinä epidermoksen muodostaa useiden keratinsyöttien kerros, joka kasvaa kaksoiskuoppalevyn suodattimella tai kollageenilla (kuva 3). EpiSkin-mallissa ihon epiteelisolujen alla on kollageenimatriksissa myös fibrosyyttejä mallintamassa ihon sisempiä kerroksia. Ihomalleihin perustuvat testit on hyväksytty OECD:n ohjeistoihin 2010 korvaamaan 1949 julkaistua Draizen in vivo -ihoärsytystä.

Ihoherkistävyyden arviointi tehdään vielä eläinkokeilla, mutta siihen on kehitteillä uuden testausstrategian (AOP) mukainen testipatteri, joka kattaa tärkeimmät monimutkaisen immunologisen reaktioketjun vaiheet:



KUVA 4. Ihoherkistävyyden testausmalli, jossa haitalliset muutokset mitataan monimutkaisen haittavaikutusketjun (AOP, adverse outcome pathway) useista kohdista. Kuvassa näkyviin reaktioketjun osiin 1–4 on valmiina validoituja in vitro -menetelmiä. Sen sijaan imusolmukemuutoksia mitataan edelleen eläinkokeen avulla. (Kuva: Tarja Toimela, FICAM, Adlerin ym. 2011 ja OECD:n 2012 mukaan).

proteiineihin sitoutumisen, reaktiota välittävien solujen aktivaation ja viestin kulkeutumisen imusolmukkeeseen (KUVA 4) (Adler ym. 2011, OECD 2012a). Reaktioketjun eri vaiheisiin on valmiina validoituja testejä, jotka eivät ole vielä ohjeistoissa. Nykyisin virallisia testejä ovat klassiset koe-eläintestit ja niiden ohella vähemmän koe-eläimiä vaativa paikallinen imusolmuketestit ja sen yksinkertaisempi muoto (OECD 2012b).

Lievän silmä-ärsyttävyyden toteamiseen ohjeistossa ei ole testiä, joka korvaisi kokonaan kanilla tehtävän silmä-ärsyttävyyden in vivo -testin (Draizen testi vuodelta 1949). Useita validoituja in vitro -testejä voidaan käyttää osana portaittaista testausstrategiaa

(van Goethem ym. 2006). Ehkä lupaavin yksittäinen kehiteillä oleva tutkimusmalli on ihmisen sarveiskalvon kolmiulotteinen malli, joka on kaupallisesti saatavilla.

Silmäsyövyttävyyden ja voimakkaan silmä-ärsyttävyyden tutkimiseen ohjeistoissa on kaksi in vitro -testiä, joissa käytetään irrotettua nautan tai kanan silmää (TAULUKKO). Näillä testeillä ei kuitenkaan havaita lievää silmä-ärsyttävyyttä.

Valotoksisuustesti on esimerkki yksittäisen solulinjan käytöstä myrkyllisyyden testauksessa. Siinä verrataan valon ja tutkittavan yhdisteen yhteisvaikutusta pelkän kemikaalin vaikutukseen hiiren fibroblastiviljelmässä. Testissä mitataan solujen kyky ottaa sisäänsä

YDINASIAI

- » EU:n uusi koe-eläinlaki, kosmetiikkalaki ja kemikaalilaki sisältävät pyrkimyksen koe-eläinten käytön vähentämiseksi.
- » Nykyisin toksikologiassa keskeisenä ajatuksena on kemikaalien turvallisuustestauksen parantaminen mittaamalla suoria ihmisvaikutuksia.
- » Eläinkokeista pyritään siirtymään ihmisen biologiaan pohjautuviin testeihin.
- » Eläinkokeita korvaavia in vitro -menetelmiä on käytössä paikallisten toksisten vaikutusten mittaamiseen, mutta pitempikestoiset ja systeemiset vaikutukset voidaan tutkia edelleen vain eläinkokeilla.

neutraalipunaa, minkä avulla saadaan selville elävien solujen lukumäärä.

Lisääntymistoksisuuden testaus vaatii jopa 2 500 eläintä yhtä tutkittavaa yhdistettä kohden, sillä tutkimus ulottuu kahden sukupolven yli. Vuonna 2011 ohjeistoihin on hyväksytty laajennettu yhden sukupolven eläinkoe, joka vähentää tarvittavaa eläinmäärää tuntuvasti. In vitro -testaukseen on tarjolla kolme alkiotoksisuutta arvioivaa menetelmää, jotka kattavat kuitenkin vain rajatun osan lisääntymiskierrosta. Sikiön altistumisen arviointiin on kehitetty ihmisen istukan ex vivo -perfuusiomalli, jolla voidaan tutkia kemikaalien kulkeutumista sikiöön ja näin sikiöön kohdistuvia riskejä (Vähäkangas ja Myllynen 2009).

Toistuvaa altistusta vaativien pitkäaikaisvaikutusten arviointiin ei ole eläinkokeettomia vaihtoehtoja. Kehitteillä on kudosis- ja elinmalleja, joissa elinympäristö ja solujen vuorovaikutus on mahdollisimman luonnonmukainen. Näitä malleja käytetään osana uutta testausstrategiaa, jossa mitataan muutoksia kriittisissä biokemiallisissa vaikutusreiteissä.

Perimämyrkyllisyyden (genotoksisuuden) arviointiin on OECD:n ohjeistoissa useita in vitro -testejä, joilla arvioidaan sekä geeni- että kromosomimuutoksia. Tällaisia kokeita ovat

muun muassa bakteerimutagenisuus- ja kromosomiaberraatiotestit, nisäkässolujen mutaatiotestit sekä hiljattain ohjeistoihin hyväksytty niin sanottu mikrotumatesti (MNvit). In vitro -testin antamaa negatiivista tulosta ei useinkaan tarvitse varmistaa eläinkokeella, mutta positiivinen tulos kaipaa yleensä varmistuksen. In vitro -genotoksisuustestit ovat herkkiä ja antavat usein vääriä positiivisia tuloksia. Riippuen viranomaissäädöksestä edellytetään tai suositellaan, että eläinkokeet tehdään in vitro -testien jälkeen, toisin sanoen sovelletaan portaittaista testausstrategiaa. Lääkkeille tehtävään testipatteriin kuuluu aina eläinkoe.

Syöpävaarallisuuden arvioinnissa tulee testata sekä genotoksinen että muu kuin genotoksinen karsinogeenisuus. Genotoksinen karsinogeenisuuden mahdollisuus voidaan hyvin testata in vitro -kokeilla ja tarvittaessa varmistaa eläinkokeilla (in vivo -genotoksisuus-testi ja kahden vuoden in vivo -karsinogeenisuustesti). Sen sijaan muun kuin genotoksinen syöpävaarallisuuden voi testata vain kahden vuoden in vivo -karsinogeenisuuskokeella. OECD:n ohjeistoihin hyväksyttiin vuonna 2012 ohjeluonnokset in vitro -testeiksi muun kuin genotoksinen syöpävaarallisuuden arviointiin. Näillä testeillä ei voi kuitenkaan korvata in vivo -karsinogeenisuuskoea.

Aineenvaihdunnallisen aktiivisuuden lisääminen solu- ja kudosisviljelymalleihin on tärkeää, sillä monet yhdisteet eivät ole sellaisenaan vahingollisia, mutta ne aktivoituvat haitallisiksi välituotteiksi elimistön vierasainemetaboliassa. In vitro -aineenvaihduntamalleina on käytetty maksan mikrosomifraktiota, hiiren ja rotan maksasoluviljelmiiä ja vastaavia solulinjoja. Vasta viime vuosina on kehitetty ihmisen maksan solulinjoja, joilla on lähes riittävä entsyymitoiminta ja -aktiivisuus. Pätevän aineenvaihduntamallin kehittäminen on kuitenkin vielä tulevaisuuden haaste (Pelkonen ym. 2013).

Kinetiikkaa on mahdollista arvioida erilaisen in silico- ja in vitro -mallien avulla ja sen tutkimiseen on kehitetty myös kudismalleja.

Iholäpäisevyyden tutkimiseen on saatavilla useita kaupallisia ihomalleja. OECD:n ohjeistoihin on hyväksytty testiohje iholäpäisevyy-

den arvioimiseksi. Kehitteillä ja validoitavana on myös menetelmiä keuhkojen ja suolen seinämän kautta tapahtuvan kulkeutumisen tutkimiseen. Lähinnä lääketieteellisuuden tarpeisiin on kehitetty in vitro -veri-aivoestemalleja, joiden avulla aivosairauksiin voidaan kehittää lääkkeitä, jotka läpäisevät veri-aivoesteen aiempaa paremmin (Prieto ym. 2004, Kuittinen ym. 2013). Ihmisen kantasoluista on hiljattain saatu aikaan lupaava endoteelimalle, jonka toiminta ja tiiviyys vastaavat aikaisempia malleja paremmin veri-aivoestettä in vivo (Lippmann ym. 2012).

Lopuksi

Ihmistä koskevassa kemikaaliturvallisuuden arvioinnissa on tapahtumassa suuri periaatteellinen muutos. Tämä tarkoittaa siirtymistä eläinbiologiaan perustuvista testeistä (eläinkokeista) menetelmiin, joissa hyödynnetään ihmisen biologiaan pohjautuvia kudos- ja elinmalleja (Hoffmann ja Hartung 2006, Andersen ja Krewski 2009). Ihmisen solu-, elin- ja kudismalleja käyttämällä voidaan seurata yhdisteen vaikutuksia useissa vaikutusreitien kohdissa toisin kuin ohjeistojen mukaisessa eläinkokeen päätteeksi tehtävässä histopatolo-

gisessa tutkimuksessa. Kudos- ja elinmalleihin perustuvat testit ovat eläinkokeisiin verrattuna herkempiä ja nopeampia, ja lisäksi ne on mahdollista automatisoida. Yhdysvaltain tiedeakatemian katsauksella toksikologisen testauksen tulevaisuuteen 21. vuosisadalla on ollut käänteentekevä vaikutus testaustavan muutokselle ja uudelle ajattelulle (NRC 2007, Hartung 2009, 2010). Kehitystä on edistänyt myös Yhdysvaltain ympäristöministeriön ToxCast-ohjelma, jonka tavoitteena on kehittää luotettavia ”high throughput” -seulontamalleja korvaamaan eläinkokeita suurien kemikaalimäärien testaamisessa (Bonneto ym. 2010). Analyysimenetelmien ja robotiikan kehittyminen ovatkin mahdollistaneet kemikaalivaikutusten nopean ”high throughput” -tutkimisen solu- ja kudosiselmissä. Tätä kehitystä ovat vahvistaneet uudet teknologiat, kuten bioinformatiikka, genomiikka, epigenomiikka, proteomiikka, transskriptomiikka, metabolomiikka ja in silico -menetelmät. Kun uutta teknologiaa sovelletaan ihmisolupohjaisiin 3D-kudismalleihin ja tärkeistä vaikutusreiteistä mitattuihin markkereihin, kehitys kulkee kohti parempaa kemikaalien turvallisuusarviointia. ■

TUULA HEINONEN, dosentti, ERT (European Registered Toxicologist), johtaja

HANNA TÄHTI, emeritaprofessori, ERT

FICAM

Tampereen yliopisto, lääketieteen yksikkö

SIDONNAISUUDET

Tuula Heinonen: Apuraha (TEKES, ELY-keskus), Työsuhte (Tampereen yliopisto), osakeomistus (Orion)

Hanna Tähti: Työsuhte (Tampereen yliopisto)

Summary

Non-animal toxicology in the safety testing of chemicals

There is an urgent need to develop predictive test methods better than animal experiments for assessing the safety of chemical substances to man. According to today's vision this is achieved by using human cell based tissue and organ models. In the new testing strategy the toxic effects are assessed by the changes in the critical parameters of the cellular biochemical routes (AOP, adverse toxic outcome pathway-principle) in the target tissues. In vitro -tests are rapid and effective, and with them automation can be applied. The change in the testing paradigm is supported by all stakeholders: scientists, regulators and people concerned on animal welfare.

KIRJALLISUUTTA

- Adler S, Basketter D, Creton S, ym. Alternative (non animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects – 2010. *Arch Toxicol* 2011;85:367–485.
- Andersen ME, Krewski D. Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. *Toxicol Sci* 2009;107:324–440.
- Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, ym. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:730–41.
- Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2009–2010. *Nature Rev Drug Discov* 2011;10:328–29.
- Barbaric I, Andrews P. Drug screens on human stem cells: From understanding cell biology to predicting drug toxicity. *Eur Pharm Rev* 2011;16:52–6.
- Bonnefoi MS, Belanger SE, Devlin DJ, ym. Human and environmental health challenges for the next decade (2010–2020). *Critical Rev Toxicol* 2010;40:893–911.
- 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.
- <http://register.consilium.europa.eu/pdf/en/10/st06/st06106.en10.pdf>
- EC, REACH regulation. EC No 1907/2006 of the European Parliament and the Council on Chemicals and their safe use. Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals. Official Journal of the European Union, 24.11.2006.
- Hartung T. Lessons learned from alternative methods and their validation for a new toxicology in the 21st century. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010;13:277–90.
- Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 2009;460:209–12.
- Hartung T, Rovida C. Chemical regulators have overreached. *Nature* 2009;460:1080–1.
- Heywood R. Clinical toxicity—Could it have been predicted? Post-marketing experience. Kirjassa: Lumley CE, Walker S, toim. *Animal toxicity studies: Their relevance for man*. Lancaster: Quay 1990, s. 57–67.
- Hoffmann S, Hartung T. Towards an evidence-based toxicology. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:497–513.
- Kuittinen O, Siniluoto T, Isokangas M, ym. Veri-aivoesteen avaaminen tehokeinona aivolyymfooman solunsalpaajahoidossa. *Duodecim* 2013;129:1563–70.
- Liebsch M, Grune B, Seiler A, ym. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol* 2011;85:841–58.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, ym. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnol* 2012;30:783–93.
- Mandenius CF, Andersson TB, Alves PM, ym. Toward preclinical predictive drug testing for metabolism and hepatotoxicity by using in vitro models derived from human embryonic stem cells and human cell lines. A report on the Vitrocellomics EU project. *Altern Lab Anim* 2011(a);39:147–71.
- Mandenius CF, Steel D, Noor F, ym. Cardiotoxicity testing using pluripotent stem-cell derived human cardiomyocytes and state-of-the art bioanalytics. *J Appl Toxicol* 2011(b);31:191–205.
- Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol* 2013;87:209–13.
- NRC. National Research Council of the National Academies. *Toxicity testing for assessment of environmental agents*. Washington DC: The National Academic Press, 2007.
- OECD. Guidance Document on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. No 168, Paris, 2012(a).
- OECD. Guidelines for Testing Chemicals. Full list of test guidelines 2012(b).
- <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- OECD. Report of the workshop on using mechanistic information in forming chemical categories. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 138. ENV/JM/MONO(2011)8, 2011.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, ym. How to preserve, induce or incorporate metabolism into the in vitro cellular system. *Toxicol in Vitro* 2013;27:1578–83.
- Prieto P, Blaauboer B, Gerrit de Boer A, ym. Blood-brain barrier in vitro models and their application in toxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 49. *Altern Lab Anim* 2004;32:37–50.
- Sarkanen J-R, Mannerström M, Vuorenää H, Uotila J. Intra-laboratory pre-validation of human cell based in vitro angiogenesis assay for testing angiogenesis modulators. *Front Pharmacol* 2011;1:147.
- Schoonen WGEJ, Westerink WMA, van de Water EM, Horbach GJ. High content screening for in vitro toxicity testing. *Eur Pharm Rev* 2011;16:50–5.
- Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Altern Lab Anim* 2008;36:327–42.
- Van der Jagt K, Munn S, Torslov J, de Bruijn J. Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. JRC Report EUR 21405 EN, 2004.
- Van Goethem F, Adriaens E, Alepée N, ym. Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicol in Vitro* 2006;20:1–17.
- Wobus AM, Löser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol* 2011;85:79–117.
- Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 2009;158:665–78.