

TUULA HEINONEN

*Dosentti, ERT (European Registered Toxicologist)
Johtaja, FICAM, Tampereen yliopisto*

HANNA TÄHTI

*Professori (emerita), ERT
FICAM, Tampereen yliopisto*

ELÄINKOKEETTOMAT MENETELMÄT

tutkimuksessa ja testauksessa

Ihmislääkekehityksessä on tapahtumassa suuri muutos, jolla pyritään parantamaan onnistumistodennäköisyyttä korvaamalla eläinkokeet ihmissolupohjaisilla elin- ja kudsmalleilla. Muutosta edistävät viranomaiset, teollisuus ja päättäjät. Vaikutukset näissä malleissa mitataan molekyyli-tason muutoksina kriittisissä aineen-vaihduntareiteissä.

Lääkekehityksen ei-kliinisessä vaiheessa ja kemikaalien turvallisuustestauksessa käytetään perinteisesti eläintestejä. Testaus pohjautuu tällöin eläimen eikä ihmisen biologiaan. Tämä näkyy lääkekehityksessä huonona onnistumistodennäköisyytenä. Testaustavassa onkin tapahtumassa suuri muutos. Halutaan ottaa käyttöön uusi strategia, joka pohjautuu ihmissolupohjaisten kudosis- ja elinmallien käyttöön sekä vaikutusten mittaamiseen molekyyli-tason muutoksina kriittisissä aineen-vaihduntareiteissä.

Koko ihmiseen ja usein myös yksittäiseen elimeen kohdistuvat vaikutukset saadaan selville käyttämällä useita testejä, joista saadut tiedot yhdistetään. Uutta testaustapaa edistävät viranomaiset, teollisuus ja päättäjät. Sen uskotaan tulevaisuudessa parantavan lääkekehityksen onnistumistodennäköisyyttä, alentavan kustannuksia sekä lisäävän yleistä kemikaaliturvallisuutta.

EU:ssa pyritään eläinkokeettomiin menetelmiin ja eläinten käytön vähentämiseen myös eettisistä syistä.

Vuoden 2013 alussa astui maassamme voimaan koe-eläinlaki, joka on EU:n uuden koe-eläindirektiivin (2010/63) mukainen.

Hiiriä ja ihmisiä

Käytännössä kaikki lääkkeet toimivat molekyyli-tasolla, ja niiden vaikutukset välittyvät geneettisesti säädeltyjen mekanismien avulla. Koe-eläimillä tehdyt tutkimukset sisältävät epävarmuustekijän, mikä johtuu ihmisen ja koe-eläinten välisistä lajieroavuuksista.

Alati kasvavasta hiiritautimallien käytöstä huolimatta suurin yksittäinen syy lääkekehittelyn epäonnistumisiin on lääkkeen tehon puuttuminen kliinisessä vaiheessa (56 %). Syynä voi olla se, että kriittiset molekulaariset reitit geenien ilmentymisessä ovat erilaiset ihmisessä ja hiiressä. Tämä todettiin akuutin tulehduksen hiiritautimallien tapauksessa syyksi siihen, että eiklinisen vaiheen läpäisseet lääkkeet eivät toimineet kliinisissä kokeissa.

On arvioitu, että eläinkokeet ennustavat haitallisia vaikutuksia ihmisessä vain 5–25 %:n varmuudella.

Erittäin merkittävä syy lääkekehittelyn epäonnistumisiin on myös lääkkeen toksisuus (28 %). On arvioitu, että eläinkokeet ennustavat haitallisia vaikutuksia ihmisessä vain 5–25 %:n varmuudella.

Eläinkokeita korvaamaan tarvitaan siis ihmistä paremmin mallintavia ihmislupohjaisia testimenetelmiä. Eläinkokeettomat testit voidaan automatisoida, jolloin ne ovat huomattavasti nopeampia suorittaa ja halvempia kuin eläinkokeet. Lääketeollisuus voisi onnistua paremmin kehitystyössään, mikäli jo lääkkeen keksimisvaiheessa otettaisiin käyttöön useiden testien yhdistelmiä, jotka auttaisivat löytämään parhaat lääkekandidaatit jatkokehitykseen.

Eläinkokeettomat menetelmät tuovat tullessaan uuden testausstrategian

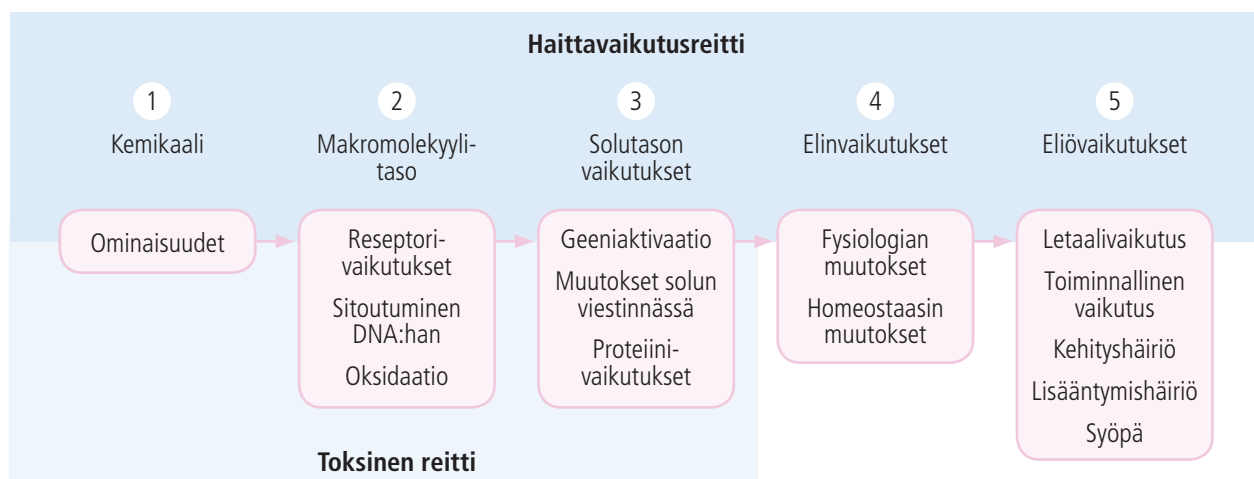
Aikaisemmin eläinkokeettomat *in vitro* -menetelmät pohjautuivat yksinkertaisiin soluviljelmiin. Nykyään ke-

hitetään kudosis- ja elinmalleja, joissa käytetään pääosin kantasoluista johdettuja soluja, biomateriaaleja ja elektroniikkaa sekä sovelletaan uusinta kudosteknologiaa. Eläinkokeettomissa menetelmissä mitataan vaikutuksia molekyyllitasolla toisin kuin useimmissa eläinkokeissa, joissa taas vaikutusta arvioidaan yleensä kudoksen patologistista muutoksista.

Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) on julkaisut ohjeistoissaan uuden testausstrategian vauhdittamaan eläinkokeettomien menetelmien kehittämistä ja käyttöönottoa (**kuva 1**). Toksisuuden arviointi pohjautuu muutoksiin kriittisissä haittavaikutusreiteissä (adverse outcome pathway, AOP).

Tietyn vaikutuksen arviointiin tarvitaan tyypillisesti useita testejä. Kun yhdistetään eri testeistä saatu tieto, saadaan selville kokonaisvaikutus molekyyli-, solu-, kudosis- ja elintasolla. Tämän perusteella arvioidaan

Kuva 1. Haittavaikutusreitit (adverse outcome pathway, AOP). Haittavaikutus alkaa molekyyllitason reaktiosta, jossa toksinen kemikaali sitoutuu biologiseen makromolekyyliin. Tästä seuraa tapahtumasarja, joka johtaa haitallisiin muutoksiin kudosis-, elin- ja eliötasolla. Kolme ensimmäistä vaihetta määrittävät toksisen vaikutuksen reitin (Tarja Toimela, FICAM ja OECD 2011 mukaan).



Maksa- ja sydän- toksisuus ovat useimmiten olleet pääsyitä lääkkeen vetämiselle pois kehityksestä tai markkinoilta.

lääkkeen toksinen riski. Esimerkkinä tällaisesta testipat- terista on ihoherkistävyyden arviointi (**kuva 2**). Lisäksi ke- hitteillä on lähes 20 muuta AOP:tä.

Eläinkokeettomia testejä on kehitteillä myös lääkkei- den tehotutkimuksiin. Tavoitteena on näin parantaa lää- kekehityksen onnistumistodennäköisyyttä.

Viranomaisten hyväksymät eläinkokeettomat menetelmät

Taulukossa 1 on esitetty tällä hetkellä OECD-ohjeistoissa olevat eläinkokeettomat testit. Suurin osa tarvittavista eläinkokeita korvaavista menetelmistä puuttuu. Kehit- teillä on monia testejä, joita voidaan käyttää seulonta- testeinä (high throughput -testit) ja mekanismitutkimuk- sissa heti kun on osoitettu, että ne ovat luotettavia ja mallintavat ihmistä. OECD-tason hyväksyntä edellyttää viranomaisten koordinoimaa validointia.

Taulukko 1. OECD:n ohjeistoihin hyväksytyjä eläinkokeettomia kemikaalien turvallisuustestejä (OECD Guidelines for Testing Chemicals, www.oecd.org).

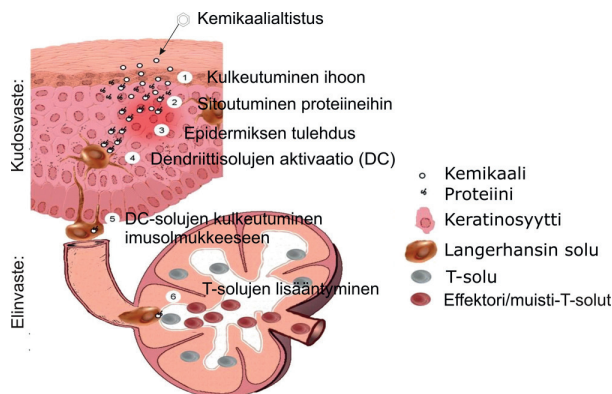
Testauksen kohde	Menetelmä / <i>in vitro</i> -malli	Testin numero	Voimaantulo
Iholäpäisevyys	Ihonäyte (ihmis- tai eläinperäinen), merkityn yhdisteen läpäisevyys	TG 428	2004
Ihosyövyttävyy	Ihonäyte, ihon sähköisen vastuksen mittaaminen Ihmisen ihomallit (RHE) • EpiDerm® • EpiSkin® • SkinEthic® Corrositex (keinotekoinen iho)	TG 430 TG 431 TG 435	2004 2006 2006
Ihoärsyttävyy	Ihmisen ihomallit (RHE) • EpiDerm® • EpiSkin® • SkinEthic®	TG 439	2010
Silmäsyövyttävyy / voimakas ärsyttävyy	Irritettu naudan silmä (BCOP) Irritettu kanan silmä (ICE) Munuaistubuluksen epiteelisolujen läpäisevyys (FL)	TG 437 TG 438 TG 460	2009 2009 2012
Valotoksisuus	3T3-neutraalipunatesti (neutraalipunan sisäänotto 3T3-soluihin)	TG 432	2004
Genotoksisuus	Useita geeni-, kromosomi- ja kromosomisto- mutaatiotestejä <i>in vitro</i> Nisäkässolun mikrotumatesti	TG 479 TG 471 TG 473 TG 476 TG 480–482 TG 487	1986 1997 1997 1997 1986 2010
Karsinogeenisuus	CTA-testi	TG-luonnos	2013

TG = Test Guideline; RHE = reconstructed human epidermis; BCOP = bovine corneal opacity and permeability; ICE = isolated chicken eye; FL = fluorescein leakage; CTA = cell transformation assay

Maksa- ja sydäntoksisuus ovat useimmiten olleet pääsyitä siihen, että lääke on jouduttu vetämään pois kehityksestä tai markkinoilta. Viime aikoina ihmisen kantasoluista on voitu kehittää toimivia maksasoluja.

FICAMissa on kehitetty ja validoitu verisuonimalli, jota voidaan soveltaa lääketutkimukseen ja toksikologiseen tutkimukseen. Mallilla määritetään, onko tutkittavalla lääkemolekyylillä verisuonten muodostusta lisäävä tai sitä estävä vaikutus. Testi on erittäin lupaava, kun tutkitaan esimerkiksi syöpälääkkeiden kykyä estää verisuonimuodostusta. Jatkoehitettyä testiä on suunniteltu myös osaksi testipatteria, jolla arvioidaan lääkkeiden teratogeenistä eli sikiötä vaurioittavaa vaikutusta. Tunnetun teratogeenin, talidomidin, vaikutusmekanismi perustuu juuri sen kykyyn estää verisuonien kasvua. ■

Kuva 2. Ihoherkistävyyden testausmalli, jossa haitalliset muutokset mitataan vaikutusreitin (AOP) kriittisistä kohdista. Reaktioketjun osiin 1–4 on valmiina validoituja *in vitro* -menetelmiä (Tarja Toimela, FICAM ja OECD 2012 mukaan).



FICAM, VAIHTOEHTOMENETELMÄKESKUS ELÄINKOKEILLE

FICAM (Finnish Centre for Alternative Methods, www.ficam.fi) on vaihtoehtomenetelmien asiantuntijakeskus Tampereen yliopistossa lääketieteen yksikössä. FICAM keskittyy kehittämään ja validoimaan GLP-tasoisia (Good Laboratory Practice), solu- ja kudosisjelyyn perustuvia ihmissolupohjaisia kudos- ja elinmalleja, joilla voidaan täydentää tai korvata eläinkokeita. FICAM jakaa tietoa vaihtoehtoisista menetelmistä ja kouluttaa asiantuntijoita. Toiminnan perustana on EU:n direktiivi 2010/63, jonka mukaan sekä tutkimuksessa että opetuksessa tulee pyrkiä eläinten käytön vähentämiseen ja eläinkokeettomien menetelmien edistämiseen. FICAM tarjoaa myös asiantuntemusta tutkijoille vaihtoehtomenetelmien validoinnissa ja GLP:ssä.

FICAMin johtaja **Tuula Heinonen** (tuula.heinonen@uta.fi) on Suomen yhdyshenkilö EU:n PARERE-verkostossa (Preliminary Assessment of Regulatory Relevance), jota johtaa EU-komission keskus EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing). PARERE-verkoston tehtävänä on auttaa EURL-ECVAMia valitsemaan tarpeellisimmat eläinkokeettomat menetelmät kansainväliseen validointiin ja nopeuttamaan niiden validointiprosessia.

Tampereen yliopistossa on vahvaa solu- ja kudosteknologian osaamista, joka pohjautuu muun muassa professorien **Hanna Tähdén** (emerita) ja **Timo Ylikomin** pitkäjänteiseen työhön solubiologiassa, kudosteknologiassa ja toksikologiassa. FICAM perustettiin 10.12.2008 Tuula Heinosen liittyttyä tiimiin vahvistamaan toksikologista ja regulatorista osaamista.