

Toksisuuden tutkiminen ja arviointi

Luonnollisin tapa tutkia jonkin aineen toksisuutta olisi selvittää sen toksisuuden mekanismit ja tällä mekanismilla toksisuutta aiheuttavat annokset tai pitoisuudet. Etenkään uutta ainetta tutkittaessa ei toksisuuden mekanismeista kuitenkaan yleensä tiedetä mitään, ja siksi toksisuuden tutkiminen usein noudattaa enemmän tai vähemmän kaavamaista järjestystä. Mm. lääkkeiden, ravinnon lisäaineiden, torjunta-aineiden ja uusien kemikaalien myynti- ja käyttöönottolupien saanti edellyttää, että rekisteröivälle viranomaiselle on toimitettu aineesta riittävät toksisuustiedot.

Tutkimusten harmonisoimiseksi on toksisuuden rutiinitutkimuksista laadittu ohjeistoja. Euroopassa on vallitsevana OECD:n ohjeisto, joka määrittelee minimistandardin yksittäisille toksisuuskokeille. Toksisuuden tutkimista säätelevät myös GLP-ohjeistot (Good Laboratory Practice), jotka ohjaavat tutkimusten teknistä suorittamista. Tutkimukset on nykyään tehtävä GLP-standardin mukaan, jotta ne olisivat hyväksyttäviä.

Luotettavan tuloksen saamiseksi toksisuus on testattava kokonaisuudessa elimistössä, eettisistä syistä käytännössä koe-eläimillä. Toksisuuden kannalta tärkeät seikat, mm. aineen farmakokinetiikka ja metabolia, tulevat tällöin otetuiksi huomioon. Samoin hormonaa-lisen säätelyn, autonomisen hermoston ja immunologisen järjestelmän osuus toksisuudessa voi paljastua ainoastaan kokonaisuudessa elimistössä. Varsinkin pitempiaikaiset kokeet tehdään kahdella eläinlajilla, tavallisesti rotalla ja koiralla, mahdollisten lajierojen havaitsemiseksi.

Toksisuuden rutiinitutkimus on luonteeltaan kartoittavaa. Se antaa yleiskuvan aineen toksisuudesta, toksisuuden kohde-elimistä ja toksisuutta tuottavista annoksista, mutta toksisuuden mekanismeja rutiinitutkimus paljastaa vain harvoin. Ne on tutkittava spesifisemmillä tutkimusmenetelmillä. *In vitro* -kokeet ovat usein sopiva tapa selvittää yksityiskohtaisemmat mekanismit.

Kaikille aineille ei tehdä kaikkia toksisuuskokeita, vaan tutkimuksen laajuus määräytyy aineen ja sen käytön laajuuden mukaan. Perusteellisimmin tutkitaan lääkeaineet ja elintarvikkeiden lisäaineet. Kemikaaleista vaaditaan yleensä akuutin toksisuuden kokeet ja subkrooninen toksisuuskoe. Aineen toksisuuden täysimittainen selvitys maksaa useita miljoonia markkoja ja kestää vähintään 6–8 vuotta.

Systemaattinen toksisuuden tutkimus

- välitön toksisuus

Uuden aineen tutkiminen aloitetaan selvittämällä ensin välitön (akuutti) toksisuus. Rotille, 1–3 eläimelle kerrallaan, annetaan suun kautta ainetta vähintään kolmena kerta-annoksena. Seuraava annostaso päätetään aina edellisen aiheuttamien oireiden perusteella. Eläinten oireet kirjataan huolellisesti annosta seuraavien kahden viikon ajan. Kuolevien ja kokeen loppuun eläneiden eläinten elimet tutkitaan makroskooppisesti. Koe toistetaan tavallisesti toisella lajilla, hiirellä. Akuutin toksisuuden kokeella kartoitetaan toksisuuden suuruusluokka, eli millä annostasoilla toksisuus ilmenee. Oireista voidaan päätellä myös jo toksisuuden luonnetta. Tuloksista on usein laskettavissa myös LD₅₀-arvo: annos, joka tappaa puolet koe-eläimistä. Sen tarkkaan määrittämiseen ei enää pyritä, koska tieto toksisuuden suuruusluokasta riittää jatkotutkimuksiin. Akuutti toksisuuskoe on kuitenkin välttämätön.

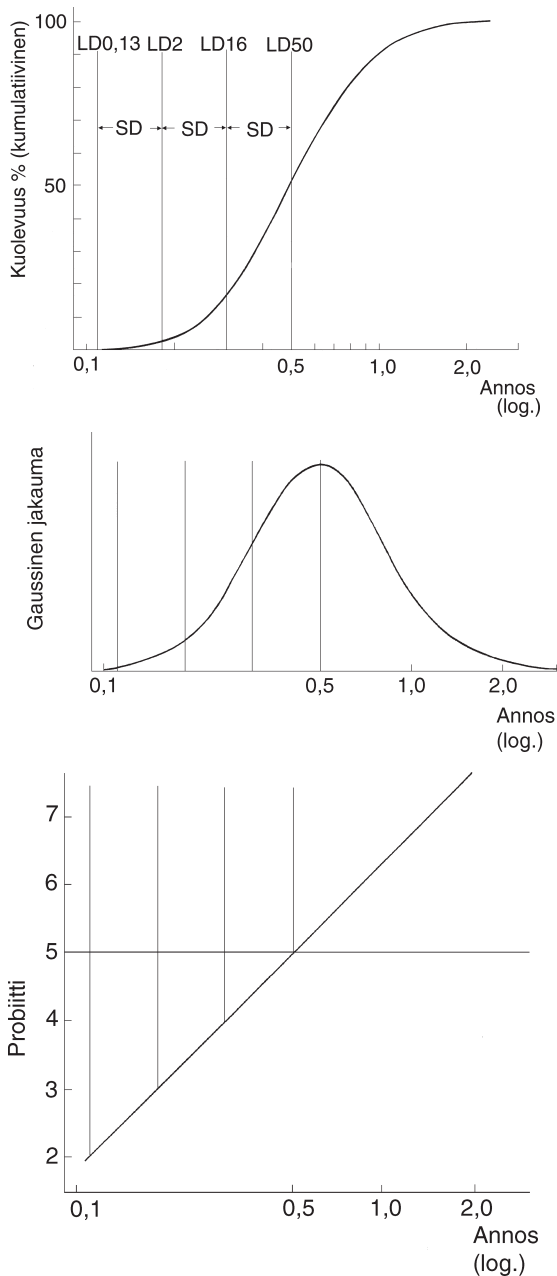
- LD₅₀

Kumulatiivinen toksisen vasteen käyrä noudattaa J:n muotoa (kuva 9-1). On syytä huomata, että tämä käyrä esiintyy kahdessa eri merkityksessä, toisaalta esim. agonistin aiheuttaman suolensupistuksen kuvaajana (asteittainen vaikutus), toisaalta populaatiossa ilmenevän vasteen esiintymistäajuuden kuvaajana (kvantaalinen eli joko–tai-tyyppinen vaste, esimerkiksi kuolevuus, sairastuminen). Kuitenkin myös asteittaisessa vaikutuksessa on perimmältään kysymys kvantaalisesta vaikutuksesta, jos liikkeelle panevana tekijänä on esimerkiksi lääkeainemolekyylien kiinnittyminen reseptoreihin. Siksi tällainen annos-vastesuhde on hyvin olennainen sekä farmakologiassa että toksikologiassa. Kuolleisuuden lisäksi myös elinvaurioista (esim. maksavaurio) ja syövän aiheutumisesta saadaan samanlainen annos-vastekuvaaja.

Ei ole olemassa varsinaista (tarkkaa) rajaa, jota pienemmillä annoksilla vaikutusta ei lainkaan olisi, vaan normaalijakauma periaatteessa lähestyy nollaa sitä koskaan saavuttamatta. Siten kaikessa toksisuudessa turvallinen raja on suhteellinen eikä absoluuttinen käsite. Jos koe-eläinryhmää suurennetaan, näennäinen haitattomuuden raja-arvo yleensä pienenee.

Annos-vastekäyrän muoto antaa viitteitä toksisuuden luonteesta. Jos käyrä on hyvin jyrkkä (eli osoittaa populaation reagoivan hyvin homogeenisesti aineeseen), toksisuuden mekanismi on usein suora- viivainen (esim. häämyrkytys). Jos taas käyrä on hyvin laakea ja ehkä mutkikaskin, toksisuus on usein epäsuoraa tai useisiin tekijöihin perustuvaa, jolloin on paljon mahdollisuuksia yksilöllisiin vaihteluihin. Joskus kuvitellaan, että jyrkkä toksisuuskäyrä osoittaa suurta toksisuutta; näinhän ei tietenkään ole, vaan kysymys on vain populaation homogeenisesta vasteesta. Pikemminkin aine, jolla on jyrkkä toksisuuden annos-vastekäyrä, on turvallinen, koska sen vaikutusten yksilöllinen vaihtelu on pieni ja vaara on helppo arvioida.

9. Toksisuuden tutkiminen ja arviointi



Kuva 9-1. Toisiaan vastaavat annos-vastekäyrä (kuolevuus kumulatiivisesti kyseisellä tai sitä pienemmällä annoksella), normaalijakauma eli "kellokäyrä" (kuolevuus kyseisellä mutta ei sitä pienemmällä annoksella) sekä probiittikäyrä. Probiittikäyrä on johdettu siten, että vasteen yksiköksi on valittu keskihajonnan (SD) kerrannainen. Kuolevuutta 16 % ($LD_{50} - 1 SD$) vastaa probiitti 4, kuolevuutta 2 % ($LD_{50} - 2SD$) vastaa probiitti 3, kuolevuutta 84 % ($LD_{50} + 1SD$) probiitti 6 jne. Tällöin kuvaajaksi tulee suora. Probiittisuorasta saadaan myös graafisesti keskihajonta.

LD_{50} -arvon ja terapeuttisen annoksen avulla lasketaan usein lääkkeen ns. terapeuttinen indeksi (ks. luku 3). LD_{50} :stä ja ED_{50} :stä (annos, jolla on toivottu vaikutus puolella koe-eläimistä) lasketun terapeuttisen indeksin ohella turvallisuuden vaikuttaa suuresti kumpain osoittava käyrän jyrkkyys, koska se ratkaisee, menevätkö ääriannokset päällekkäin (kuva 3-1).

Myös iho- ja silmä-ärsytys tutkitaan kerta-annoksella. Ihoärsytyskokeessa ainetta aplikoidaan kaniinin iholle ja seurataan ihon punoitusta ja turvotusta. Silmä-ärsytys tutkitaan laittamalla ainetta kaniinin silmään ja seurataan silmän reaktioita. Etukäteen syövyttäviksi tai vahvasti ärsyttäviksi tiedettyjä aineita ei tutkita eläinkokein.

o *herkistävyys*

Aineen herkistävyyttä tutkitaan altistamalla marsun paljasta ihoa aineelle. Immuunivasteen annetaan kehittyä pari viikkoa ja iho altistetaan uudelleen. Herkistyminen näkyy ihon punoituksena ja turvotuksena.

• *viivästynyt toksisuus*

Tärkein systeemisen toksisuuden paljastamiseksi tehtävä tutkimus on subkrooninen toksisuuskoe. Sillä pyritään selvittämään toksisuuden kohde-elimet, toksisuuden annos-vaikutussuhteet ja muutosten pysyvyys. Koe tehdään tavallisesti rotalle ja beagle-koiralle, kummallekin sukupuolelle. Koe kestää tavallisesti 90 vuorokautta. Ainetta annetaan päivittäin kolmena erikokoisena annoksena. Suurin annos pyritään valitsemaan niin suureksi, että toksisuus tulee esille. Kokeen aikana eläinten painon kehitystä, rehun ja veden kulutusta sekä oireita seurataan huolellisesti. Kokeen päättyessä verestä ja virtsasta tehdään hematologisia ja kliniskemiallisia tutkimuksia ja lähes kaikki elimet tutkitaan histologisesti.

• *pitkäaikaistoksisuus*

Kroonisen toksisuustutkimuksen tavoitteena on selvittää hyvin pitkäaikaisen altistuksen vaikutukset. Koe kestää rotalla 12 kk ja koiralla 6–12 kk. Muuten se on samanlainen kuin subkrooninen toksisuuskoe. Eläimistä voidaan ottaa verinäytteitä myös kokeen kuussa.

• *karsinogeenisuus*

Aineen karsinogeenisuus tutkitaan suurimmassa ja raskaimmassa toksisuuskokeessa, jossa eläimiä altistetaan aineelle koko niiden elinajan, rottia 24 kk ja hiiriä 18 kk. Tutkimuksessa käytetään kolmea annostasoa, joista suurimman pitäisi olla hieman toksinen. Koska tavoitteena on selvittää, aiheuttaako aine syöpää, tulee ryhmäkokojen olla suuria, annosta kohti tavallisesti kumpaakin sukupuolta 50 eläintä. Kaikista kudoksista ja kasvaimista tehdään histopatologinen tutkimus. Koska vanhoissa eläimissä on runsaasti kasvaimia jo muutenkin, tulosten huolellinen analysointi on tärkeää. Eläinten kuolleisuus on otettava tilastollisessa käsittelyssä huomioon. Syöpää aiheuttava aine lisää joko kasvaimien ja pahanlaatuisten kasvaimien määrää tai nopeuttaa niiden kehittymistä.

Karsinogeenisuustutkimuksissa on kaksi ongelmaa. Toinen on se, että vähäinenkään ilmaantuvuus ei ole hyväksyttävä, toinen se, että syövän kehittymiseen kuluu aikaa. Ihmisessä syöpä kehittyy 10–20 vuodessa, koirassa ja apinassa parissa vuodessa ja jyrjsijöissä voimakkaiden karsinogeenien aiheuttamana 3–5 kuukaudessa.

Ainoastaan jyrjsijätutkimukset ovat siis käytännössä mahdollisia. Niissäkin 50–100 koe-eläimen ryhmistä voidaan todeta varmasti vasta syövän usean prosentin ilmaantuvuus (kuva 9-2). Sellaisenaan tutkimus on siis erittäin epäherkkä, ja sellainenkin syövän insidenssi, joka ei ole mitenkään hyväksyttävissä (esim. yhdellä tuhannesta), jää todennäköisesti toteamatta. Ainoa mahdollisuus on noudattaa toksikologian yleis-

9. Toksisuuden tutkiminen ja arviointi

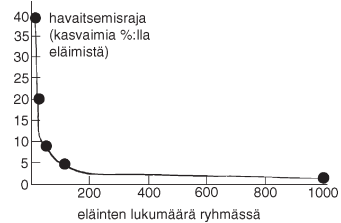
tä periaatetta: pyritään saamaan viitteitä annos-vastesuhteista, ja suurennetaan annosta usein monisatakertaiseksi todellisista käyttöannoksista. Useiden karsinogeenien selvä annos-vastesuhde voidaan osoittaa, ja tällöin on mahdollista ekstrapoloida riski suurista annoksista pieniin (vrt. kuva 9-1). Ongelmiksi jäävät heikot karsinogeenit, joille ei annos-vastekäyrää voida osoittaa suuriakaan annoksia käytettäessä, sekä prokarsinogeenit, joiden aktiivisen metaboliitin määrä ei välttämättä lisäänty samassa suhteessa kuin kanta-aineen annosta lisätään.

Karsinogeenisuuden testausta nykymuodossaan on toisaalta kritisoitu siitä, että suurten annosten aiheuttama syöpä olisi seurausta aineen epäspesifisestä toksisuudesta. Kudosvaurio käynnistää korjaavan soluproliferaation, joka voi edistää syövän kehittymistä. Siksi ainekohtainen syövän mekanismien selvittäminen on hyvin tärkeää. Ainetta, joka aiheuttaa syöpää ainoastaan koe-eläimissä toimivilla mekanismeilla, ei pidetä karsinogeenisena ihmiselle. Esimerkkinä tästä on lyijyttömän bensiinin aiheuttamat munuaiskasvaimet urosrotissa. Myös pienten annosten vaikutus on kaiken kaikkiaan vielä kiistanalainen. Kun kemiallisesti on mahdollista analysoida yhä pienempiä vieraiden aineiden pitoisuuksia esim. ympäristöstämme, on lähivuosien tärkeimpiä tavoitteita pyrkiä löytämään mielekäs pienten pitoisuuksien aiheuttamien vaarojen arviointimenetelmä. Jopa voimakkaiden karsinogeenien hyvin pienten pitoisuuksien aiheuttama riski on toistaiseksi epäselvä. Toiset tutkijat uskovat kynnsarvoon lähinnä siksi, että elimistö kykenee tiettyyn rajaan saakka sitomaan aktiiviset metaboliitit mm. glutationiin inaktiivisessa muodossa ja syöpään tarvitaan useita mutaatioita. Toiset lähtevät siitä, että riski ulottuu lineaarisesti nollaan saakka. Tällöinkin tullaan kuitenkin nopeasti alueelle, jossa vaara pienenee normaalia "taustariskiä" vähäisemmäksi (vrt. kuva 9-1). Tällöin joudutaan kysymään, onko olemassa "hyväksyttävä" riskin raja (vrt. röntgensäteilyn aiheuttama syöpävaara). Ei-genotoksisilla aineilla uskotaan olevan tietty kynnsarvo tai -altistus, jonka alapuolella riskiä ei ole tai se on hyvin pieni. Ilmeisesti myös genotoksisille aineille on olemassa käytännössä kynnsarvo eivätkä aineet tässä suhteessa poikkea toisistaan (vrt. LD₅₀ edellä).

Teratogeenisuustutkimukset tehdään yleensä rotalla. Emoille annetaan tutkittavaa ainetta raskauden 6.–15. päivänä kolmena eri annostasona, joista suurimman tulisi olla emolle lievästi toksinen. Ennen synnytystä tehdään keisarileikkaus. Sikiöt tutkitaan (ulkoiset epämuodostumat, luustoaomaliat, pehmytkudosmuutokset) ja pyritään selvittämään myös keskenmenoja osoittavat implantaation merkit. Toisena lajina käytetään tavallisesti kaniinia.

Lisääntymiseen vaikuttavaa toksisuutta tutkitaan altistamalla koiras- ja naarasrottia aineelle ennen parittelua sukusolujen kehittymisen ajan ja naarasrottia raskauden ja imetyksen ajan poikasten vieroitukseen asti. Kokeessa selviää aineen vaikutus fertiliteettiin, synnytykseen ja poikasten kehitykseen.

Koska vallitsevan teorian mukaan ainakin osa karsinogeenisista aineista (initiaattorit) vaikuttaa genotoksisesti eli solun perimää muuttaen, on pitkään kestävien karsinogeenisuustutkimusten tueksi kehitetty mutageenisuustestejä. Testit ovat seulontatestejä, joilla alustava arviointi voidaan tehdä nopeasti. Mutageenisuuden selvitys onkin ensimmäisiä uudella lääkeainemolekyylillä tehtäviä kokeita, ja aineen selvä mutageenisuus johtaa heti molekyylin hylkäämiseen. Myös muulle uudelle kemikaalille tehdään vähintään bakteerimutagenisuuskokeet.



Kuva 9-2. Pienin mahdollinen syövän ilmaantuvuus, joka voidaan eläinkokeessa todeta tilastollisella varmuudella ($p < 0,025$) eri eläinmääriä käytettäessä. Käyrän alle jäävää syöpien lukumäärää ei voida kokeessa saada esille.

- *teratogeenisuus*
- *fertiliteetti- ja reproduktiokokeet*
- *perinataali- ja postnataalitoksisuus*
- *mutageenisuustutkimukset*

Mutageenisuustutkimukset ovat pääasiassa *in vitro* -kokeita. Positiivinen tulos näissä varmistetaan myös *in vivo* -kokeilla.

Tunnetuin bakteerimutageenisuustesti on Amesin ja työtovereiden kehittämä *Salmonella typhimuriumin* mutanttia käyttävä takaisinmutaatiokoe (Amesin koe). Mutanttilta puuttuu kyky syntetisoida histidiiniä, jolloin se siis kasvaa vain histidiiniä sisältävässä ympäristössä. Se palautuu kuitenkin helposti mutageenisten aineiden vaikutuksesta histidiiniä syntetisoivaksi kannaksi. Siirtämällä mutageenisella aineella käsitelty bakteeripopulaatio elatusaineeseen, josta histidiini puuttuu, on helppo laskea näiden mutaatioiden määrä. Prokarsinogeenien aktivoimiseksi (ks. luku 8) lisätään mukaan rotan maksan mikrosomeja, joiden toivotaan metaboloivan prokarsinogeenin aktiiviseksi molekyyliksi.

Mutageenisuustutkimuksia tehdään myös käyttäen nisäkkään soluja soluviljelmässä (kiinanhamsterin ovaariosolut, lymfosyytit). *In vivo* -tutkimuksissa koe-eläimiä altistetaan lyhytaikaisesti tutkittavalle aineelle ja tutkitaan esimerkiksi punasolujen mikrotumat (mikrotumatesti) tai lymfosyyttien sisarkromatidivaihdokset. Eri menetelmin pyritään myös löytämään merkkejä DNA-korjausmekanismin käynnistymisestä. Klastogeenisia vaikutuksia eli suuria mikrokooppisesti näkyviä kromosomimuutoksia voidaan tutkia myös ihmisen soluista, esim. lymfosyyteistä. DNA:n vaurio pystytään useimmiten myös tunnistamaan molekyylibiologisin menetelmin.

Positiivinen tulos mutageenisuustutkimuksissa osoittaa, että aine vaikuttaa DNA:han ja saattaa siten toimia initiaattorina. Aineen farmakokinetiikka ja monet muut tekijät vaikuttavat siihen, onko aine lopulta syöpää aiheuttava. Karsinogeeniksi todetuista aineista suurin osa on mutageenisia, mutta kaikki mutageeniset aineet eivät ole karsinogeenisia eläinkokeissa. Negatiivinen tulos mutageenisuustutkimuksissa ei takaa, etteikö aine aiheuttaisi syöpää, mutta todennäköisesti se ei ole syövän potentti initiaattori.

- *kinetiikka*

Farmakokinetiikan tutkiminen on todettu tärkeäksi toksisuuden arvioimisen kannalta. Vesiliukoinen tai helposti ja nopeasti konjugoituva yhdiste, joka erittyy nopeasti muutamien tuntien kuluessa elimistöstä menemättä juuri soluihin sisään, on aivan eri asemassa kuin lipidiliukoinen aine, joka pääsee helposti soluihin ja lisäksi pyrkii kumuloitumaan elimistöön. Useat toksisuuden muodot (etenkin keskushermostotoksisuus) suoraanaisesti edellyttävät riittävää rasvaliukoisuutta ilmetäkseen. Myös lajikohtaiset erot ilmenevät usein nimenomaan kinetiikassa, etenkin eri lajien kyvyssä metaboloida ainetta; samoin eri metaboliittien suhteellinen määrä on hyvin lajikohtainen. Tämän takia vasta tarkka farmakokineettinen selvitys oikeuttaa tekemään päätelmiä jossakin lajissa aiheutuvista vaaroista toisen lajin tutkimusten perusteella.

Kinetiikan selvitys onkin oleellinen osa toksisuustutkimusta. Sitä varten on tutkimuksissa erikseen eläinryhmiä, joiden verestä tai virtsasta määritetään tutkittavan aineen pitoisuudet.

Toksisuustutkimusten rajoitukset ja ennustearvo

Onko aine sitten turvallinen, kun se on läpäissyt säädetyt toksisuustutkimukset? Näin ei välttämättä ole. Ensiksikin toksisuus voi

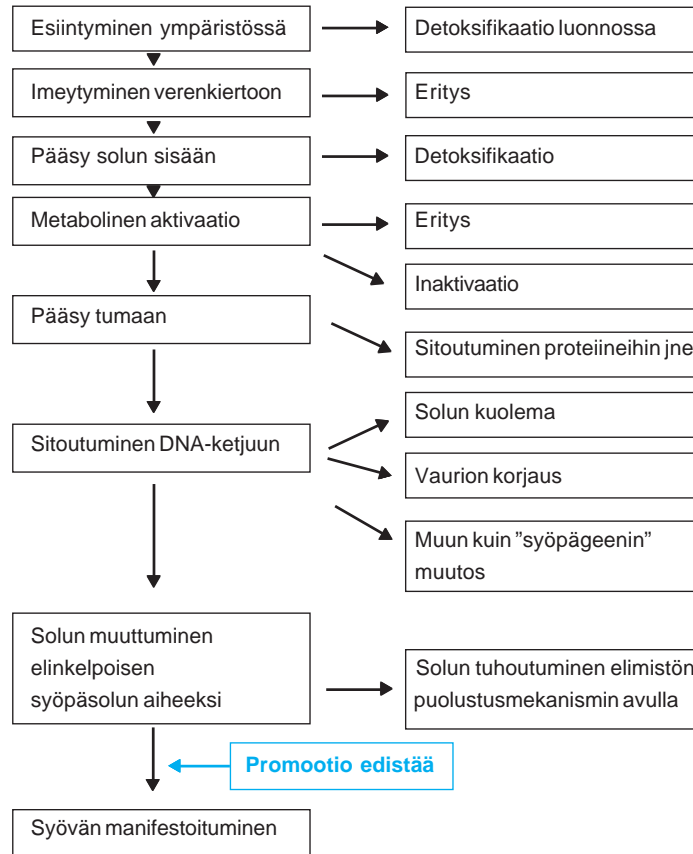
- *toksisuus ei tule esille*

SYÖPÄRISKIN ARVIOINTI

Syöpäriskin arvioimisessa painotetaan yhä enemmän karsinogeenisuuden mekanismin ymmärtämistä. Mekanismiltaan hyvin ymmärretyn tapahtumaketjun toivotaan antavan hyvät edellytykset myös kvantitatiiviselle riskin arvioimiselle. Syöpäriskin arvioinnissa on kuitenkin se ongelma, että tie karsinogeenisesta kemikaalista syöpään on pitkä, monitekijäinen ja monipolvinen. Arvio muistuttaa siksi sään ennustamista ja edellyttää pikemminkin monien erisuuntiin vaikuttavien yhtäikäisten tekijöiden hyväksymistä ”kaaosteoria-analyyysiin” kuin suoraviivaisia loogisia oletuksia.

Oheinen vuokaavio pyrkii havainnollistamaan moninaisia vaiheita karsinogeenisesta molekyylisestä syövän manifestoitumiseen. Kaaviosta selviävät mm. seuraavat seikat: 1) Aineen karsinogeenisuus sinänsä ei määrää riskiä, vaan edellytyksenä on sen pääsy elimistössä kriittiseen kohtaan. Siksi käyttäytyminen luonnossa (esim. kiinnittyminen tiukasti maapartikkeleihin) ja farmakokineettiset ominaisuudet (esim. imeytyminen ja epäsuorien karsinogeenien metabolia) ovat keskeisiä. 2) Jos elimistö on varautunut metaboloimaan tai muuten eliminoimaan aineen tehokkaasti, riski pienenee ratkaisevasti tai rajoittuu tiettyihin kudoksiin (esim. formaldehydi on nenän limakalvokarsinogeeni hiiressä hyvin

suurina pitoisuuksina). 3) Mutageenisuus ei johda automaattisesti karsinogeenisuuteen, koska mutaatio voidaan korjata tai se johtaa apoptoosiin (ohjelmoituneeseen solukuolemaan); tärkeää on se, aiheutuuko mutaatio kriittiseen kohtaan, esimerkiksi p53-kasvunrajoitegeenin ”kuumaan” alueeseen. 4) Solujen jakaantuminen on yhtä tärkeää syövän kehittymiselle kuin mutaatiokin, koska vasta solujen jakaantuminen ”kiinnittää” vaurion. Nopea solujen jakaantuminen myös estää vaurion korjaamista. Siksi ei ole itsestään selvää, että genotoksiset karsinogeenit olisivat vaarallisempia kuin ei-genotoksiset kudosta ärsyttävät tai solujen lisääntymistä aiheuttavat aineet. 5) Monimuuttujatilanteessa ei ole todennäköistä, että yksi ekstrapolaatiomalli olisi yleispätevä kaikille karsinogeenille. Joissakin tilanteissa annos-vastekuvaaja onkin erittäin jyrkkä ja selvästi lineaarisesta poikkeava (esim. formaldehydi), jolloin yleisesti käytetty lineaarinen ekstrapolaatio liioittelee riskiä selvästi. Olisikin tärkeää määrittää aineittain annos-vastekäyrän muotoja.



Genotoksiset vauriot ovat hyvin yleisiä. Mm. happiradikaalien on arvioitu aiheuttavan hiiren jokaisessa solussa 100 000 DNA-vauriota vuorokaudessa. Näistä 99 % korjautuu, mutta 1 000 vauriota vuorokaudessa jää korjaamatta, eli hiiren elinaikana kertyy noin miljoona vauriota solua kohti. Siten initiaatioita tapahtuu runsaasti ilman ulkoisia karsinogeenejakin, ja on ymmärrettävää, että myös ei-genotoksinen aine (esim. promootori) voi yksinkin aiheuttaa syöpää. Karsinogeenien riskiä on siis arvioitava lisäriskinä olemassa olevaan taustariskiin eikä erillisenä tapahtumana. Siten tärkeää on riskin suuruus eikä teoreettinen olemassaolo. Samoin syövän torjunnassa on tärkeää paitsi karsinogeenikuorman vähentäminen, myös elimistön puolustuskyvyn parantaminen esimerkiksi terveillä elämäntavoilla ja hyvällä ja monipuolisella ruokavaliolla.

Jouko Tuomisto

- *harvinainen* olla harvinainen ilmiö, eikä se tule esiin sen enempää toksisuusko-keissa kuin lääkkeiden kliinisissä kokeissakaan. Esimerkki tästä on kloramfenikolin aiheuttama luuydinvaurio. Sitä tavataan noin yhdellä 50 000–100 000 hoidetusta potilaasta. Aine oli laajassa käytössä kaksi vuotta, ennen kuin sivuvaikutus huomattiin. Harvinainen sivu-vaikutus voi perustua allergisiin mekanismeihin, geneettisiin poik-keavuuksiin tai joskus aineen epäpuhtauksiin.
 - *hidas* Sivuvaikutuksen ilmitulon voi estää myös vaikutuksen hidas ilme-neminen. Eräiden neurotoksisten aineiden sivuvaikutukset ilmenevät vasta aineen pitkäaikaisen käytön jälkeen. Syöpä on tyypillinen esi-merkki sivuvaikutuksesta, jonka kehittyminen kestää vuosia.
 - *lajierot* Lajierot ovat tyypillinen syy siihen, ettei toksisuus tule esille. Eläinlajeilla on fysiologisia eroja (esim. rotta ei oksenna), eikä toi-minnallisia keskushermosto-oireita (depressio, psykoosi, päänsär-ky) voi osoittaa eläimiltä. Usein metabolia on eri lajeilla erilainen; tämä koskee sekä myrkyllisten metaboliittien syntyä että aineen detoksikaatiota. Lajierot ovat kuitenkin useimmiten kvantitatiivisia eivätkä kvalitatiivisia.
 - *yhteisvaikutus* Usein sivuvaikutusten edellytyksenä on kahden aineen yhteisvai-kutus. Tällainen ei kokeissa useinkaan tule esille, ellei mekanisme nimenomaan epäillä. Tyypillisiä esimerkkejä ovat MAO:n estäjät ja tyramiini sekä metronidatsoli ja alkoholi.
 - *eritysryhmät* Tutkimusvaiheessa altistetaan harvoin erityisryhmiä. Erityisesti lapset, vanhukset, astmaatitot sekä munuais- ja maksasairauksia sai-rastavat ovat sivuvaikutusten suhteen ongelmaryhmiä.
 - *paljastuminen markkinoinnin jälkeen* Niinpä lääkeaineella on yleensä enemmän sivuvaikutuksia kuin markkinoille tuotaessa luullaan ja muidenkin kemiallisten aineiden käytössä paljastuu välillä epämiellyttäviä yllätyksiä, joten uusien ai-neiden käyttöönotossa on varovaisuus ja terve epäluulo tarpeen. Toi-saalta on epävarmaa, olisiko hyvin tiukkojen ennakkovaatimusten ai-kana pystytty tuomaan markkinoille penisilliiniä (teratogeeninen, marsulle hyvin myrkyllinen) tai D-vitamiinia (voimakkaasti terato-geeninen suurina annoksina). Liika varovaisuuskin voi siis tappaa tai estää jonkun parantumisen.
- Toksisuuden tutkiminen takaa kuitenkin kohtuullisen turvallisuu-den aineen käytölle ja on käytännössä ainoa tapa selvittää toksisuutta etukäteen. Voimakas toksisuus paljastuu ja aineeseen voidaan suh-tautua sen mukaan. Enää suhteellisen harvoin on tarpeen vetää uusi lääkeaine kokonaan pois markkinoilta.

Toksisuuden arvioiminen

Toksikologiassa joudutaan usein lähtemään siitä, että saatu tieto on riittämätöntä ehdottomien päätelmien tekoon. Siksi on sanottu, että paras toksikologi on se, joka arvaa parhaiten. Ennen muuta jou-dutaan arvioimaan ihmiselle aiheutuvia vaaroja ilman, että käytettä-

9. Toksisuuden tutkiminen ja arviointi

vissä olisi ihmistä koskevia tietoja. Toksikologia on siis suurelta osin ekstrapolaatiota, määräolettamuksiin perustuvaa ennustamista tosiasiallisen tietämyksen ulkopuolelle. Tämän takia se vaatii taitoa ja tasapainoisuutta ja on epäonnistuessaan alttiina hyvin kriittiselle arvostelulle.

Helppo ratkaisu toksikologian kannalta on tuomita jokainen aine, jossa on vähänkin epäilyttävää. Tässä lähestymistavassa on kaksi ongelmaa. Ensimmäinen on se, että tarpeeksi tarkkaan katsottaessa lähes kaikissa aineissa on jotakin epäilyttävää (myös normaaleissa ruoka-aineissa, vitamiineissa ja hivenaineissa). Tällöin siis arviointi tulee mielivaltaiseksi ja riskit saatetaan priorisoida pahasti väärin: ne aineet, joita syystä tai toisesta tutkitaan tarkoin, tulevat useimmin tuomituiksi, eivätkä resurssit anna myöten tarkastella kaikkia aineita samalla tavoin. Toinen on se, että toksikologia menettää uskottavuutensa. Tämä on osittain tapahtunut Yhdysvalloissa ns. Delaney'n lausekkeen takia. Lauseke edellyttää, ettei ruoan lisäainetta voida sallia, jos se aiheuttaa syöpää ihmisessä tai eläimessä tai jos sen havaitaan asianmukaisten kokeiden perusteella aiheuttavan syöpää ihmisessä tai eläimessä. Se siis edellyttää joko–tai-vastausta. Tämän perusteella kiellettiin 1969 syklamaatti ja 1977 sakariini, mutta yleisen mielipiteen painostuksesta kongressi on toistuvasti lykännyt sakariinia koskevan kiellon toimeenpanoa, koska se on tärkeä ”kaloriton” makeutusaine. Ongelma suurenee entisestään, kun kemiallisin analyysimenetelmin pystytään osoittamaan yhä pienempiä määriä heikkoja mahdollisesti syöpää aiheuttavia ja muita toksisia aineita ravinnossa ja ympäristössämme. Huomattava osa tällaisista aineista on luonnontuotteita.

Myrkyllisyyden arvioinnissa ei riitä eikä edes ole olennaista se, onko jokin myrkyllistä vai ei, vaan se, kuinka myrkyllistä se on ja missä olosuhteissa sen myrkyllisyydestä on haittaa. On ymmärrettävää, että myrkyllisyys sinänsä ei ole samaa kuin vaara. Vaarallisimmat aineet eivät välttämättä ole myrkyllisimpiä, eikä myrkyllisen aineen käyttö ole aina vaarallista; myrkyllisyyden lisäksi aineen haitallisuuden vaikuttavat monet seikat, kuten haihtuvuus (liuottimet, metallinen elohopea), pysyvyys (metyylielohopea, lyijy), kertyminen elimistöön (lyijy, kadmium, DDT) ja muut samanaikaiset aineet (pöly ja kosteus rikkidioksidin kanssa). Jos taas katsotaan eri aineiden aiheuttamia todellisia haittoja yhteiskunnassa, on arviointiin otettava mukaan irrationaalisiaakin sosiologisia ja arvoasetelmaongelmia. Niinpä kaksi ainetta, joiden toksiset vaikutukset aiheuttavat sairautta ja kuolemaa enemmän kuin kaikkien muitten yhteensä, ovat tupakan savu ja alkoholi, joiden käyttö on yksilön itsensä säätelemää. Suhtautuminen toisaalta vapaaehtoisesti otettuihin riskeihin (tupakka, alkoholi) ja toisaalta vaaroihin, joihin yksilö ei voi suoraan itse vaikuttaa (ravinnon lisäaineet), onkin erilainen. Tämä suhtautumistavan ero joudutaan säätelevässä toksikologiassa ottamaan huomioon.

Toksisuuden arvioinnin ja siitä johtuvien toimenpiteiden selventämiseksi on viime aikoina ruvettu jakamaan tapahtuma selvästi kahden vaiheeseen: riskin arviointiin, joka on tieteellinen, toksikologinen prosessi, sekä päätöksentekoon riskin hyväksyttävyydestä, joka on hallinnollinen tai poliittinen prosessi. Riskin arviointivaiheessa tulee toksikologisen koulutuksen saaneen henkilön arvioida paitsi aineen toksisuus sinänsä, myös toksisuuden käytännön merkitys ja tästä seuraavat mahdolliset vaarat. Sen sijaan ei ole hänen asiansa päättää toisten puolesta sitä, otetaanko riski vai ei (esim. kivi-

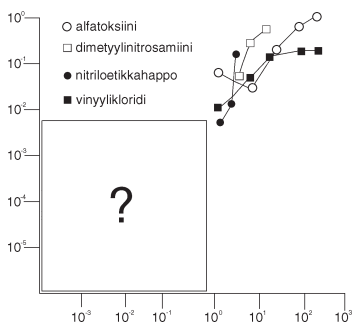
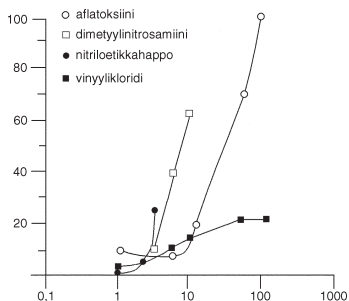
- *myrkyllisyys*

- *vaara*

- *riskin arviointi*

- *päätöksenteko*

Yleisfarmakologiaa ja -toksikologiaa



Kuva 9-3. Ekstrapolaatio pieniin annoksiin. Yläkuva on tavanomainen annoksen logaritmia vastaan piirretty vaste neljän aineen karsinogeenisuudesta. Alakuvassa samat tulokset on piirretty logaritmi-logaritmiasteikkoon ja asteikkoa on laajennettu alueelle, josta matemaattisilla malleilla haetaan vastauksia. Alakuva osoittaa selvästi, että riskitasolle yksi miljoonasta (10^{-6}) ei ole mahdollista saada matemaattisesti täsmällisiä riskiarvioita saaduista kokeellisista käyristä.

hiilen poltto tai torjunta-aineen käyttö, joihin vaikuttavat myös monet ekologiset, kansantaloudelliset ja jopa epäsuorat terveydelliset ja ravitsemukselliset seurannaisvaikutukset).

Tämän päätöksen siirtäminen muille edellyttää kuitenkin vaaran mahdollisimman tarkkaa määrittämistä: kyllä–ei-vastauksesta ei päätöksentekijälle ole apua. Jos tuhannesta mutageenisesta aineesta kymmenen aiheuttaa 90 % kemikaalien aiheuttamista syövästä, on toki asetettava kontrollin painopiste sinne, missä suurin hyöty on mahdollista saavuttaa. Vähemmän tärkeän asian ylenmääräisessä painottamisessa on vaarana todella tärkeän asian jääminen liian vähälle huomiolle.

Kemikaaleihin liittyvän terveystieteen arviointi perustuu käytännössä kokeellisen tutkimuksen tuloksiin ja mahdolliseen epidemiologiseen tietoon aineen haitoista. Jos altisteesta on käytettävissä luotettavaa epidemiologista tietoa, sillä on suuri painoarvo. Useimmiten näin ei kuitenkaan ole, vaan arvio on tehtävä eläinkokeiden perusteella. Ongelmana on, että eläinkokeet on toksisuuden karakterisoimiseksi tehty suurilla annoksilla, mutta arvioitavan altisteen suuruus on useimmiten kertaluokkia pienempi. Ihmiselle turvallisena pidettävät annokset ja riski joudutaan ekstrapoloimaan. Esimerkiksi elintarvikkeiden epäpuhtauksille määritellään usein ylin annos, jota ei tulisi ylittää (suurin sallittu päivittäinen saanti eli ADI, Allowable Daily Intake.). Toksisuuskokeista on todettavissa annostaso, joka ei vielä aiheuta eläimissä toksisuutta (NOAEL). Tästä ekstrapoloidaan laskennallisesti ADI jakamalla NOAEL turvamarginaalilla 100–1 000. Turvamarginaalissa oletetaan, että toksisuuden vaihtelu lajin sisällä on 10-kertainen ja lajien välillä 10–100-kertainen. Riskin arviointiin on kehitetty lukuisia matemaattisia malleja, mutta mitään niistä ei ole todettu vielä yleispäteväksi. Pisimmälle kehitetyt mallit ottavat huomioon myös aineen farmakokinetiikan. Syöpärisikin matemaattinen arviointi on erityisen vaikeaa, koska siinä ekstrapolaatioväli on laaja ja todennäköisyydet yleensä hyvin pienet. Nykyiset syöpärisikin matemaattiset arviointimallit antavat hyvin vaihtelevia arvioita saman riskin suuruudesta.

Koe-eläinten käyttö toksikologian ja farmakologian tutkimuksessa

Farmakologian ja toksikologian tietämys siis perustuu hyvin suurelta osin koe-eläintutkimuksiin. Koe-eläintutkimuksiin liittyy monia tieteellisiä ongelmia (mm. tietojen sovellettavuus ihmiseen), elämäntutkimuksellisia ja filosofisia ongelmia (esim. suhtautuminen kokeiden aiheuttamaan kipuun) sekä informaationkulu- ja tietämättömyysongelmia (esim. mielikuvituksen tarinat turhista ja tahallisista eläinten kiduttamisista).

• tieteelliset ongelmat

Tieteelliseltä kannalta tärkein näkökohta on koe-eläintutkimuksen kelvollisuus siihen tarkoitukseen, mihin sitä käytetään. Useimmiten tällöin on kyse siitä, missä määrin koe-eläimellä saatu tulos on sovellettavissa ihmiseen tai joskus myös toiseen eläinlajiin (eläinlääketiede). Toksisuustutkimuksien osalta tätä kysymystä on jo käsitelty edellä. Soveltamiseen on selvästikin suhtauduttava tieteellisen varovaisesti, mutta toisaalta on hyvä katsoa taaksepäin historiaan ja arvioida, mikä olisi tilanne ilman koe-eläintutkimusta.

Länsimaisen luonnontieteen tutkimuksen kulmakivi on esittää hypoteesejä ja teorioita, joiden oikeellisuus voidaan kokeellisesti varmistaa. Parhaiten kokeellista seurannut kehitys näkyy ehkä autonomisen hermoston alueella. Sen ymmärtämisessä päästiin 1800-luvulta alkaen nopeasti kunnioitettaviin tuloksiin, joita ei olisi ollut mitään mahdollisuutta selvittää ilman koe-eläimiä tai niiden kudoksia. Edelleenkin nopea kehitys näkyy selvästi biokemiallisen neurofarmakologian alalla samoin kuin endokrinologiassa. Yhtäläisyydet kahden nisäkkään välillä ovat verratto-

9. Toksisuuden tutkiminen ja arviointi

masti suuremmat kuin niiden erot, ja saatua tietoa voidaan usein jopa sellaisenaan soveltaa käytännön lääketieteeseen.

Elämäkatsomuksellinen kysymys on, onko ihminen periaatteessa suurempiarvoinen, niin että eläintä voidaan käyttää hyväksi ja uhrata se tieteen edistämiseksi tai ihmisen turvallisuuden tai terveyden parantamiseksi. Filosofiset ja elämäkatsomukselliset vaikeudet pysyvät tietenkin ratkaisemattomina, ja jos joku on vilpittömästi sitä mieltä, ettei eläintä saa käyttää ihmisen hyväksi, mielipide on sinänsä täysin kunnioitettava. Tältä suhtautumiselta voidaan kuitenkin vaatia johdonmukaisuutta. Eläinkokeiden tuomitsemiselta elämäkatsomuksellisin perustein putoaa pohja pois, jos lämmittelee eläimen turkissa, puhumattakaan eläimien syömisestä.

Edelliseen liittyvä filosofinen vaikeus on rajanveto eri eläinlajien välille. Jos ihminen ei ole eläintä suurempiarvoinen, silloin ei liioin toinen eläin ole toista suurempiarvoinen. Tällöin joudutaan lääketieteelliseen umpikujaan, ja voidaan kysyä, onko oikein hävittää rottia, täitä tai lapamatoja myrkyllä. On helppo vastustaa simpanssin käyttöä kokeissa, koska se on niin ”inhimillinen”, ja sama koskee osin kissaa ja koiraa. On kuitenkin kyseenalaista tehdä tällaisiin perustein eroa eläinlajien välille. Koe-eläinasetus vetää rajan selkärankaisten ja selkärangattomien väliin. Tällä rajalla on se etu, että se on helppo ja yksiselitteinen. Raja on kuitenkin mielivaltaisen ja herättää kysymyksiä esimerkiksi kalastuksen ja kalatutkimusten välillä.

Eettisistä kysymyksistä on tärkein se, missä määrin koe-eläimille saa aiheuttaa hätää, kipua ja tuskaa. Koe-eläinasetus tekee selvän eron niiden kokeiden välille, jotka eivät aiheuta merkittävää kipua ja tuskaa (II luokka), ja niiden välille, jotka aiheuttavat (I luokka). Kaikki eläinkoosuunnitelmat käsitellään koe-eläintoimikunnassa, jossa on edustajana tutkijoita, koe-eläinhoitajia, muuta henkilökuntaa ja yleensä myös eläintensuojelijoiden edustaja tai kokonaan ulkopuolinen henkilö. Kivuttomat kokeet (I luokka) hyväksytään laitoksen koe-eläintoimikunta, kun sen sijaan kivuliaiksi arvioidut kokeet (II luokka) menevät edelleen arvioitavaksi ja päätettäväksi lääninhallitukseen. Siten säännökset ovat erittäin tiukat.

On tärkeää ymmärtää kaksi asiaa. Huonosti harkittu tai suunniteltu koe, jonka tulos on epäluotettava tai tarpeeton, on aina epäeettinen, vaikka sen aiheuttama kärsimys olisi vähäinenkin. Toiseksi eläimen häätä liittyy suureksi osaksi käsittelytaitoon. Taitamaton ja kömpelö käsittely häätänyttää eläintä ja usein myös riuhtominen aiheuttaa kipua enemmän kuin useimmat kokeet sinänsä. Siksi koulutuksen hankkiminen on myös eettinen kysymys, ja koulutuksen ohjaaminen on suoritettava hyvin. Toisaalta eläinkokeet on todettu hyvin opettavaisiksi esim. farmakologian opetuksessa. Siksi niitä voidaan pitää eettisesti yhtä hyväksyttävänä kuin tutkimukseen käytettyjä kokeita edellyttäen, että jokaisen kokeen hyöty ja mahdolliset haitat harkitaan huolellisesti.

Suurta yksimielisyyttä kivun aiheuttamisen oikeutuksesta ei yleensä saavuteta, koska jotkut ihmiset katsovat, ettei kipua saisi aiheuttaa lainkaan. Kaikessa lääketieteessä (myös hammaslääketieteessä ja eläinlääketieteessä) joudutaan kuitenkin suorittamaan toimenpiteitä, jotka aiheuttavat kipua potilaalle ja joskus jopa terveelle lähimmäiselle (esim. munuaisen luovuttaminen sukulaiselle). Olennaiseksi eroksi jää siis vain se, että ihmiselle kipua aiheutetaan hänen suostumuksellaan. Toinen ero on luonnollisesti se, että koe-eläin kokeen yhteydessä tai jälkeen yleensä lopetetaan. Eläinten lopettamista ei ole kuitenkaan missään muussa yhteydessä (esim. teurastus ravinnoksi) yhteiskunnassamme asetettu kyseenalaiseksi. On myös muistettava se kipua ja tuskaa, jota taudit aiheuttavat.

Eläinkokeista saatua hyötyä lääketieteelle niin ihmisten kuin eläintenkin sairauden ja kärsimysten poistamisessa on mahdotonta kiistää. Siten on vaikea ymmärtää, kuinka kukaan voisi valmistautua vakavalla mielellä lääketieteen ammatteihin ja samalla kiistää eläinkokeiden oikeutuksen, vaikka osaan kokeista liittyisi kipuakin.

Oma lukunsa ovat monenlaiset väärinkäsitykset ja harhaluulot, joita vallitsee eläinkokeista. Vastoin yleistä luuloa koe-eläin ei ole yleensä kissa eikä apina, eikä kovin usein koirakaan. Kissat ja koirat kasvatetaan koe-eläimiksi, niitä ei siis kerätä kadulta. Yli 90 % koe-eläimistä on jyräjöitä (tavallisin hiiri, toisena rotta). Huomattava osa tutkimuksista tehdään *in vitro* joko eläimen solukoilla tai eristetyillä elimillä. Eläin ei siis elinaikanaan kärsi ja sen lopettaminen ei poikkea muusta hyväksyttävästä eläinten lopettamisesta. Voidaan siis hyvinkin sanoa, että koe-eläimeksi syntynyt hiiri tai rotta mitä todennäköisimmin kärsii vähemmän kipua ja tuskaa elämässään kuin sen vapaana syntynyt serkku. On mahdotonta tietää, merkitseekö vapaus sinänsä jotakin kotieläimeen verrattaville laboratorioissa syntyneille koe-eläimille (tai ihmisen pitämille muille kesyille eläimille).

Soluviljelmien ja muiden *in vitro* -tekniikoiden mahdollisuudet tunnetaan yleensä huonosti. Solu- ja bakteeriviljelmät eivät useimmiten ole eläinkokeiden vaihtoehtoja,

- *elämäkatsomukselliset ongelmat*

- *eettiset ongelmat*
 - *I ja II luokan kokeet*

- *käsittely*

- *kipu*

- *tiedon puute*

vaan kummallakin on omat tehtävänsä. Pelkistetyillä kokeilla pyritään ennen kaikkea biokemiallisten ja solubiologisten mekanismien selvittelyyn. Tässä työssä on edellytyksenä, että muuttujia on mahdollisimman vähän. Siten voidaan tutkia yhden tai harvan muuttujan merkitystä kerrallaan. Tästä ei kuitenkaan voida suoraan tehdä kokonaisuutta koskevia johtopäätöksiä. On selvää, että esimerkiksi hermoston, endokriinisten rauhasien ja verenkiertoelimistön fysiologiaa tai farmakologiaa ei voida milloinkaan tutkia pelkästään solukokein.

Puhtaan tietämättömyyden ohella informaatio on joskus myös ilmeisen tarkoitushakukuista, mitä kuvaa se, että samat valokuvat tuskallisista eläinkokeista kiertävät maasta toiseen ja joskus ilmeisesti vuosikymmeniä. Eläintensuojelussa tarvittaisiin molemmin puolin hyvää tahtoa ja asiallisuutta, niin että tutkijoiden ja eläintensuojelijoiden yhteistyön myötä päästäisiin mahdollisimman hyvään tulokseen. Tavoitteet ovat monista ennakkoluuloista huolimatta yhteiset.

Eläinten käyttöä opetuksessa ja tutkimuksessa on koko ajan vähennetty, mutta on raja, jonka alle siinä ei voida mennä. Esimerkiksi toksisuuden testausohjelmistot suosittelevat minimissään jo niin pieniä eläinmääriä, että niitä tarkasti noudatettaessa tulos alkaa olla kyseenalainen. Jos tutkimuksessa on liian vähän eläimiä, aineen vaikutukset hukkuvat biologiseen variaatioon. Toksisuuden tutkimiseen kehitetään koko ajan eläimiä korvaavia *in vitro* -menetelmiä ja tulevaisuudessa niitä käytetään yhä enemmän eläinkokeiden rinnalla, kun ne on ensin validoitu. Silmä- ja ihoärsytys-testeissä ollaan jo pitkällä. Opetuksessa eläinten käyttö on rajattu harjoitustöihin, joita ei voida muuten opettaa, ja vain niille opiskelijoille, jotka sitä tulevan ammattinsa puolesta tarvitsevat.

Hannu Komulainen ja Jouko Tuomisto