ALTERNATOR
Misliti znanost.

Alternative testiranju na živalih v (eko)toksikologiji

23. 2. 2023

Number: 08/2023

Author:

- Anže Županič



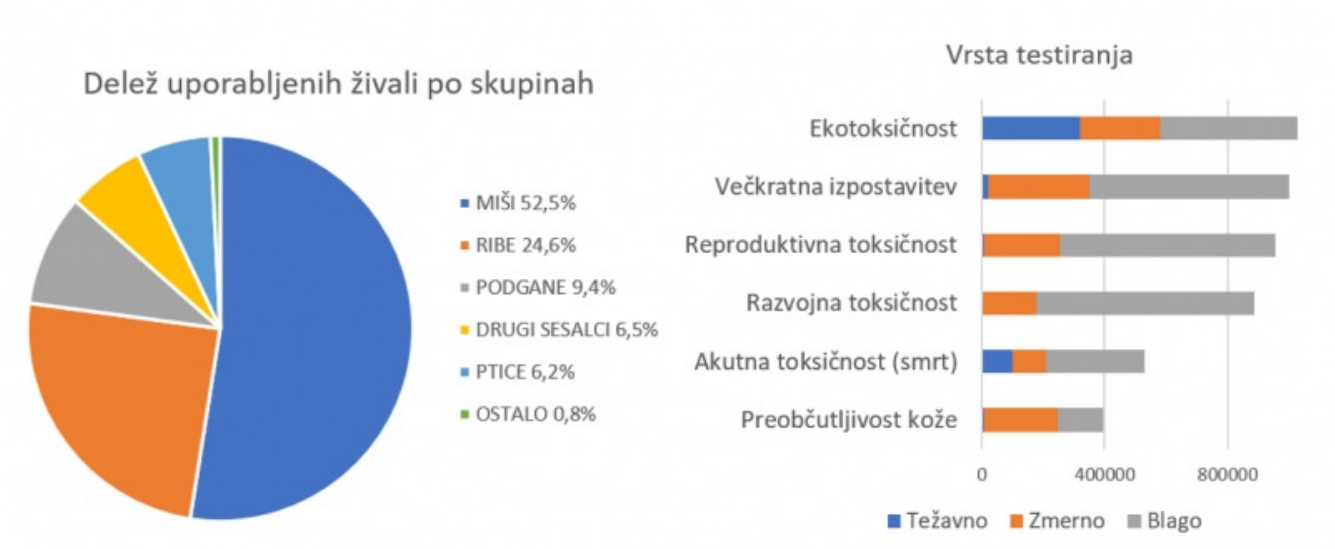
Ribe gaovice (*Telestes metohiensis*), ujete v Rdečem jezeru za genetska raziskovanja, ki so potekala na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Foto: Arne Hodalič

Za zagotavljanje varnosti se po svetu izvajajo ocene tveganja za potencialno nevarne snovi. Trenutna zakonodaja določa, da zaradi izpostavitve kemikaliji ne sme trpeti noben človek, v primeru zaščite okolja pa ne sme biti ogroženo preživetje nobene vrste, medtem ko smrt posamezne živali sicer ni zaželena, je pa dopustna. Večinoma so osnova za ocene tveganja poskusi na živalih, a se je v zadnjih desetletjih del testiranja preusmeril k alternativam, ki živali ne uporabljajo. V tem kratkem prispevku bomo povzeli glavne značilnosti področja alternativ poskusom na živalih v (eko)toksikologiji: koliko se testira, zakaj je (še vedno) potrebno testirati na živalih in kakšne so ovire do dokončne prevlade alternativnih testov.

Poskusi na živalih v številkah

V EU za človeško prehrano in oblačila na leto porabimo približno 3,5 milijarde (https://food.ec.europa.eu/animals/animal-welfare/animal-welfare-practice/slaughter-stunning_en) živali. V namene znanosti in varnosti smo v letu 2019 uporabili 23,5 milijona (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/index_en.htm) živali. Od tega smo za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti proizvodov porabili 1,8 milijona živali, od česar je približno 400.000 (https://doi.org/10.14573/ALTEX.1807101) miši letno porabljenih zgolj za testiranje učinkovitosti toksina botulin, ki se ga večinoma uporablja v kozmetiki za glajenje gubic. V primerjavi z letom 2010 se je število živali, uporabljenih za testiranje varnosti in učinkovitosti proizvodov, znižalo za 25 %, a je skupno število vseh poskusov na živalih ostalo približno enako, saj se je v vmesnem času povečalo število poskusov v temeljni in aplikativni znanosti. Poleg števila je zelo pomemben vidik tudi trpljenje živali med poskusom (http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:doc-ML2EPC7B) (Slika 1). Največ poskusov z

visoko stopnjo trpljenja se izvede v ekotoksikologiji; predvsem gre pri tem testiranje varnosti produktov za vodne organizme. Glavni vzrok za višjo stopnjo trpljenja živali v ekotoksikoloških testih (napram toksikološkim testom, kjer je namen zagotavljanje varnosti za ljudi) je nižja zaščita okolja v primerjavi z ljudmi: ker se ščiti populacije in ne posameznih živali, se v ekotoksikoloških testih uporablja višje odmerke. V namen zniževanja števila poskusov na živalih in znižanja trpljenja med poskusi je v evropsko zakonodajo (imenovano REACH (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm)) eksplicitno vključen princip 3R, ki zapoveduje zamenjavo poskusov na živalih (R – angl. *replacement* 'nadomestitev'), kjer je to mogoče; ali pa vsaj znižanje števila (R – angl. *reduction* 'zmanjšanje') in trpljenja uporabljenih živali (R – angl. *refinement* 'prečiščenje, izboljšava').



Slika 1: Evropska statistika uporabe in trpljenja živali med najpogostejšimi oblikami testiranja varnosti produktov. Barve na desni označujejo stopnjo trpljenja živali, ki nastopi v posameznem testu.

Ekotoksičnost: testi v ekotoksikologiji; večkratna izpostavitev: testi, v katerih se žival večkrat izpostavi kemikaliji; reproduktivna toksičnost: večgeneracijski testi, kjer se preverja uspešnost razmnoževanja živali; akutna toksičnost: določanje smrtne doze kemikalije; preobčutljivost kože: test kožnih reakcij na izpostavitev

Zakaj v (eko)toksikologiji uporabljamo živali?

Kratek odgovor za toksikologijo je: zato, da jih ni potrebno izvajati na ljudeh, ki jih želimo z ocenami tveganja primarno zaščititi. Za doseganje kar največje varnosti za ljudi morajo biti testne živali ljudem kar najbolj podobne. S tega stališča bi bilo najbolj smiselno testiranje na primatih, a se je zaradi etičnih dejavnikov in poceni vzdrževanja uveljavilo testiranje na drugih sesalcih: miših, podganah in zajcih. A ker se ti od človeka do določene mere razlikujejo, so se v preteklosti produkti, varni za testne živali, že večkrat izkazali za nevarne ljudem. Kot primer lahko navedem TGN1412 (https://doi.org/10.4103/0975-1483.66810) , imunoterapevtsko zdravilo, ki se je v predkliničnih testiranjih na živalih izkazalo kot varno, a je povzročilo večorgansko odpoved vsem človeškim prostovoljcem v klinični fazi testiranja.

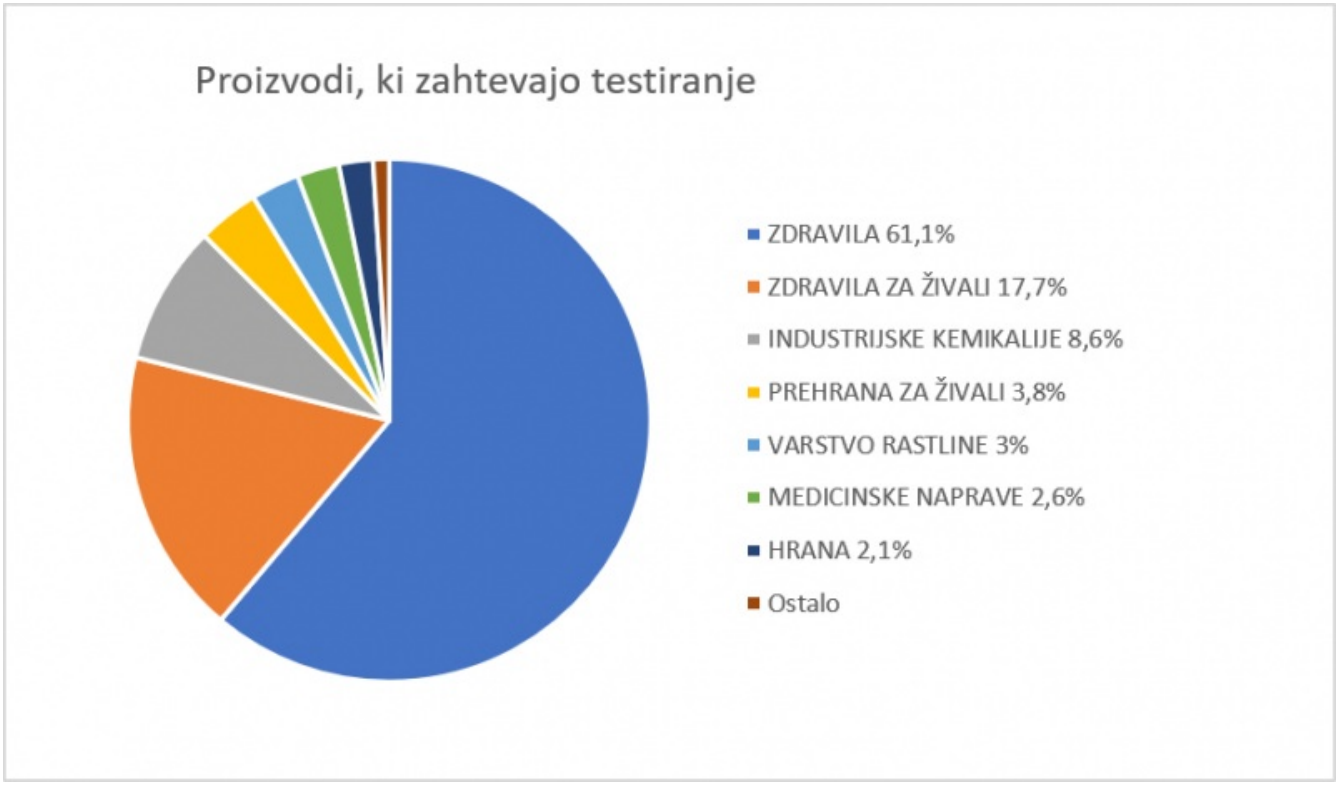
V ekotoksikologiji pa se izvajajo poskusi na živalih, rastlinah in združbah, ki jih želimo zaščititi, tudi v samem v okolju. Ker je teh vrst preveč, da bi testirali vse, so se tudi v ekotoksikologiji uveljavili t. i. modelni organizmi, predstavniki glavnih skupin živali. V akvatični toksikologiji se varnost proizvodov testira na lokalno relevantnih vrstah zelene alge, členonožca in ribe. Podobno kot miš ni popoln model za človeka, tudi ti trije organizmi ne morejo pokriti vsega bogastva biodiverzitete v naših vodah, zato obstaja možnost, da kakšna toksična snov uide skozi sito testiranja. Stroka se pomanjkljivosti testiranja na modelnih organizmih zaveda in kot rešitev se je uveljavil t. i. *varnostni faktor*. Običajno se kot varno koncentracijo za neko snov ne postavi najvišje koncentracije, ki ni imela nikakršnih toksičnih učinkov, temveč za varnostni faktor (običajno med 100-krat in 10.000-krat) nižjo koncentracijo.

Kako smo v zadnjih desetletjih znižali število testiranj na živalih?

V 21. stoletju je bilo razvitih nekaj čez 100 alternativnih testov, ki jih je potrdil EU Referenčni laboratorij za alternative testom na živalih (http://data.europa.eu/89h/b7597ada-148d-4560-9079-ab0a5539cad3) . V tem času je evropska zakonodaja postala bolj varovalna in danes zahteva več testiranja za več produktov, predvsem novih kemikalij. Zaradi hitrega razvoja se je letno število novih kemikalij na trgu močno povečalo. Tako je znižanje števila testiranj za 25 % precejšen uspeh za alternativne metode, saj bi se brez njihove uvedbe število poskusov na živalih v Evropi močno povečalo. Testiranje učinkovitosti cepiv (https://doi.org/10.1016/J.BIOLOGICALS.2020.07.010) danes poteka skoraj povsem brez poskusov na živalih. Pri razvoju zdravil se v zgodnjih fazah razvoja uporabljajo poskusi na celičnih kulturah in računalniške metode. A večina do danes razvitih alternativnih testov nadomešča zgolj najpreprostejše teste na živalih (npr. za akutno toksičnost), kjer je poraba živali relativno nizka. Zato je nujen razvoj alternativ, ki bi lahko nadomestile tudi kompleksne teste (na primer teste reproduktivne toksičnosti, ki trajajo več mesecev in porabijo več sto živali).

Ekonomika testiranja na živalih

Po ocenah Evropske komisije evropska industrija za namene varnosti proizvodov letno nameni 10 milijard evrov. Na živalih se največ testira v farmacevtski industriji, sledijo kemična, prehrambna in agrokemična industrija (Slika 2). Vse si želijo čim bolj znižati stroške poslovanja (tako tudi stroške, povezane s testiranjem varnosti proizvodov) in nove proizvode na trg pripeljati čim hitreje. Veliko testov na živalih je dragih in dolgotrajnih ter ne zagotavljajo povsem zanesljivih rezultatov (https://doi.org/10.14573/ALTEX.1510054) . A industriji predstavljajo potencialno še večje stroške napačne odločitve – nihče ne želi toksičnega proizvoda na trgu (zaradi lažno negativnega testa) ali opuščanja razvoja obetavnih proizvodov (zaradi lažno pozitivnega testa). Prehod na testiranje brez živali industriji niža stroške in izboljša zunanjo podobo. Zato ni presenetljivo, da poleg evropske komisije v razvoj alternativ vlaga največ prav industrija. A ker je prav tako pomembno, da regulacijske agencije proizvode odobrijo, se po drugi strani še vedno v veliki meri odloča za »standardno in sprejeto« testiranje na živalih.



Slika 2: Delež uporabljenih živali v (eko)toksikologiji po industrijskih področjih

Ker podjetja testiranja na živalih izvajajo pri specializiranih podjetjih na podlagi zaupnih pogodb, je (razen številk o številu uporabljenih živali, o katerih morajo zakonsko poročati) zelo težko priti do podatkov o ceni posameznega testa. Raziskovalci, ki so do podatkov (https://doi.org/10.14573/ALTEX.1807041) prišli, poročajo, da so danes najpogosteje uporabljeni alternativni *in vitro* testi za mutagenost in občutljivosti kože. Nedvomno ima pri tem velik vpliv ekonomičnost, saj so kar 10-krat cenejši od testov na živalih. Trenutno najdražji test je test razvojne nevrotoksičnosti na podganah (OECD 426), ki lahko za eno kemikalijo doseže več kot milijon evrov (uporabi > 100 podgan, traja več mesecev). Zelo dragi so tudi testi karcinogenosti (OECD 451) in reproduktivne toksičnosti (OECD 481). Zaradi zakonodaje REACH bo po nekaterih ocenah testiranje reproduktivne toksičnosti v prihodnosti prispevalo > 75 % (https://doi.org/10.14573/ALTEX.1807041) vse porabe živali za testiranje v Evropi.

Kako v prihodnosti dodatno znižati število poskusov na živalih?

1. Ena izmed največjih težav v (eko)toksikologiji je nedostopnost podatkov. V Evropi je potrebno vsako novo kemikalijo registrirati pri agenciji ECHA (https://echa.europa.eu/) , a ECHA sme priložene rezultate testiranja uporabiti samo za lastno ocenjevanje tveganja. Tako se pogosto zgodi, da več podjetji naenkrat opravlja poskuse na živalih za iste kemikalije. Boljša organiziranost in odprtost podatkov bi ne samo znižali število potrebnih testov, temveč dali raziskovalcem nujno potrebne podatke za razvoj novih metod za računalniško napovedovanje toksičnosti. Situacija se sicer izboljšuje, tako da je danes mogoče (sicer z zamudnim ročnim pregledovanjem v bazi ECHA) najti precej podatkov. To sta izkoristila raziskovalca Thomas Luechtefeld in Thomas Hartung, ki sta opravila analizo skladnosti rezultatov testiranja identičnih kemikalij na istih vrstah živali v primerih, ko so bila ta testiranja opravljena večkrat. Ugotovila sta, da je skladnost za posamezne teste med 60 in 90 %. To pomeni, da dva identična poskusa na živalih v 10–40 % ne proizvedeta enakih rezultatov (https://doi.org/10.14573/ALTEX.1510054) .

2. Za 25 % bi bilo mogoče znižati število (https://doi.org/10.14573/altex.2001311) uporabljenih živali s pomočjo t. i. virtualnih kontrolnih skupin. V skoraj vsakem poskusu je namreč prisotna kontrolna skupina – pri testiranju na živalih torej

skupina živali, ki ni izpostavljena kemikalijam. Ker za kontrolne pogoje obstaja že veliko poskusov, bi lahko namesto poskusov uporabili obstoječe podatke (če bi le-ti bili na voljo).

3. Določene poskuse je mogoče nadomestiti tudi z uporabo računalniških metod, na primer t. i. kvantitativna razmerja med strukturo in delovanjem (QSAR (https://qsartoolbox.org/)). QSAR so statistični modeli, ki na podlagi poznavanja strukture kemikalije napovedujejo toksične učinke. A QSAR še niso zmožni napovedovanja bolj kompleksnih neželenih učinkov (kot sta npr. nevrotoksičnost ali reproduktivna toksičnost) in poleg tega trenutno zahtevajo vhodne podatke, pridobljene s poskusi na živalih. Vseeno so računalniške metode izjemno uporabne, saj lahko z njihovo pomočjo veliko najbolj nevarnih kemikalij izločimo že v začetku razvoja, ko vanje še ni bilo vloženih veliko sredstev.

4. Živali niso enake ljudem, a njihova prednost v kontekstu testiranja je v tem, da so kompleksni organizmi, v katerih potekajo kompleksni procesi na vseh nivojih od molekularnega do telesnega. Prednost uporabe človeških celičnih linij (celice, ki smo jih pridobili iz človeškega tkiva, ki se zunaj človeka razmnožujejo v kontroliranih laboratorijskih pogojih) pa je v tem, da imajo človeški genski zapis. Zato ima kemikalija, vsaj na molekularnem nivoju, na celične linije z veliko verjetnostjo enak učinek, kot bi ga imela na celico istega tkiva v človeku. Ker je delo s celičnimi linijami etično sprejemljivo, hitrejše in cenejše, so človeške celice (v toksikologiji) in celice drugih živali (v ekotoksikologiji) osnova za veliko večino do danes razvitih alternativ.

5. Naslednja stopnja testiranja namesto posameznih celičnih linij, razporejenih v dveh dimenzijah, uporablja 3D pristope. V naših organih je (skoraj) vsaka celica obkrožena z drugimi celicami v vseh treh dimenzijah, pri čemer so njene sosede lahko enake celice ali pa drugačne (npr. hepatocit v jetrih ima za soseda lahko endotelijsko celico ali Kupfferjevo celico ali sinusoidno celico – vsi štirje tipi celic skupaj nadzorujejo funkcijo jeter). 3D celične sokulture so tako bolj podobnost človeškim/živalskim organom. Če različne oblike celične kulture nasadimo v posamezne razdelke v čipu, obenem pa omogočimo komunikacijo med celicami v različnih razdelkih, dobimo organ na čipu. Danes so največji izzivi za 3D celične kulture in organe na čipu (v primerjavi z 2D poskusi) nižja ponovljivost rezultatov, večja zahtevnost upravljanja s poskusom ter višja končna cena, a nedvomno predstavljajo eno izmed najbolj obetavnih smeri razvoja alternativ poskusom na živalih.

6. Ko kemikalija pride v stik z biološkim sistemom, ni nujno, da povzroči toksične učinke. To se zgodi le, kadar pride v stik z molekulami, ki v našem telesu opravljajo pomembne funkcije, in to funkcijo onemogoči. »Poti neželenih izidov« so orodja v toksikologiji, ki opisujejo sosledja dogodkov v biološkem sistemu, od prvega kontakta kemikalije z molekulami do sprememb v delovanju celic, tkiv in organov ter končno neželene toksičnosti. Posameznim dogodkom na poti neželenih izidov rečemo ključni dogodki, oziroma tudi molekularne (ali celične, tkivne …) značilke (t. i. biomarkerji), saj so ti dogodki značilni za prav določeno obliko toksičnosti. Merjenje molekularnih značilk na celičnih linijah, na primer merjenje izraženja genov z visoko zmogljivim sekvenciranjem, se je v zadnjih letih izkazalo kot odlično orodje za napovedovanje toksičnosti na celotnem organizmu.

7. Še eden izmed alternativnih pristopov k ocenjevanju tveganja je t. i. prag toksikološkega tveganja (https://doi.org/10.14573/altex.1707011) . Če obstaja za skupino podobnih kemikalij veliko podatkov o toksičnosti (ali preko poskusov na živalih ali pa alternativnih testov), lahko za prag toksikološkega tveganja za našo novo kemikalijo vzamemo najnižjo koncentracijo, ki je povzročila neželen učinek v tej skupini. Ko imamo prag, je potrebno s pomočjo matematičnih modelov ugotoviti, kakšna je največja verjetna koncentracija nove kemikalije v okolju glede na predvidene načine uporabe. Če je prva koncentracija veliko višja od druge, potem potrebe po testiranju ni.

8. Klasična toksikologija temelji na poskusih na živalih, zato je danes celoten sistem ocenjevanja tveganja podrejen takemu načinu testiranja. Posledično se zahteva, da nov alternativni test nadomesti enega izmed starih testov z živalmi. A poskusi na živalih so konceptualno preprosti: izpostavitev živali po določenem protokolu, nato spremljanje neželenih učinkov, npr. preživetja, razvojnih težav. Nove generacije molekularnih in celičnih testov pa lahko običajno izmerijo samo en del biološkega procesa, ki vodi od izpostavitve do neželenega učinka, in tako ne morejo nadomestiti celotnih testov na živalih. Zgolj skupna interpretacija več alternativnih testov, z uporabo matematičnih in statističnih orodij, lahko da kvalitativno primerljive rezultate. Dokler se bo poskuse na živalih uporabljalo kot zlati standard (kljub znanim pomanjkljivostim), bodo novi inovativni pristopi težko nadomestili stare.

9. Seveda poskusov na živalih ne bo mogoče nadomestiti zgolj z enim izmed zgoraj omenjenih pristopov, potrebni bodo vsi. V zadnjih letih se čedalje bolj uveljavlja koncept hkratnega razvoja in testiranja po stopnjah. Na prvi stopnji se uporablja računalniške metode in se tako iz razvoja umakne potencialno nevarne kemikalije. Na drugi stopnji se z uporabo celičnih linij in molekularnih značilk umakne verjetno nevarne molekule. Na tretji in četrti stopnji pa se nato uporabijo bolj kompleksni testi, ki se izberejo glede na najbolj verjeten način neželenega delovanja kemikalije. Tu gre lahko za 3D celične strukture, organe na čipu ali testiranje na živalih.

Kaj lahko pričakujemo v prihodnosti?

Kljub temu da v zadnjem desetletju število poskusov na živalih ni upadlo, lahko ugotovimo, da je bil storjen precejšen napredek. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo vidimo največji potencial v razvoju novih metod za testiranje, ki temeljijo na celičnih linijah (https://www.nib.si/oddelki/oddelek-za-genetsko-toksikologijo-in-biologijo-raka) , in v razvoju novih matematičnih metod (https://doi.org/10.3389/ftox.2022.815754) . Trenutno še ni doseženo kritično število sprejetih alternativ, a ko se bo to zgodilo (po mnenju avtorja še pred koncem stoletja), lahko pričakujemo hiter premik poskusov na

živalih iz laboratorijev v zgodovinske knjige.

https://www.alternator.science/en/long/alternative-testiranju-na-zivalih-v-ekotoksikologiji/