

Alternativa metoder til djurförsök

av Monica Thelestam,

Bakteriologiska institutionen, Karolinska institutet, 104 01 Stockholm.

Definition av alternativa metoder

Med alternativa metoder avses enligt den språkligt korrekta definitionen metoder som helt och hållet ersätter djurförsök. Eftersom endast få sådana metoder nu existerar har en mera pragmatisk definition anammats av Centrala försöksdjursnämnden, liksom av flertalet liknande utländska organisationer: »med alternativ till djurförsök (alternativa metoder) avses sådana metoder som helt eller delvis ersätter djurförsök eller minskar djurens lidande«. Denna definition utgår från de 3R, ett begrepp lanserat 1959 av Russel och Burch i »The principles of humane experimental technique«. De tre R står för Replace, d v s ersätta, Reduce, d v s minska antalet djurförsök, och Refine, d v s förfinas (förbättra) djurförsök vilka fortfarande kvarstår, klassade som nödvändiga.

Översikt av alternativa metoder

Utgående från ovannämnda mycket breda definition av begreppet har nedan sammanställts en schematisk översikt av tekniker och testsystem vilka inom vissa användningsområden utgör alternativa metoder. Uppräkningen går från tekniska till biologiska metoder av ökande komplexitet.

1. *AudovisueLLa hjälpmedel* d v s filmer, videoband, diabilder eller overhead-bilder kan användas vid olika slag av undervisning i stället för de demonstrationer på försöksdjur som ofta förekommer. Väl-

gjorda AV-hjälpmiddel kan ge en bättre uppfattning om *detaljer* än en demonstration där bara de närmast stående personerna kan uppfatta vad som försiggår i försöksdjuret.

2. *Modeller* konstruerade i textplast, kan användas i stället för riktiga djur exempelvis vid enkla dissektioner. Försedda med lämplig elektronik kan modeller bringas att simulera olika funktioner. Man bör dock komma ihåg att det mesta av naturens komplexitet går förlorad i modeller. Risk föreligger att studenter bibringas en överförenklad verklighetsuppfattning. Modeller används idag i mycket begränsad omfattning.

3. I debatten om alternativa metoder nämns ofta *datorn* som ett slags undergörande ersättare av försöksdjur. Vilka är då datorns fördelar och begränsningar? Datorn är ovärderlig vid textlitteratursökning och kan sålunda bidra till undvikande av dubbelförsök p g a okunnighet om vad som pågår på andra håll. Datorn kan analysera och bearbeta stora mängder fakta. På så sätt kan den möjliggöra att ett flertal analyser hinner göras på samma biologiska prov (i ett djurförsök) varför färre prov behöver tas. Man får alltså ut mer information per försök, men djurförsöken är fortfarande oundgängliga som informationskälla. Det kan också påpekas att den ökade bearbetningsmöjligheten kan ge rakt motsatt effekt: man kan göra flera djurförsök för att man

hinner bearbeta resultaten snabbare! Datorn kan programmeras att simulera olika biologiska funktioner och kan därför användas som en mera subtil »modell« än de ovannämnda. Det har utarbetats program som t ex simulerar intermediär-metabolismen hos en frisk människa samt hos människor som lider av olika rubbningar såsom alkoholism, diabetes, m. m. Med hjälp av sådana program kan man lära sig hur åtminstone delar av kroppens ämnesomsättning fungerar, i stället för att lära genom att utföra experiment på alkoholiserade eller sockersjuka råttor.

De hittills diskuterade alternativa metoderna är av teknisk karaktär, men har intresse i sammanhanget för att de kan ersätta en del djurförsök, fr a vid undervisning. Eftersom sådan verksamhet ständigt pågår kan på sikt ett mycket stort antal försöksdjur sparas vid övergång till alternativa metoder. Det bör dock framhållas att man *inte* med dessa metoder uppnår någon direkt *ny kunskap* varför de inte i denna form kan ersätta biomedicinsk grundforskning!

4. Användning av *fysikalisk-kemiska analysmetoder* som alternativ till djurförsök kan exemplifieras med olika slag av kromatografi, masspektrometri samt »quantitative analysis of structure/activity relationships« (QSAR). Kromatografiska metoder är mycket känsliga, varför analyser av mycket små mängder material kan utföras. Dessa metoder kan således bidra till att minska antalet försöksdjur eftersom åtgången av behövt provmaterial från djur (eller människa) minskas. De kan även användas i stället för »bio-assays« (se nedan).

QSAR innebär kvantitativ analys av förhållandet mellan ämnens molekylära struktur och biologiska aktivitet. Ett läkemedels farmakologiska och toxikologiska verkan i kroppen har samband med karakteristiska såsom molekylvikt, tredimensionell molekylstruktur, elektrisk laddning och ett flertal andra egenskaper hos molekylerna. Med datorns hjälp kan biologisk aktivitet korreleras till en mängd sådana molekylära egenskaper. När detta har gjorts för ett stort antal kända substanser antas informationen kunna användas för att *förutsäga* biologisk aktivitet hos *nya* substanser på bas av de senares molekylära struktur, vilken ju kan analyseras fysikaliskt/kemiskt utan användning av försöksdjur.

Denna metod förefaller intressant men är fortfarande på utprovningstadiet och har väckt en del kritik. Den kan säkert aldrig helt ersätta farmakologiska och toxikologiska tester på försöksdjur i t ex slututvärderingen av läkemedel. Dock borde den kunna användas inom läkemedelsforskningen för att från en samling närbesläktade ämnen sälla bort substanser vilka definitivt är oanvändbara.

5. *Biokemiska och immunologiska analysmetoder*. Under hela 1900-talet har inom den analytiska biokemin skett en fortlöpande metodutveckling som bl a lett till en övergång från sk bioassay till *in vitro* metoder. Ett historiskt exempel är analysen av olika vitaminer. Ursprungligen upptäcktes ju vitaminerna på bas av den biologiska effekt de har i människor och djur. Deras närvaro i olika livsmedel samt deras mängd kunde då endast analyseras genom den effekt de har

på djur eller människor. Sedemera när kemisk struktur klarlades kunde också analysen göras med kemiska *in vitro* metoder. En liknande utveckling har skett och sker i fråga om hormoner, men fortfarande måste många hormoners och vissa vitaminers effekt testas på djur i det klassiska bioassayförfarandet. Mängd av t ex vitamin D analyseras fortfarande idag med hjälp av radioaktiska råttor.

Vissa substanser kan analyseras *in vitro* med immunologiska metoder av typ radioimmunoassay (RIA) eller enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Med dessa högkänsliga antikroppsbaseade metoder kan man upptäcka och mäta mängd av hormoner, toxiner, vacciner m fl biologiskt aktiva substanser. Ett problem är att antigen aktivitet inte alltid korresponderar fullständigt mot biologisk aktivitet. En del styrkebestämningar måste därför fortfarande utföras med användning av försöksdjur. För att lösa detta problem utvecklas andra typer av biokemiska analyser. I den sk radioreceptor assay (RRA) mätes hur t ex hormoner fastnar på målcellernas receptorer. Eftersom biologisk aktivitet förutsätter receptorbindning kan RRA förutspås bli bättre än RIA eller ELISA såsom ersättning för hittills använda bioassays i råttor, marsvin och möss.

6. *Hybrid-DNA teknik och mikroorganismer.* Hybrid-DNA teknik innebär bl a att bitar av genetiskt material kan »klippas till» och »sys in» i bakterier. Man kan sålunda i bakterier införa DNA som bestämmer att en viss önskad substans skall produceras. När bakterien växer och delar sig utsöndras substansen. Med

denna teknik kan t ex hormoner, interferon, vacciner och andra biologiskt aktiva substanser produceras i stora mängder. Man undviker de mödosamma och dyrbara extraktioner ur djur- eller människovävnad som hittills praktiserats. Ett enkelt exempel: insulin av human typ kan produceras i önskade kvantiteter genom odling i stor skala av en bakterie i vilken den humana insulin-genen har introducerats. Detta förfarande ersätter nu använd extraktion av insulin ur bukspottkörtlar från svin och kalv. Förutom att djuranvändning undviks har detta insulin fördelen att vara väldefinerat och av human typ.

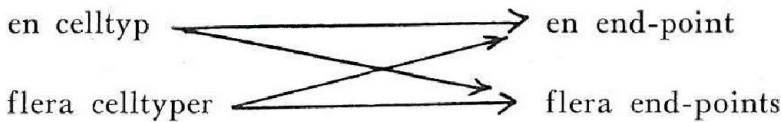
Förutom samband med hybrid-DNA tekniken har bakterier fått en omfattande användning som alternativ till försöksdjur vid testning av kemikaliers potentiellt cancerframkallande effekt. Man undersöker mutagen aktivitet i tester av den typ som lanserades av Bruce Ames i början av 1970-talet. Korrelationen mellan mutagen och carcinogen aktivitet är inte hundraprocentig, men anses god nog för screeningändamål. Även andra mikroorganismer såsom svampar och protozoer (t ex amöbor) används för liknande tester.

7. *Vävnadskultur* är ett sammanfattningsnamn för dels odling av enskilda celler i flaska (cellkulturer) och dels sk organ-kultur, d v s att bitar av organ från djur eller människa hålls vid liv i en flytande näringslösning. Vävnadskulturteknologin har redan flera användningsområden som alternativ metod (Tabell I) och fler kan förväntas tillkomma ju mer denna teknik utvecklas. Idag begränsas dess användning bl a av

Tabell I.

Användning av vävnadskulturer som alternativa metoder.

1. För diagnostiska ändamål, ex virus, toxiner etc.
2. För produktion av biologiskt aktiva substanser, ex vacciner, monoklonala antikroppar, hormoner, m fl. tillväxtfaktorer.
3. För utveckling av kemoterapi, ex mot virus, cancer.
4. Som testbatteri för toxikologisk prövning;



att endast ett fåtal celltyper, framför allt fibroblaster, hittills kunnat odlas. Vävnadskulturteknologin är emellertid stadd i explosionsartad utveckling. Metoder som möjliggör odling av normala humana epitelceller utvecklas nu. Nyligen introducerades den sk hybridomtekniken med vilken för första gången antikroppar kan produceras *in vitro*, något som ännu för tio år sedan ansågs helt osannolikt.

8. *Lägre stående organismer* kan sannolikt användas som alternativ i flera typer av experiment. Ett exempel: pyrogentest på kanin kan ersättas med test på hästskokrabbans blod. De flesta tycks eniga om att försök med lägre organismer innebär en lägre »etisk kostnad« än försök med högre stående djur.

9. *Bättre försöksdjur och bättre djurförsök.* En av tankarna bakom lagen om destinationsuppfödning av försöksdjur är att djurens kvalitet på detta sätt görs jämnare och högre. Detta borde i sig kunna leda till en minskning av försöksdjursanvändningen. I termen »refine« enligt Russel och Burch ingår bättre planering av arbetet med djur och en större hänsyn till djurens lidande. Hit hör skötseln av djuren,

transporter, utformningen av deras yttre miljö samt laborariepersonalens bemötande av djuren. Hit hör också att arrangera försök så att i varje moment minsta möjliga lidande tillfogas djuren. Man kan sträva efter att välja så lindriga »end-points« som möjligt. Som »end-point« vid test av textelkrampstoxin kan man exempelvis välja paralytisk av djurets ben i stället för djurets död.

Alternativa metoders potential inom biomedicinen

Det är uppenbart att vi förfogar över en expanderande arsenal av metoder, vilka kan eller kommer att kunna ersätta vissa djurförsök, och vilka framför allt kan leda till en minskning av försöksdjursanvändningen och förfining av de försök som fortfarande kommer att betraktas som nödvändiga. Möjligheten att införa alternativa metoder varierar dock beroende på vilken typ av djurförsök som ska ersättas eller reduceras. I Tabell II återfinns en indelning av området biomedicin i olika kategorier. Alternativa metoder har olika potential beroende på vilket delområde inom biomedicinen som avses.

Tabell II.

Potential för alternativa metoder inom olika områden av biomedicinen.

Delområde	Potential för alternativ
Grundforskning	+—
Toxikologisk forskning	++
Utbildning	+++
Produktion och styrkebestämning av biologiskt aktiva substanser	++++

Biomedicinsk grundforskning kan sägas försöka klarlägga de vita fläckarna i vår kunskap om kroppens byggnad och funktioner. Här ligger det i själva frågeställningen att djur- eller människovävnad *muste* användas. Vi kan inte programmera en dator att uppvisa en mängd för oss *okända* strukturer och funktioner i kroppen. Förfärdigande av bilder och filmer förutsätter att vi först *vet* hur det förhåller sig. Potentialen för introduktion av metoder som *helt* ersätter försöksdjur är därför mycket låg eller icke existerande. Mycket kan dock göras för att förfina djurförsöken och därmed minska djurens lidande samt reducera antalet försöksdjur. Inom biomedicinsk grundforskning används idag givetvis en mängd *in vitro* metoder vilka dock inte alltid kan klassas som alternativa metoder i den mening som här diskuterats. För besvarande av vissa frågor duger endast *in vitro* metoder. För besvarande av andra frågor inom grundforskningen duger endast djurförsök!

Grundforskningen är heller inte den del av biomedicinen som slukar mest försöksdjur. Ett mycket större antal

djur åtgår inom toxikologisk (och farmakologisk) testning. Inte heller här är potentialen för alternativa metoder för närvarande särskilt stor. Den främsta principiella begränsningen är att systemeffekterna (bl a upptag, distribution, omsättning, utsöndring i hela djur/människor) förbises vid test av substanser på isolerade vävnadskulturer eller mikroorganismer. En del av dessa problem kan lösas, t ex genom koppling av metaboliserande system till vävnadskulturer. Andra problem verkar för närvarande svårlösta. Hur skulle vi en cellodling kunna mäta om en kemikalie förorsaker högt blodtryck?

Principiellt skiljer sig dock frågeställningarna inom toxikologisk testning från de flesta inom den rena grundforskningen i och med att det oftast gäller att studera effekter på redan kända funktioner och strukturer. »Trycket« från toxikologin är dessutom mycket stort i denna tid då i vårt samhälle tusentals nya kemikalier framställs och borde testas varje år. De flesta forskare är eniga om att nu använda tester för akut toxicitet, främst LD₅₀, är missvisande och oacceptabla. Tillsammans med det faktum att vävnadskulturteknologin snabbt utvecklas kan man förutspå en successivt minskad djuranvändning inom toxikologisk testning.

En gammal tanke som kanske förtjänar att tas upp till förnyad diskussion är att samordna landets resurser för toxikologisk testning i ett centralt toxikologiskt laboratorium. Förutom avdelningar för traditionell toxikologisk forskning och prövning på olika slag av djur skulle man här kunna etablera avdelningar för ut-

veckling av en *in vitro* toxikologi. Om resurserna för båda traditionell och alternativ toxikologi finns samlade på ett ställe möjliggörs den absolut nödvändiga intima kopplingen mellan dessa discipliner.

Man skall heller inte förbise det mest uppenbara sättet att reducera den stora djuranvändningen inom toxikologin, nämligen att minska produktionen av nya potentiellt hälsovådliga kemikalier samt att bättre än idag separera kemikalierna från människan. På så sätt kan delar av toxikologins mål nås genom rent politiska beslut utan att forskning med eller utan djur behöver blandas in.

Utbildning och undervisning inom det biomedicinska området kan uppenbarligen bedrivas med ett färre antal försöksdjur än vad som skett och idag sker. Såsom ovan antytts är här potentialen för introducerande av alternativa metoder hög. Detta beror på att vi vid undervisning lär ut redan kända fakta.

Produktion och testning av biologiskt aktiva substanser är andra områden där möjligheterna att använda alternativa metoder synes stora. Det spelar ingen roll hur produktionen går till om blott slutprodukten är den rätta. Likaså är det betydelselöst att systemeffekter förbises vid styrkebestämningar om blott jämförande studier med djurförsök har visat att substanserna specifikt kan påvisat och kvantifieras *in vitro* lika väl som i de gamla bioassays.

Hur befrämjas utvecklingen av alternativa metoder?

På forskarhåll sägs ibland att forskarna redan använder alla tillgängliga alternativa metoder och hittar

på nya när behov av sådana uppkommer. En särskild satsning på alternativa metoder anses inte motiverad eftersom inga ytterligare resurser skulle kunna skynda på utvecklingen. Att en »naturlig« utveckling skett under hela 1900-talet är uppenbart. Jag är dock övertygad om att just ökade ekonomiska resurser kommer att accelerera denna utveckling. Pengar bädde visserligen inte för de ofta slumpmässiga primärupptäckter som ligger till grund för utvecklingen av nya metoder. Däremot kan pengar bidra till att fånga upp och vidareutveckla idéer som kanske annars skulle falla i glömska.

Sverige har som första land i världen en särskild statlig ekonomisk satsning på utveckling av alternativa metoder. Även om CFN-anslagets storlek (hittills ca 1 miljon kronor per år) inte är särskilt imponerande är det viktigt att fortlöpande diskutera hur dessa medel bäst skall användas. Vilken typ av djurförsök skall vi satsa på att ersätta? De särskilt plågsamma? Eller särskilt djurkrävande? eller »onödiga« (typ tester av kommersiella skräpprodukter som kan undvaras), eller dåliga försök (typ LD₅₀-test)? Ska vi satsa kraftigt på att utveckla försöksdjursvetenskapen? Ska vi fungera enbart som forskningsråd och alltså låta utvecklingen styras helt av forskarnas initiativ? Eller skall vi också själva initiera särskilda projekt på bas av utredningar som visar var alternativ behövs och om det finns rimlig potential för en metodutveckling på ifrågavaranda område?

Personligen tror jag at en kombination av alla dessa åtgärder i för-

ening med information och utbildning rörande djurförsök och alternativa metoder kommer att ge den bästa utdelningen.

Det vore orealistiskt att tro att alla djurförsök kan avskaffas. Jag har försökt peka på några områden där det finns alternativ eller där en utveckling av sådana kan förutses. Sammanfattningsvis synes det fullt möjligt att betydligt minska försöksdjursanvändningen utan att för den skull den biomedicinska forskningens kvalitet på något avgörande sätt försämras.

LITTERATUR

- Ames, N. N., Mc Cann, J., Yamasaki, E.* (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31, 347—364.
- Dodds, W. J. and Orlans, F. B.* eds. (1982). *Scientific Perspectives on Animal Welfare*. Academic Press, 131 pp.
- Lindgren, P., Thelestam, M. and Lindquist, N.-G.* (1983). First CFN Symposium: LD₅₀ and Possible Alternatives. *Acta Pharm. Tox.* 52, uppl. II, 302 pp.
- Prat, D.* (1980). *Alternatives to Pain in Experiments on Animals*. Argus Archives, 283 pp.
- Proceedings of the symposium on Trends in Bioassay Methodology; in vivo, in vitro and mathematical approaches. (1981). National Institutes of Health Publication No. 82—2382, 356 pp.
- Rowan, A. N. and Stratmann, C. J.* (1980). *The Use of Alternatives in Drug Research*. The Macmillan Press Ltd., London, 190 pp.
- Russel, W. M. S. and Burch, R. L.* (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Meuthen, London.
- Smyth, D. H.* (1978). *Alternatives to Animal Experiments*. Scholar Press, London, 216 pp.
- Thelestam, M. och Florin, I.* (1982). CFN-Forskningsrapporter: rapport över forskningsanslag från Centrala Försöksdjursnämnden 1979—1982, 50 s.
- Williams, G. M., Dunkel, V. C. and Ray, V. A.* (1983). Cellular Systems for Toxicity Testing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 407, 484 pp.

SKAF NYE MEDLEMMER TIL SCAND LAS

Klip kuponen ud eller kopier den og giv den til personer, som du mener bør være medlemmer.

UNDERTEGNEDE INDMELDER SIG HERVED I SCAND LAS

NAVN:

ADRESSE:

POSTNR./BY:

Kontingent (medlemsafgift) pr. år er 105 Skr.

Kuponen indsendes til Scand LAS sekretariat (se omslagets side 2). Så snart indmeldelsen er modtaget fremsendes postgiroindbetalingskort. **Send ikke checks.**