

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Bc. Ondřej Černík

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Vyhodnocení alternativního toxikologického *in vitro* testu oční dráždivosti
metodou HET-CAM v kombinaci s Trypan blue

Diplomová práce

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej Černík**
Osobní číslo: **C19605**
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Téma práce: **Vyhodnocení alternativního toxikologického in vitro testu oční dráždivosti metodou HET-CAM v kombinaci s Trypan blue**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o alternativních toxikologických testech v oblasti oční dráždivosti.
2. Vypracujte metodu pro alternativní toxikologický in vitro test HET-CAM a jeho objektivní vyhodnocení pomocí Trypan blue. Tuto metodu experimentálně ověřte na skupině látek se známým potenciálem způsobit podráždění oka.
3. Získané výsledky použité metody porovnejte s vybranými alternativními testy v oblasti oční dráždivosti, zejména s testem BCOP a pokud budou dostupné, tak s výsledky in vivo testů.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Školitel specialista diplomové práce: **Ing. Petra Plodíková, Ph.D.**

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem „Vyhodnocení alternativního toxikologického *in vitro* testu oční dráždivosti metodou HET-CAM v kombinaci s Trypan blue“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 07.05.2021

Bc. Ondřej Černík v. r.

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Ing. Petře Plodíkové Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, poskytnuté rady a věnovaný čas. Dále bych chtěl poděkovat své vedoucí prof. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. za pomoc, věcné rady a podporu během studia. Díky patří i Ing. Zdeňce Rösslerové a Denise Medunové z Výzkumného ústavu organických syntéz a.s. za pomoc s experimentální částí mé práce, ochotu a trpělivost.

Velké díky patří také mé rodině za poskytnutou důvěru, podporu a zázemí během celého studia. Nakonec bych chtěl poděkovat i své přítelkyni Frederice Mišíkové za lásku, pomoc a pochopení při studiu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá alternativními metodami, které se používají pro odhalení potenciálu látek způsobit poškození nebo podráždění oka. V experimentální části práce je na vybrané skupině látek ověřen nový způsob vyhodnocení testu oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya pomocí barviva Trypan blue (Trypanové modři). Do experimentů byly použity další dvě alternativní metody HET-CAM a BCOP. Testování probíhalo na chemikáliích se známým *in vivo* účinkem. Výsledky testů byly mezi sebou porovnány. Závěrem byla doporučena kombinace dvou alternativních metod dosahující 82,4% shody s *in vivo* výsledky.

KLÍČOVÁ SLOVA

alternativní testy, oko, chorioalantoidní membrána, rohovka, oční dráždivost, HET-CAM, CAM-TBS, BCOP

TITLE

Determination of an alternative toxicological *in vitro* eye irritation test by HET-CAM method in combination with Trypan blue

ANNOTATION

The diploma thesis deals with alternative methods which are used to reveal the potential of substances to cause damage or irritation to the eye. In the experimental part of the work, a new method of evaluating the eye irritation test on the chorioallantoic membrane of the chicken embryo using the dye Trypan blue is verified on a selected group of substances. Two other established alternative methods, HET-CAM and BCOP, were also tested. Testing was performed on chemicals with known *in vivo* effects. The test results were compared with each other. In conclusion, a combination of two alternative methods was recommended, achieving 82.4% agreement with the *in vivo* results.

Keywords

alternative tests, eye, chorioallantoic membrane, cornea, eye irritation, HET-CAM, CAM-TBS, BCOP

Obsah

ÚVOD.....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Historické pozadí testování oční dráždivosti a leptavosti <i>in vivo</i>	17
1.1.1 Draizeho <i>in vivo</i> test oční dráždivosti	18
1.2 Lidské oko	20
1.2.1 Oční dráždivost – důvody, mechanismy, důsledky.....	21
1.2.1.1 Rohovka.....	22
1.2.1.2 Duhovka	23
1.2.1.3 Spojivka.....	23
1.3 Hnutí proti toxikologickému testování na laboratorních zvířatech.....	24
1.4 Historie a základy alternativního toxikologického testování oční dráždivosti	24
1.4.1 Koncepce „3R“	25
1.4.1.1 Replace – nahradit laboratorní zvířata	25
1.4.1.2 Reduce – snížit počty zvířat nezbytných pro zkoušku	27
1.4.1.3 Refine – zjemnit laboratorní toxikologické postupy.....	27
1.4.2 Přínosy koncepce „3R“	27
1.5 Proces ověřování alternativních metod	28
1.6 Základní postupy víceúrovňového testování k posouzení podráždění očí	29
1.7 Alternativní toxikologické testy.....	31
1.7.1 Organotypické metody – izolované enukleované orgány	31
1.7.1.1 Zkouška na izolovaných hovězích rohovkách.....	33
1.7.2 Buněčné linie, kultury a tkáně – 2D a 3D modely	34
1.7.2.1 2D modely – jednovrstevné buněčné linie	36
1.7.2.2 3D tkáňové modely tkáně rohovky	37
1.7.3 Organotypické modely – chorioalantoidní membrána kuřecího embrya	38

1.7.3.1	HET-CAM – test oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya.....	41
1.7.3.2	CAMVA – vaskulární test oční dráždivosti	42
1.7.3.3	CAM-TBS – vyhodnocení oční dráždivosti v kombinaci s Trypanovou modří.....	43
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
2.1	<i>In vivo</i> testování oční dráždivosti/leptavosti.....	44
2.2	Popis vybraných alternativních toxikologických postupů.....	45
2.2.1	Metoda BCOP.....	45
2.2.1.1	Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky.....	45
2.2.1.2	Postup alternativní metody prováděné na izolovaných hovězích rohovkách.....	46
2.2.2	Metoda HET-CAM	51
2.2.2.1	Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky.....	51
2.2.2.2	Postup alternativní metody prováděné na chorioalantoidní membráně	51
2.2.3	Metoda CAM-TBS.....	55
2.2.3.1	Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky.....	55
2.2.3.2	Postup alternativní metody prováděné na CAM v kombinaci s Trypanovou modří.....	56
2.3	Výběr testovaných látek	59
2.3.1	Ověření metody CAM-TBS.....	59
2.3.2	Ověření citlivosti vybraných alternativních metod oční dráždivosti pomocí výsledků z <i>in vivo</i> testování	60
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	63
3.1	Validace a výběr klasifikační tabulky pro metodu CAM-TBS.....	63
3.1.1	Výsledky.....	63
3.1.2	Diskuse	64

3.2	Porovnání a ověření citlivosti použitých alternativních metod oční dráždivosti s výsledky <i>in vivo</i> testů.....	65
3.2.1	Metoda BCOP.....	66
3.2.1.1	Výsledky.....	66
3.2.1.2	Diskuse.....	67
3.2.2	Metoda HET-CAM.....	68
3.2.2.1	Výsledky.....	68
3.2.2.2	Diskuse.....	69
3.2.3	Metoda CAM-TBS.....	70
3.2.3.1	Výsledky.....	70
3.2.3.2	Diskuse.....	71
3.2.4	Ověření citlivosti použitých alternativních metod oční dráždivosti s výsledky <i>in vivo</i> testů.....	72
4	ZÁVĚR.....	76
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	77

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 - Schématické znázornění anatomie oční koule – horizontální řez.....	21
Obrázek 2 - Sledované části lidského oka.....	23
Obrázek 3 – Ukázka vybraných alternativních výzkumných modelů	25
Obrázek 4 - Charakteristické míry potenciálu poškození při expozici toxickou látkou	33
Obrázek 5 - Histologické srovnání vybraných biologických modelů rohovkové tkáně s lidskou rohovkou - EpiOcular™ (a), SkinEthic™ HCE (b) a lidská rohovka (c)	38
Obrázek 6 - Ukázka vývoje cévního řečiště CAM – primitivní vaskulární plexus 3. den po oplodnění (A), růst a remodelace cév 7. den po oplodnění (B) a desátý den vývoje embrya jsou cévy plně diferenciovány (C).....	40
Obrázek 7 - Zobrazení charakteristických reakcí CAM na neznámou látku – bez reakce (A), hyperemie (B), hemoragie (C), koagulace (D)	40
Obrázek 8 - Stereomikroskop, Leica S8 APO.....	41
Obrázek 9 - Schéma postupu testování metodou CAMVA	42
Obrázek 10 - Aplikace kapalné látky do definovaného prostoru na CAM.....	43
Obrázek 11 - Schéma speciálního držáku na hovězí rohovku.....	47
Obrázek 12 – Prosvícený model vajíčka s označenou vzduchovou bublinou.....	52
Obrázek 13 - Příprava testu HET-CAM a odstranění skořápek	52
Obrázek 14 - Odstranění svrchní papírové membrány	53
Obrázek 15 - CAM před aplikací X CAM po aplikaci a vzniku koagulace.....	54
Obrázek 16 - Aplikace silikonového kroužku o průměru 18 mm na CAM	56
Obrázek 17 - Vyjmutá oblast chorioalantoidní membrány	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Ukázka biologických modelů rohovkového epitelu.....	35
Tabulka 2 - Bodové vyhodnocení potenciálu dráždivosti chemických látek za pomoci Draizeho <i>in vivo</i> testu oční dráždivosti/leptavosti	44
Tabulka 3 - Přepočet výchozích hodnot opacity pro výpočet IVIS	49
Tabulka 4 - Přepočet výchozích hodnot permeability pro výpočet IVIS.....	50
Tabulka 5 - Klasifikace potencionálně dráždivých látek za pomoci metody BCOP	50
Tabulka 6 - Bodové hodnocení vzniklého poškození cév v závislosti na čase	54
Tabulka 7 - Klasifikace potencionálu dráždivosti chemických látek na základě vypočítaných hodnot IS.....	55
Tabulka 8 - Ředění roztoku do kalibrační křivky na 100 ml vzorku.....	58
Tabulka 9 - Vyhodnocení dle metody HET-CAM	58
Tabulka 10 – Vybrané v publikaci uváděné vyhodnocení pro metodu CAM-TBS	58
Tabulka 11 - Přehled látek pro ověření alternativní metody CAM-TBS	59
Tabulka 12 - Výběr látek pro ověření citlivosti alternativních testů oční dráždivosti.....	61
Tabulka 13 - Přehled dráždivých vlastností látek získaných metodou <i>in vivo</i>	62
Tabulka 14 - Vyhodnocení naměřených hodnot metody CAM-TBS	63
Tabulka 15 - Srovnání vypočítaných hodnot IS s publikovanými výsledky metod CAM-TBS.....	64
Tabulka 16 - Výsledky alternativní zkoušky BCOP.....	67
Tabulka 17 - Přehled výsledků testování metodou HET-CAM	69
Tabulka 18 - Přehled výsledků zkoušky CAM-TBS	71
Tabulka 19 - Souhrnné výsledky vybraných alternativních metod a <i>in vivo</i> testů	74

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	dvojrozměrný
3D	trojrozměrný
3R	Refinement, replacement, reduction – zmírnění, náhrada, snížení
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability – test oční dráždivosti a leptavosti na hovězí rohovce
CAAT	John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing – Centrum pro alternativy k testování na zvířatech Johna Hopkinse
CAM	Chorioalantoidní membrána
CAM-TBS	Chorioallantoic Membrane-Trypan Blue Staining – Test oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya v kombinaci s Trypanovou modří
CAM-VA	Chorioallantoic Membrane-Vascular assay – Vaskulární test oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya
CAS	Chemical Abstracts Services – Registrační číslo
COLIPA	The European Cosmetic and Perfumery Association – Evropské sdružení pro kosmetiku, toaletní potřeby a parfumerii
DMFA	Dimethylformamid
ECHA	European Chemicals Agency – Evropská agentura pro chemické látky
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods – Evropské středisko pro validaci alternativních metod
EIT	Eye Irritation Test – Test oční odraždivosti
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium – kultivační médium
EPA	Food and Drug Administration – Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
EU	Evropská unie
FDA	US Environmental Protection Agency – Americká agentura pro ochranu životního prostředí
FLT	Fluorescein Leakage Test – Test prostupnosti fluoresceinu buněčnou vrstvou
FRAME	Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments – Fond na náhradu zvířat při lékařských pokusech
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution – Hankův balancovaný solný roztok

HCE	Human reconstructed Corneal Epithelium – Rekonstruovaný epitel lidské rohovky
HET-CAM	Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane – Test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods – Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod
ICE	The Isolated Chicken Eye – test oční dráždivosti na izolovaných kuřecích očích
IS	Iritační skóre
IRE	The Isolated Rabbit Eye – test oční dráždivosti na izolovaném oku králíka
IVIS	<i>In Vitro</i> Irritancy Score – <i>in vitro</i> skoré oční dráždivosti
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid
NK	Negativní kontrola
NRU	Neutral Red Uptake assay – test absorpce neutrální červeně
OD	Optical density, optická hustota
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PK	Pozitivní kontrola
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship – predikční metoda pro odhad toxicity
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals – registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
RhCE	Reconstructed human Cornea-like Epithelium – Rekonstruovaný lidský epitel rohovky
SIRC	Statens Seruminstitut Rabbit corneal cell line – Linie buněk králičí rohovky
STE	Short-time Exposure test – Test krátkodobé expozice
TG	Test guidelines – pokyny pro testování
TL	Testovaná látka
UN GHS	The United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals – Globálně harmonizovaný systém OSN pro klasifikaci a označování chemických látek

VUOS	Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Rybitví
WoE	Weight-of-Evidence – Vyhodnocení všech dostupných informací
ZEBET	German National Center for Evaluation and Assessment of Alternative methods – Německé národní středisko pro hodnocení a posouzení alternativních metod

ÚVOD

Oko zpracovává obrazové vjemy přijaté ze svého okolí. Jedná se o velice citlivý a zranitelný smyslový orgán. Při kontaktu s cizorodou látkou se oko dokáže do jisté míry ochránit samo. Mezi nejčastější obranné mechanismy patří slzení, mrkání nebo rozšíření cév. Míra vzniklého poškození při selhání přirozené ochrany oka pak závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky a době jejího účinku. K ochraně před možným kontaktem s nebezpečnou látkou se zavedlo toxikologické testování oční dráždivosti.

První systematickou toxikologickou metodou k zjištění možného potenciálu zkoušených látek způsobit poškození očí byl Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti publikovaný v roce 1944. Testování se provádí na laboratorních albinotických králích. Definované množství látky se aplikuje do jednoho oka zkoušeného biologického modelu a po stanovený čas se sledují změny oční tkáně. Druhé oko zůstává bez aplikace jako kontrolní. Vyhodnocuje se míra poškození oka a případná reverzibilita podráždění.

V druhé polovině minulého století rostla snaha omezit používání laboratorních zvířat u jakéhokoli toxikologického testování. Hlavní body tohoto cíle, mezi které patřilo snížení počtu nebo úplného nahrazení zvířat v testování a zlepšení jejich životních podmínek shrnuje koncepce 3R (Replace, Reduce, Refine). Tyto principy byly začleněny do laboratorních postupů, a současně se staly i základy pro tvorbu alternativních metod.

Většina alternativních metod dokáže simulovat pouze specifickou část z komplexního zvířecího modelu. Při hodnocení oční dráždivost se vývoj těchto testů zaměřuje na vnější části oka vystavené účinkům zkoušených látek. Alternativní testy nejčastěji modelují pouze dvě sledované oblasti, a to rohovku a spojivku.

Cílem diplomové práce je zpracování literární rešerše na zájmovou oblast alternativních testů oční dráždivosti. Účelem první části experimentální práce je ověření nově použité metody na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya v kombinaci s Trypanovou modří na pracovišti VUOS a.s. V další fázi bude test CAM-TBS porovnán s častěji používanou metodou HET-CAM a s mezinárodně validovaným testem BCOP na izolovaných hovězích rohovkách. Výsledné hodnoty z jednotlivých testů budou mezi sebou porovnány. Nakonec bude ověřena citlivost těchto alternativních metod s výsledky *in vivo* testů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historické pozadí testování oční dráždivosti a leptavosti *in vivo*

V první polovině 20. století narostl počet případů, kdy došlo k poškození zraku vlivem použití nedostatečně testovaných kosmetických přípravků. Jejich potenciální nebezpečnost nebyla před uvedením na trh dostatečně kontrolována. Nátlak veřejnosti spolu s médii přiměl vlády po celém světě k úpravám a aktualizaci legislativ ke zlepšení ochrany zdraví osob v soukromé i pracovní oblasti (McCally, 1933; Wilhelmus, 2001).

Vydaná opatření k zajištění bezpečnosti obyvatel států včetně posouzení potenciálu způsobit poškození očí při expozici cizorodými látkami byla deklarována novými zákony, směrnicemi a vládními nařízeními. Dále byly založeny mezinárodní organizace s cílem koordinovat testování a shromažďovat získané informace o stávajících či nových chemických látkách, aby došlo k zamezení kontaktu lidí s látkami ohrožující jejich zdraví. Mezi tyto organizace můžeme zařadit například: Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration), Agenturu pro ochranu životního prostředí (EPA, US Environmental Protection Agency), Organizaci pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development) a další (Kay, 2001; Lebrun et al., 2019; Mancebo et al., 2008; Wilhelmus, 2001).

Počátek systematického toxikologického testování oční dráždivosti a leptavosti cizorodých látek byl spojen s vládní agenturou Spojených států amerických pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Tato organizace byla založena v roce 1906 na základě původního zákona o potravinách a léčivech z téhož roku. Jejím účelem bylo mimo jiné kontrolovat a regulovat již vyrobené produkty. V této době neexistoval státem vymahatelný systém pro schvalování výrobků před jejich uvedením na trh. Bez předepsané ochrany lidského zdraví se mohlo stát, že až používání konečného produktu spotřebitelem ukázalo na jeho toxické vlastnosti (Borchers et al., 2007; Meadows, 2006; Parascandola, 1991).

Aktualizací zákona z roku 1938 o potravinách, lécích a kosmetice, byly zavedeny kontroly bezpečnosti a toxicity pro výrobky a ostatní finální produkty před uvedením na trh. Pravomoc dozorujících úřadů byla v souvislosti s novelou zákona rozšířena a pokrývala všechny tři jeho výše zmíněné složky. Cílem tohoto právního předpisu, bylo zamezit opakování tragických případů (Parascandola, 1991).

Nehod, které měly za následek fatální poškození zdraví, se objevilo více. Před vydáním nového zákona se jednalo například o případ „Lash-Lure“ z roku 1933, kdy dámský kosmetický přípravek pro zvětšení objemu řas způsoboval závažná podráždění a silné alergické reakce zrakového ústrojí, které mohlo skončit až oslepnutím. Tyto problémy způsobovaly deriváty uhelného dehtu obsaženého v přípravku. Jiná toxikologická nehoda byla popsána o 4 roky později. Tragická událost „Elixir Sulfanilamide“ z roku 1937 se týkala farmakologického průmyslu. Na následky inovace v podobě tekutého antibiotika zemřelo 105 pacientů. Důvodem tak velké úmrtnosti bylo použití toxického rozpouštědla ethylenglykolu v podávaném léku. Oboje události spojovala neznalost nebezpečných vlastností používaných látek a chybějící kontrola výrobku před jeho uvedením spotřebiteli (Limonciel, 2014; Wax, 1995; Wilhelmus, 2001).

Toxikologické testování se na laboratorních zvířatech k vyhodnocení potenciálu oční dráždivosti neznámých látek provádělo již od 18. století, ale do roku 1944 chyběla standardizovaná metodika k testování oční dráždivosti a leptavosti. Testování toxických účinků látek bylo potřeba systematizovat a standardizovat. Hlavním důvodem byl stále větší počet nových potencionálně nebezpečných chemických látek. Vytvořením normovaného postupu se začala zabývat organizace FDA, pod vedením, farmakologa J. H. Draize a jeho týmu na oddělení dermální a oční toxicity. Úkolem vybrané vědecké skupiny bylo vyvinout metodu pro testování vedlejších účinků kosmetických přípravků. V roce 1944 byla publikována studie autorů J. H. Draize, G. Woodard a H. Calvery, pod názvem „Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes“ (Metoda pro studium dráždivosti a toxicity látek aplikovaných lokálně na kůži a sliznice). Účelem nové metody bylo posuzování dráždivého potenciálu materiálů a látek, které by se mohly dostat do styku s lidským okem. Nejdříve byly zkoušeny výrobky pro domácnost a pracovní prostředí, zemědělské chemikálie či těkavé organické látky. Testování potenciálu dráždivosti bylo nakonec přijato, jako předprodejní kontrolní metoda pro výrobky, materiály a komponenty k ochraně zdraví cílového spotřebitele (Adler et al., 2011; Draize et al., 1944; Lotz, 2016; Vinardell a Mitjans, 2008; Wilhelmus, 2001).

1.1.1 Draizeho *in vivo* test oční dráždivosti

Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti z roku 1944 se stal prvním mezinárodně uznaným standardizovaným postupem pro testování látek na akutní oční dráždivost. Metoda byla uznána i Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj v roce 1981 pod označením

Test Guideline No.405 Acute Eye Irritation/Corrosion a byla publikována jako součást souboru doporučených metod pro testování chemický látek. Pokyny vydané OECD pro testování oční dráždivosti, jsou pravidelně aktualizovány, aby se zamezilo v co největší míře zbytečnému testování látek na laboratorních zvířatech a zlepšily se jejich životní podmínky (Corvaro et al., 2017; Draize et al., 1944; OECD, 2020a).

Metoda je poměrně jednoduchá a výstupem testování je projev akutní reakce oka králíka na aplikovanou látku, díky které se může vyhodnotit její dráždivý potenciál. K testování jsou nejčastěji využíváni albinotičtí králíci díky jejich vhodné fyziologické stavbě (velké oči), dobře popsané anatomii a relativní ekonomické dostupnosti. Zkoušená látka se aplikuje do spojivkového vaku jednoho oka králíka. Druhé oko je ponecháno bez expozice látkou a slouží jako kontrola při vyhodnocení stupně poškození sledovaného oka. Po aplikaci látky je v pravidelných časových intervalech číselně hodnoceno poškození třech hlavních částí oka – spojivky, rohovky a duhovky. Po skončení testu je vypočteno, dle stupňů poškození oka, celkové skóre podráždění. Původní Draizeho metodika využívala k testování nejméně šest králíků. V průběhu let docházelo k aktualizacím a zlepšení platných testovacích postupů s ohledem na ochranu laboratorních zvířat a jejich pohody. Výsledkem bylo mimo jiné snížení počtu jedinců k testování z původních šesti na tři. Současné testovací strategii oční dráždivosti předepisuje pro první fázi použití jednoho laboratorního králíka. V případě nepřítomnosti nežádoucích reakcí zvířete nebo jeho utrpení je ve druhé fázi test potvrzen na dalších dvou jedincích. Pokud se ukáže látka velice korozivní a dráždivá, tak je test v první fázi ukončen a proveden výplach exponovaného oka. Při přetrvávající extrémní reakci je možné laboratorní zvíře utratit. Díky aktualizaci metodiky testování z roku 2012 jsou laboratorním zvířatům podávána analgetika a anestetika ke snížení bolesti a stresu během toxikologického testu. Monitorování změn probíhá až po dobu 21 dnů od aplikaci látky se zaměřením na podráždění, zarudnutí, otok, krvácení, oslepnutí (trvalé následky), ale také na projevy regenerace jednotlivých tkání a vymizení dočasného poškození oka. Výhodou, oproti prováděným alternativním metodám, *in vivo* testu je možnost sledovat odezvu živého organismu a vyhodnotit míru reverzibility na rohovce, spojivce i duhovce (Barroso et al., 2017; Earl et al., 1997). Výhodou je také možnost hodnocení systémové toxicity po expozici oka neznámou chemikálií (Adriaens et al., 2014; OECD, 2020a). Obecnou nevýhodou prováděných *in vivo* testů jsou etické důvody (Sharpe, 1985). Mezi další v publikacích uváděné nevýhody Draizeho testu oční dráždivosti patří anatomická odlišnost králíčího oka v porovnání s okem člověka, subjektivní hodnocení stupně poškození, neznalost

kompletního mechanismu toxikokinetického účinku, vysoká variabilita výsledků a příliš vysoká dávka cizorodé látky oproti možné expozici u lidí (Davis, 1929; Earl et al., 1997; Freeberg, 1986; Hartung, 2010; Huhtala et al., 2008; Jester et al., 1998; Prinsen a Koëter, 1993; Scott et al., 2010; Wilson et al., 2015).

V současné době lze vidět snižující tendenci v používání *in vivo* toxikologických testů oční dráždivosti k získání základních informací o neznámých a potenciálně nebezpečných látkách. Tyto základní data jsou získávána z literatury a dalších dostupných informací. Následným krokem je využití jedné nebo více vědecky ověřených alternativních metod. Vybrané alternativní zkoušky musí poskytovat informace o chemické látce na stejné úrovni jako *in vivo* testy. Díky novým zákonům, a inovacím postupů toxikologického testování ve státních i soukromých podnicích, došlo u vybraných alternativních metod k validaci. Normované testy se začlenily do kontrolního a regulujícího správního dohledu nad farmaky, chemickými látkami aj. Kosmetický průmysl je důkazem těchto progresivních změn, protože byla přijata legislativa nařizující využití ne zvířecích modelů, ke kontrolám kvality kosmetických produktů a jejich komponent (Adriaens et al., 2014; Lotz, 2016; Saito et al., 2015; Sreedhar et al., 2020; Wilson et al., 2015).

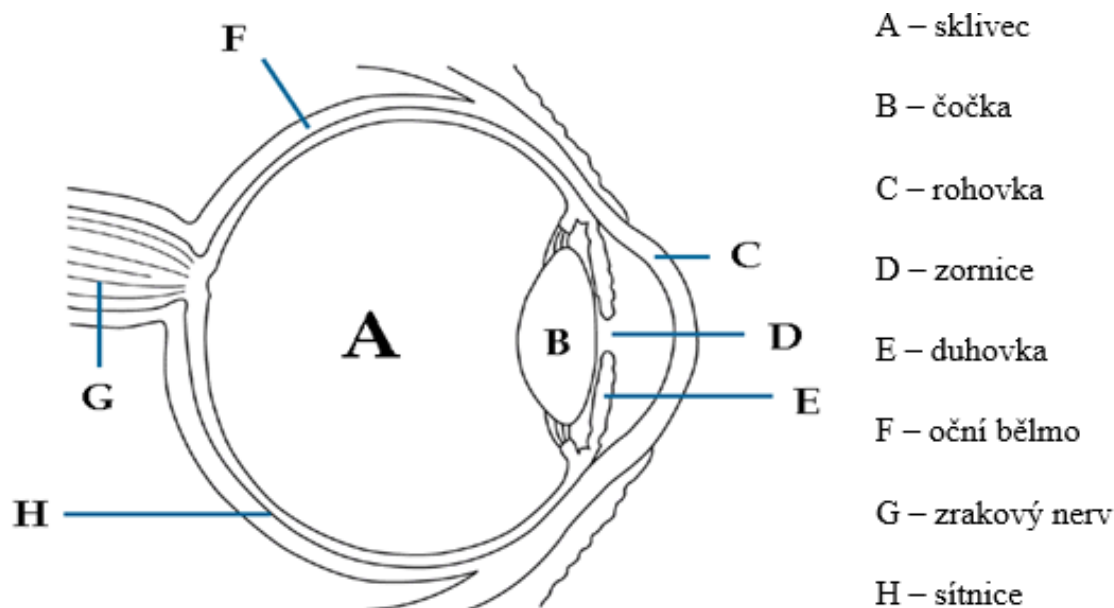
1.2 Lidské oko

Testování oční dráždivosti a toxicity nelze provádět bez dobré znalosti morfologie, anatomie a regeneračních funkcí našeho zrakového orgánu. Díky těmto základním znalostem lze vyhodnocovat různá poškození tkání a změny funkce oka. Mezi nejvíce zranitelné části oka patří rohovka, duhovka a spojivka (Burton, 1972; Jose et al., 2018; Sebastian, 2010; Secchi a Deligianni, 2006).

Vnímání okolního světa je možné díky smyslovým orgánům. Lidský zrak funguje díky řadě provázaných a na sebe navazujících biochemických a biofyzikálních reakcí. Zrakové ústrojí je párový orgán zajišťující prostorové vidění, vnímání barev a světla, usnadnění pohybu v prostoru a také zprostředkovává percepci největšího množství informací o podobě okolí. Jedná se o nejdůležitější a nejzranitelnější lidský smyslový orgán (Awwad et al., 2017; Kels et al., 2015; Mulvey, 2012).

Paprsek světla nejdříve projde přes rohovku a duhovku. Součástí duhovky je zornice, která dokáže za pomoci svalů reagovat na sílu přijatého záření. Paprsky dále pokračují k čočce, která je zaostří a směřuje na sítnici, kde vyvolá chemickou přeměnu

ve fotoreceptorech (tyčinky a čípky). Světločivé oční buňky za pomoci nervového vzruchu vyšlou zrakovým nervem odpovídající impuls do mozku. Zabránění rozptylu dopadajícího světla je docíleno dokonalou průhledností všech částí oka, kudy prochází sluneční paprsky (Eghrari et al., 2015; Grossniklaus et al., 2015; Hoon et al., 2014; Malhotra et al., 2011; Sebastian, 2010; Synek a Skorkovská, 2014). Anatomie oční koule s popisem vybraných částí optického systému oka je zobrazena na obrázku 1.



Obrázek 1 - Schématické znázornění anatomie oční koule – horizontální řez (upraveno z: https://www.wikiskripta.eu/w/Optick%C3%BD_syst%C3%A9m_oka)

1.2.1 Oční dráždivost – důvody, mechanismy, důsledky

Potenciál oční dráždivosti u chemických, farmaceutických nebo kosmetických přípravků je velice důležitým bodem bezpečnosti. V oblasti toxikologie oka je sledována zejména rohovka, duhovka a spojivka. Míra poškození zraku vnějším činidlem závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je fyzikální forma (kapalina, pevná látka, gel), rozpustnost, pH, molekulová hmotnost, ionizační potenciál či rozpustnost ve vodě (Akpek a Gottsch, 2003; Cunha-Vaz, 1979; McNamee et al., 2009).

Oko je neustále vystaveno vlivům prostředí, z toho důvodu je náchylné k mechanickému nebo chemickému poškození. Stupeň poškození je velice variabilní a záleží na mnoha faktorech, může se jednat o malé oděrky reverzibilního charakteru až o úplnou ztrátu zraku (Lemp a Blackman, 1981; McClellan, 1997; Shaw et al., 1991).

Při interakci se spouští ochranné mechanismy oční koule: zvýší se vylučování slz nebo se rozšíří cévy, aby se snížila přítomnost cizorodé látky v oblasti oka. Při přetrvávajícím podráždění se zvyšuje dilatace cév, dochází k otoku spojivky, snižuje se reakce na světlo spolu s funkcí očních víček atd. Poškození je klasifikováno dle vzniklé reakce oka na testovanou látku (Barar, 2006; Bito, 1984; Mousa et al., 2021) například takto:

- Nedráždivá látka

Látka nezpůsobující žádné poškození oční tkáně (Nařízení komise (EU) č. 1152/2010, 2010).

- Látka s dráždivými účinky

Způsobuje podráždění přetrvávající 24 hodin. Důsledkem je zánětlivé, ale reverzibilní poškození oka (Nařízení komise (EU) č. 1152/2010, 2010; Vega a Fong, 2001).

- Látka se silně dráždivými účinky

Chemická látka způsobující silné poškození oka, které je nevratné po předepsanou dobu 21 dní ke sledování reverzibility reakce nebo závažné poškození zraku (Nařízení komise (EU) č. 1152/2010, 2010; Vega a Fong, 2001).

- Látka s leptavými účinky

Způsobuje nevratná poškození, z důvodu zničení tkání oka (Nařízení komise (EU) č. 1152/2010, 2010; Vega a Fong, 2001).

Zobrazení a popis exponovaných částí oka, které jsou hodnoceny při toxikologickém testování oční dráždivosti, jsou zvýrazněny na obrázku 2.

1.2.1.1 Rohovka

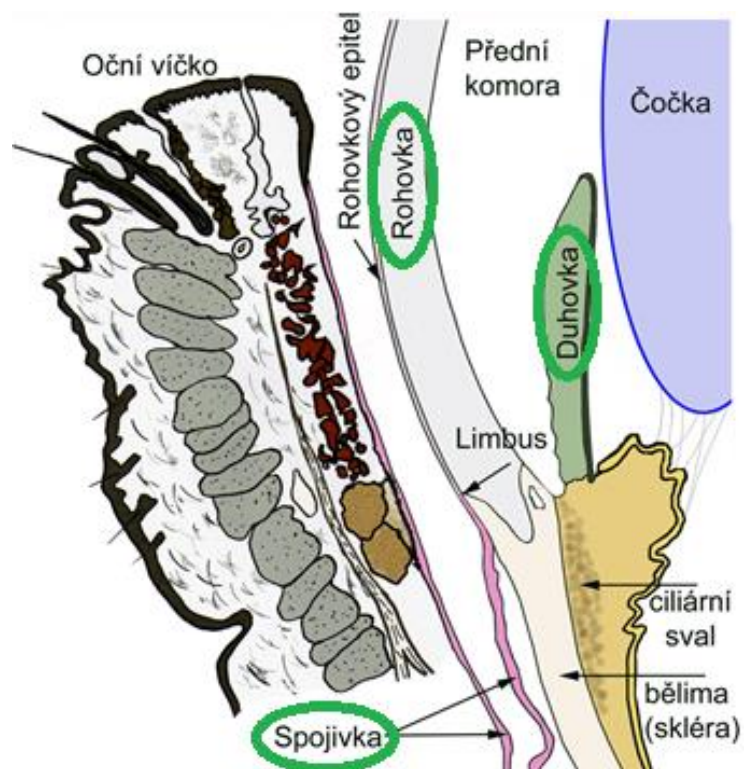
Rohovka je průhledná tkáň zajišťující snadný průchod slunečních paprsků a také první přirozená biologická ochranná bariéra oka. Svrchní část je tvořena rohovkovým epitelem se schopností regenerace. Při menším podráždění většinou bývá poškození vratné a dojde k úplnému uzdravení oka. Vyhojení rány proběhne překrytím novými buňkami, popřípadě přeskupením stávajících. Při větším poškození a zasažení hlubších vrstev může být reakce ireverzibilní bez možnosti vyléčení (ztráta průhlednosti rohovky aj.). Následkem je trvalé poškození zraku až slepota (Akpek a Gottsch, 2003; Mousa et al., 2021; Wilson, 2020).

1.2.1.2 Duhovka

Duhovka se nachází v prostoru za rohovkou. Jedná se o barevnou a bohatě prokrvenou část okolo zornice regulující průchod světla. Její podráždění způsobí rozšíření či poškození vlásečnic a otok. Výsledkem je snížení reakce zornice na vstupující světlo. Vlivem zhoršené regulace může dojít k poškození zraku (Malhotra et al., 2011; Sebastian, 2010; Unger et al., 1981).

1.2.1.3 Spojivka

Spojivka je citlivá a bohatě prokrvená tkáň nacházející se zejména na vnitřní straně víček. Zprostředkovává zvlhčení oka (produkuje hlen) a plní imunitní funkci. Při mechanickém či chemickém podráždění dojde k dilataci nebo narušení vlásečnic, opuchnutí, zarudnutí a zánětu. Podráždění je ve většině případů reverzibilní a nedojde k trvalému poškození zraku (Dua, 1998; Nichols et al., 1983; Synek a Skorkovská, 2014).



Obrázek 2 - Sledované části lidského oka (upraveno z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Rohovka>)

1.3 Hnutí proti toxikologickému testování na laboratorních zvířatech

Zvířata byla využívána k pokusům a testování v různých oborech od antického Řecka. Historicky se toxikologické testování stalo běžnou a ustálenou formou předběžné kontroly k ochraně lidského zdraví, kdy se zvyšujícím počtem provedených testů rostlo i množství použitých laboratorních zvířat. Důvodem tohoto nadužívání byly jednostranně zaměřené testy, používání velkého počtu jedinců a chybějící legislativa k ochraně zvířat spolu s nedostatkem validovaných alternativních metod. Postupný nesouhlas k využívání laboratorních zvířat k pokusům rostl úměrně se zájmem lidí o svobodu zvířat. Tento jev moderní vyspělé společnosti byl hlavně založen na etickém soucítění s laboratorními jedinci a nesouhlasem s jejich utrpením (Aaltola, 2011; Callicott, 1988; Stephens a Mak, 2013).

V druhé polovině dvacátého století rostl odpor proti pokusům na zvířatech díky vydané publikaci pod názvem „Animal Liberation“ (Osvobození zvířat) v roce 1975, jejímž autorem je australský filozof Peter Singer, která říká, že je zvířatům připisována nižší hodnota na základě příslušnosti k jinému druhu. Tato filozofická teze se stala jedním ze základů pro hnutí za práva zvířat. V tomto pokračoval a roku 1983 publikoval americký filozof Tom Regan knihu s názvem „The Case for Animal Rights“ (Případ pro práva zvířat), kde je zpochybňováno použití zvířat k výzkumným účelům. Respektování dobrých životních podmínek všech zvířat by mělo být absolutní morální hodnotou, která by šla porušit pouze v extrémních případech, jako je sebeobrana (Benthall, 2007; Callicott, 1980; Franco, 2013; Jamieson, 1998).

Na základě těchto publikovaných děl vznikl jak v laické, tak akademické společnosti nový termín „etika zvířete“ a s ním další etické pohledy na zvířata, včetně laboratorních, a našich povinností vůči nim (Franco, 2013).

1.4 Historie a základy alternativního toxikologického testování oční dráždivosti

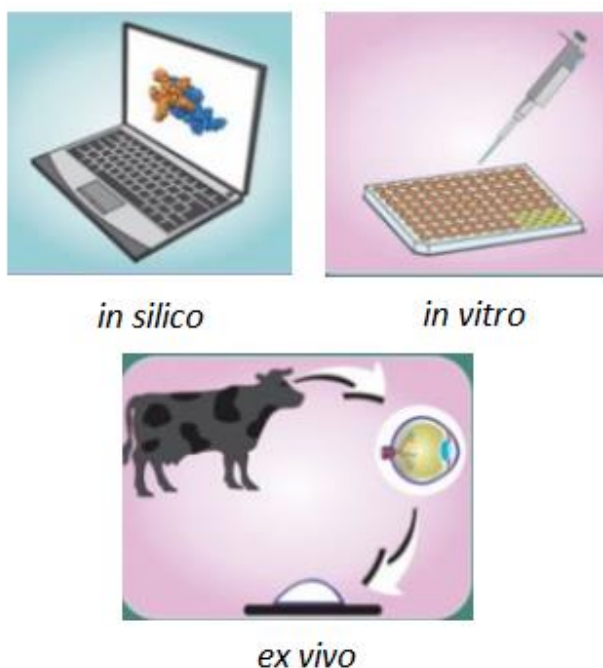
Dvacáté století bylo dobou nových objevů a velkých pokroků v medicíně, farmacii a obecně i v oblasti ochrany lidského zdraví, které prokazatelně vedly ke zvýšení lidské životní úrovně. Progresivním vývojem procházela také i toxikologická testování v oblasti oční dráždivosti. Docházelo k aktualizaci a vylepšení stávajících postupů. Začaly se také vyvíjet a aplikovat nové alternativní metody nahrazující z části anebo zcela existující testy na zvířatech (Franco, 2013; Saito et al., 2015; Stephens a Mak, 2013).

1.4.1 Koncepce „3R“

V roce 1959 publikovali Russel a Burch filozofickou studii, ve které pozorovali biologické experimenty. Na základě sledovaných úrovní bolesti, strachu a trvalých následků testovaných zvířat klasifikovali některé tyto pokusy za nehumánní. Výsledkem byl vznik třech principů etické laboratorní práce se zvířaty neboli „3R“, jako základ pro alternativní metody, publikovaný v roce 1959 pod názvem „The principles of humane experimental technique“ (Principy humánní experimentální techniky) od autorů W.M.S. Russella a R.L. Burcha (Russell a Burch, 1959). Zkratka „3R“ se skládá ze tří anglických slov replace, reduce, refine neboli nahradit, snížit, zjemnit a stala se základním stavebním kamenem pro vylepšení a tvorbu nových toxikologických alternativních metod (Lee et al., 2012; Lotz et al., 2018; Russell a Burch, 1959; Wilson et al., 2015).

1.4.1.1 Replace – nahradit laboratorní zvířata

Nahradit lze zvířata nižšími organismy nebo rychle se vyvíjejícími metodami *in vitro*, *ex vivo* anebo *in silico* a to jak z části tak v některých případech i úplně (přehled metod je uveden na obrázku 3). Tohoto principu je využíváno hlavně v první fázi toxikologického testování, kdy nejsou známy dráždivé vlastnosti studované látky. Pokud by se látka prokázala jako dráždivá, na laboratorních zvířatech se dále netestuje (Badyal a Desai, 2014; Sharma et al., 2011).



Obrázek 3 – Ukázka vybraných alternativních výzkumných modelů
(upraveno z: doi:10.38125/OAJBS.000197)

- *In silico* testovací modely

Jako vědecký výraz byl testovací model *in silico*, tak jak ho známe nyní, poprvé popsán v roce 1989 při experimentech prováděných výhradně na počítači. *Silico* původně odkazovalo na chemický prvek křemík (*silicium*), hlavní součást počítačových obvodů. Dnes se jedná o velice progresivní a rychle rozvíjející se odvětví využívající digitálních technologií k simulaci konkrétních procesů (na obrázku 3 je znázorněn model makromolekuly). Výpočetní technika je také úspěšně využívána při predikci toxicity chemických látek nebo návrzích nových léků, kde se díky počítačové modelaci šetří čas a zdroje. (Idakwo et al., 2018; Myatt et al., 2018; Scotti et al., 2018).

Počítačové techniky využívají software k analýze dat, který zahrnuje výpočetní modely nebo simulace založené na existujících informacích o vlastnostech a chování zájmových látek. Výsledkem jsou předpovědi a navržené hypotézy použitelné jako základ pro modely *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* (Ekins et al., 2007a; Ekins et al., 2007b; Zhou et al., 2016).

Příkladem je model QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship), predikční metoda pro odhad toxicity, která dokáže statisticky zhodnotit soubor dat a ukázat možné vztahy mezi chemickou stavbou a biologickou aktivitou neznámé látky (Benfenati, 2013).

- *In vitro* testovací modely

In vitro neboli „ve skle“ je vytvořený model, k testování mimo živý organismus (např.: na obrázku 3 je zobrazena 96jamková destička). Výhodou této metody je dobře kontrolované prostředí. *In vitro* techniky se často používají v oborech biologie, klinické medicíny či toxikologie. Biologickým modelem je nejčastěji buněčná linie nebo uměle vyrobená tkáň. Příkladem je tkáňový model EpiOcularTM RhCE (Reconstructed human Cornea-like Epithelium). Jedná se o uměle vyrobený rekonstruovaný lidský rohovkový epitel, jehož histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti simulují rohovku lidského oka. Dřívější ekonomická výhodnost *in vitro* metod k toxikologickému testování, již není vždy pravdivá, protože řada modelů i mnohonásobně převyšuje cenu jednoho laboratorního zvířete (OECD, 2019; Oliveira et al., 2020; Pearson, 1986).

Použití nového *in vitro* testu jako alternativy k metodě *in vivo* lze pouze po důkladném posouzení a ověření spolehlivosti. Specificita daného testu je ověřena za pomoci nezávislých vědeckých studií (Griesinger et al., 2016; Oliveira et al., 2020).

- *Ex vivo* testovací modely

Ex vivo znamená „mimo živé“. Jedná se o testování na živých buňkách nebo tkáních odebraných z organismu a umístěných do vnějšího prostředí za kontrolovaných podmínek. Tato modifikace tedy částečně vyřešila etický problém ohledně toxikologického testování *in vivo*. Mezi často prezentovaná využití *ex vivo* modelu v oblasti oční dráždivosti se řadí testování na izolovaných hovězích rohovkách BCOP TG. 437 (Bovine Corneal Opacity and Permeability), které je doporučováno směrnicí Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj jako náhrada *in vivo* toxikologického Draizeho testu oční dráždivosti a leptavosti. Schématické znázornění postupu izolace hovězí rohovky k testování oční dráždivosti metodou BCOP je uvedeno na obrázku 3 (Dusinka et al., 2017; Gregory-Evans et al., 2012; OECD, 2020b; Snijder et al., 2017; Tacke et al., 2007; Wilhelmus, 2001).

1.4.1.2 Reduce – snížit počty zvířat nezbytných pro zkoušku

Snížení počtu pokusných zvířat v testování nesmí mít vliv na kvalitu výsledků prováděné studie. Toho lze dosáhnout dobrou přípravou plánu experimentu. Příkladem je využití jednoho testovaného organismu k více si navzájem nekonkurujících testů najednou. Dalším bodem je zamezení kontraproduktivního opakování již udělaných pokusů, k tomu by mělo pomáhat sdílení výsledků, použití nejlepších dostupných metod a technik a kvalitní příprava spolu s odborným vyhodnocením získaných výsledků z testování (Hendriksen, 2014; Schechtman, 2002; Vandebriel a Loveren, 2010).

1.4.1.3 Refine – zjemnit laboratorní toxikologické postupy

Jedná se o zdokonalení toxikologických postupů ke snížení stresu a bolesti laboratorních zvířat. Důvody k tomuto kroku jsou jak etické a je myšleno na jejich základní práva, tak i vědecké. Zvíře ovlivněné stresem dokáže do jisté míry zkreslit výsledky experimentu vlivem fluktuace hormonální hladiny. Proto jsou zvířatům vytvořena co nejlepší životní podmínky a testování je možné pod mírnou sedací. Výsledkem je klidnější prostředí pro laboratorní zvíře a zpřesnění výsledků testování díky omezení stresových faktorů a aktuálních laboratorních technik (Liebsch et al., 2011; Lloyd, et al. 2008).

1.4.2 Přínosy koncepce „3R“

Výše zmíněné a blíže popsané tři typy (replace, reduce, refine) alternativních postupů se vzájemně nevylučují. Testem *in vitro* lze nahradit testování na zvířatech pro určité druhy testovaných látek. Pokud však danou *in vitro* metodu použijeme v kontextu víceúrovňové

testovací strategie stává se z ní alternativa ke snížení počtu využitých zvířat. Tento postup umožňuje rozpoznat toxickou látku hned v první fázi testování. Při dodržení této strategie jsou ušetřena laboratorní zvířata (Kandárová a Letašiová, 2011; Russell a Burch, 1959).

Koncepce „3R“ poskytla strategii pro racionální a postupný přístup k minimalizaci utrpení, stresu a používání zvířat při experimentech. Nové přístupy nesmí ohrozit kvalitu a výsledky prováděné vědecké výzkumné práce. Od té doby byla vyvinuta řada alternativních metod pro hodnocení potenciálních toxických účinků chemických látek. Použití zvířat ve výzkumu a testování se nyní řídí základními principy – nahradit, snížit, zjemnit – nejen na území Evropské unie (EU) (Spielmann et al., 2008; Stokes, 2015; Törnqvist et al., 2014).

1.5 Proces ověřování alternativních metod

Proces validace zajišťuje novým alternativním metodám vyvinutým akademickými nebo vývojovými pracovníky ověření platnosti postupu a použitého modelu. Validované metody jsou například vyžadovány při tvorbě toxikologických podkladů dle nařízení REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registrace, hodnocení, autorizace a omezování chemických látek) pro shromažďování a hodnocení údajů o vlastnostech látek nových, vyrobených, importovaných nebo používaných na území Evropské unie. Agentura odpovědná dohledem nad možnými riziky chemických látek dle platného nařízení REACH je Evropská agentura pro chemické látky (ECHA, European Chemicals Agency) (Lilienblum et al., 2008; Worth a Balls, 2002).

Validací testovací metody založené na vědecky podložených principech se stanovuje spolehlivost a relevance konkrétního testu, přístupu, metody nebo procesu pro daný účel (Ingre-Khans et al., 2019; Kase et al., 2016).

- Spolehlivostí se definuje míra reprodukovatelnosti výsledku testu v laboratoři v porovnání s ostatními pracovišti, kde byl experiment prováděn podle stejného standardizovaného protokolu (Kaltenhäuser et al., 2017; Roth a Ciffroy, 2016).
- Relevantnost zkušební metody popisuje, zda je testování schopno splnit svůj účel neboli do jaké míry experiment dokáže měřit a predikovat sledovaný účinek (Kaltenhäuser et al., 2017; Roth a Ciffroy, 2016).

Všechny nové a aktualizované testovací modely (*in vivo*, *in vitro*, aj.) musí splňovat podmínky spolehlivosti a relevance. Kontrolní validační kritéria nových toxikologických zkušebních metod byla vyvíjena za pomoci vědeckých pracovníků spolu s regulačními orgány

od počátku 80. let 20. století pod záštitou tří organizací: Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD), Evropským střediskem pro validaci alternativní metod (ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods) a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). Z důvodu globální standardizace požadavků na harmonizaci validačních kritérií bylo dále spolupracováno s externími odborníky a s národními organizacemi jako je například Fond na náhradu zvířat při lékařských pokusech (FRAME, Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments), Německé národní středisko pro hodnocení a posouzení alternativních metod (ZEBET, German National Center for Evaluation and Assessment of Alternative methods) a Centrum pro alternativy k testování na zvířatech Johna Hopkinse (CAAT, John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing) (Balls et al., 1990; Dickens et al., 1993; Ingre-Khans et al., 2019; Kandárová a Letašiová, 2011).

Nejčastěji se využívají dva typy validačních studií, prospektivní a retrospektivní. Základním rozdílem je, že prospektivní studie zahrnuje tvorbu nových dat, zatímco retrospektivní studie se zabývá přehodnocováním informací stávajících. Typická prospektivní studie validace je složena z 6 fází a může trvat cca 10 až 25 let. První fáze je založena na výzkumu a pochopení základních biologických a toxických mechanismech. Poté je vyvinuta nová alternativní metoda pro konkrétní aplikaci či účel (do experimentu je zapojena jedna laboratoř). Třetí fáze je prevalidace, ve které je prováděna optimalizace protokolu ve dvou a více laboratořích. Na to navazuje validace metody a stanovení spolehlivosti a relevance (se zapojením tří a více pracovišť). V páté fázi je metoda nezávisle vědecky posouzena. V poslední fázi regulační agentura rozhoduje o přijetí konkrétní aplikace. Bezproblémový mezifázový posun vpřed není nikdy zajištěn. Kdykoli může být provedený výzkum vrácen o jednu nebo více úrovní níže k přezkoumání. Naopak retrospektivní studie se obvykle omezuje na vyhodnocení údajů předložených v doporučené a standardizované formě požadované konkrétní organizací provádějící hodnocení (Balls et al., 1990; Corvi et al., 2008; Curren et al., 1995; Hartung et al., 2019; Kandárová a Letašiová, 2011).

1.6 Základní postupy víceúrovňového testování k posouzení podráždění očí

Víceúrovňové testování, standardizace a validace metod a hodnocení rizik jsou koncepty, které musí být neustále aktualizovány, aby se přizpůsobily kontinuálně velkému přísunu chemikálií a nových metod. Postup víceúrovňového testování závisí na systematické

posloupnosti seřazených úrovní použitých ve strategii testování. V literatuře často prezentovanou strategií je takzvaný rozhodovací strom (Barile, 2010; Ko et al., 2020).

Rozhodovací strom pro posouzení nebezpečnosti podráždění očí je stupňovitý interaktivní přístup založený na řadě kroků. V tomto postupu jsou zohledněny jak *in vitro* testy potvrzené regulačními orgány taky i ty, které jsou popsány v odborné literatuře a na základě zkušeností jsou vhodné pro dané víceúrovňové testování. Potvrzené metody musí splňovat dostatečnou kvalitativní a prediktivní kapacitu pro hodnocení nežádoucích reakcí specifických tříd chemických látek zapojených do posouzení nebezpečnosti (Balls et al., 2019; McNamee et al., 2009; Saliner a Worth, 2007). Jednotlivé úrovně rozhodovacího stromu pro identifikaci nebezpečných látek jsou následující:

První úroveň: Proveďte se WoE (Weight-of-Evidence) vyhodnocení všech dostupných informací včetně například fyzikálně-chemických vlastností, historických údajů z testování na zvířatech (*in vivo*) nebo metodou *in vitro* a analogické studie k jiným strukturně podobným chemickým látkám se známým potenciálem podráždění očí. Výstupem analýzy vstupních dat by mělo být určení, zda je neznámá látka žíravá pro kůži. Pokud ano, tak se látka považuje za žíravou pro kůži a zároveň i za silně dráždivou/leptavou pro oči. Jestliže toto vyhodnocení není potvrzené a neznáme přesné vlastnosti a chování látky, považujeme ji stejně za silně dráždivou/leptavou jako předpoklad nejhoršího případu. Poté je pokračováno v další fázi posouzení bezpečnosti (Hardy et al., 2017; Macfarlane et al., 2009; McNamee et al., 2009; OECD, 2002; Saliner a Worth, 2007).

Druhá úroveň: Jsou provedeny testy na organotypických modelech k potvrzení nebo vyvrácení potenciálu dráždivosti zkoušených látek pro oči. Možné modely k tomu využívané se řadí mezi *in vitro* a *ex vivo* metody. Pokud výsledek experimentu prokáže potenciál oční dráždivosti, je potvrzena hypotéza z první úrovně testování. Jestliže je výstup nejednoznačný a mohly by vzniknout pochyby o zařazení látky je testování posunuto na poslední úroveň (Barile, 2010; OECD, 2002; Prinsen, 1996; Saliner a Worth, 2007).

Třetí úroveň: Za pomoci *in vitro* testů oční dráždivosti a leptavosti (pro mírnou až střední dráždivost) je zjišťováno, jak moc velkým iritantem je neznámá látka pro oko. Výběr vhodné metody je podřízen zisku kvalitních podkladových informací, proto je nutné použít co nejpřesnější dostupný model pro vyhodnocení dráždivých vlastností daných látek. Výsledek testu spolu s analýzou WoE rozhodnou o tom, zda je látka dráždivá či nedráždivá (Barile, 2010; McNamee et al., 2009; OECD, 2002; Saliner a Worth, 2007).

1.7 Alternativní toxikologické testy

Na přelomu století odhadovalo Evropské centrum pro validaci alternativních metod (ECVAM) existenci přibližně 70 různých alternativních metod pro hodnocení potenciálu oční dráždivosti. Vyvinuté postupy testů a zkoušek lze rozdělit do několika kategorií například na základě počítačových modelů s analýzou vztahu mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Další skupinou může být sledování toxicity na rostlinách a mikroorganismech nebo testy na organotypických modelech aj. Většina alternativních metod je vhodná pro klasifikaci určitých kategorií chemických látek a ve specifických mezích hodnocení oční dráždivosti. Používaná klasifikace oční dráždivosti je velice široká, cizorodá látka může být nedráždivá, středně dráždivá až korozivní. Postupy a aktuální strategie v testování jsou schopny velice dobře popsat extrémní oční dráždivosti, kdy je látka bezpečná nebo naopak silně dráždivá. Citlivost ke zjištění hodnot průměrného poškození má jen velice málo metod. Pro tuto oblast jsou nejčastěji využívány souběžné testy na více metodách, které zpřesňují získané výsledky. Mezi často publikované postupy alternativního toxikologického testování oční dráždivosti patří test na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya (HET-CAM), test na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya obarvené Trypanovou modří (CAM-TBS, Chorioallantoic Membrane – Trypan Blue Staining), test na izolovaných hovězích rohovkách (BCOP), test na izolovaném kuřecím oku (ICE, The Isolated Chicken Eye), test na izolovaném králičím oku (IRE, Isolated Rabbit Eye) nebo test na uměle vyrobeném 3D modelu lidské rohovky (EpiOcular™ RhCE, Reconstructed human Cornea-like Epithelium) (Barile, 2010; Bas, 2021; Brantom et al., 1997; Kaluzhny a Klausner, 2021; Ko et al., 2020; LeClaire a de Silva, 1998; Zuang et al., 2019).

Vzhledem k tématu a povaze diplomové práce bude podrobněji popsán test na izolovaných hovězích rohovkách a variace testů využívající bohatě prokrvenou chorioalantoidní membránu kuřecího embrya (HET-CAM; CAM-TBS a CAM-VA, Chorioallantoic Membrane – Vascular assay) (Dholakiya a Barile, 2013).

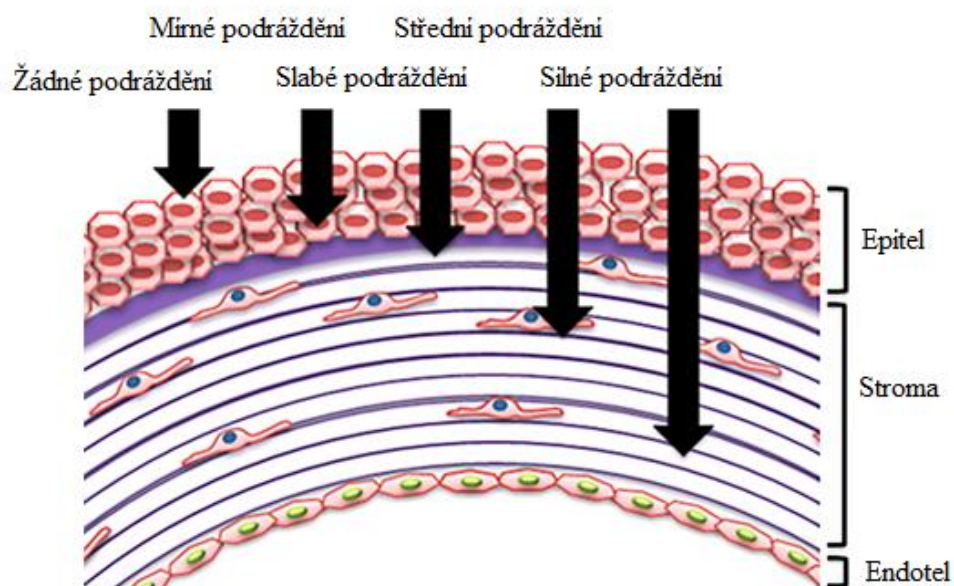
1.7.1 Organotypické metody – izolované enukleované orgány

Oční organotypické modely jsou řazeny k *ex vivo* toxikologickým alternativním metodám. Jedná se o izolované systémy, jejichž cílem je udržet po krátkou dobu, řádově několik hodin, některé normální fyziologické a biochemické funkce oka nebo separované rohovky z hovězího dobytka, prasat, králíků nebo kuřat. Oproti Draizeho testu oční dráždivosti využívajícího k výsledné hodnotě podráždění očí mimo rohovky ještě údaje

ze spojivky a duhovky, je schopné testování enukleovaných očí získat pouze údaje z reakce rohovky. Specifická testovaná oblast na druhou stranu podává kvantitativní hodnocení zákalu a otoku rohovky, které je využito ke zvýšení spolehlivosti prováděných experimentů díky mezilaboratornímu porovnání získaných hodnot (Barile, 2010; Casterton et al., 2008; Ubels a Clousing, 2005; Wilson et al., 2015).

Metody jsou prováděny obvykle za pomoci opacitometrických a spektroskopických technik hodnotící změny na izolované rohovce po expozici s neznámou látkou. Sledovaným projevem podráždění oka je mimo jiné zákal rohovky, který značí vakuolizaci a poškození epitelu a stromatu. Potenciál dráždivosti látek je závislý na míře jejich toxicity. Mírně dráždivé látky obecně poškozují povrchový epitel rohovky, středně dráždivé látky mohou dosáhnout až stromatu a nakonec silně dráždivé látky proniknou rohovkou a jsou schopny nevratně poškodit epitel. Míra prostupnosti látek rohovkou je uvedena na obrázku 4 (Cooper et al., 2001; Gautheron et al., 1992; Jester et al., 2001; Wilson et al., 2015).

Při hledání nových vhodných metod, které by dokázaly reflektovat *in vivo* výsledky z králičího oka, se ukázala jako nejjednodušší varianta použití očí zvířat, které byly buď součástí jiného vědeckého účelu nebo jatečná zvířata. Tato oblast alternativního testování je zaměřena na rohovkovou tkáň bez možnosti sledování zánětlivé reakce, reverzibility či systémové toxicity po aplikaci neznámé látky. Připravené tkáně jsou vloženy do speciálních držáků, které simulují přirozené biologické, fyziologické a biochemické vlastnosti oka po celou dobu experimentu. K vyhodnocení testu jsou monitorovány změny zákalu (opacity) a propustnosti (permeability) po působení testované látky na rohovku. Z výše uvedených alternativních toxikologických postupů pro určení potenciálu oční dráždivosti byly na základě doporučení ECVAM zahrnuty mezi validované procesy OECD pod označením testovacích směrnic (TG, test guidelines) 437 a TG 438 metody na izolovaných hovězích rohovkách (BCOP), respektive na izolovaném kuřecím oku (ICE). Vybraným a níže popsaným testem oční dráždivosti je TG 437 – BCOP (Cazedey et al., 2009; Chamberlain et al., 1997; Cooper et al., 2001; OECD, 2020b; OECD, 2018; Prinsen et al., 2017; Rowan, 1984; Van der Berghe et al., 2005; Verstraelen et al., 2013).



Obrázek 4 - Charakteristické míry potenciálu poškození při expozici toxickou látkou (upraveno z: doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003)

1.7.1.1 Zkouška na izolovaných hovězích rohovkách

Test neprůhlednosti a propustnosti hovězích rohovek (BCOP) byl vyvinut v 90. letech minulého století. V roce 2009 byla tato metoda publikována a schválena Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, aktualizace a přezkoumání bylo provedeno v roce 2020. Test zkoumá působení testované chemikálie na rohovku. Vysokou přesnost identifikace dosahuje tato metoda u silně dráždivých látek. Poškození u nich většinou prostupuje až do hlubších vrstev tkáně – endotelu. Opakem jsou mírně dráždivé látky, které se zpravidla projevují již na povrchu endotelu. Tím je jejich identifikace méně přesná. Výsledky takových experimentů je možné specifikovat pomocí histologického vyšetření exponované rohovky. Výsledné hodnoty jsou srovnatelné s Draizeho testem oční dráždivosti díky analogii s bodovacím vyhodnocovacím systémem. Mechanismy ovlivňující celkový výsledek jsou například makroskopická a mechanická poškození způsobená testováním pevných materiálů či vyšší četnost falešně pozitivních výsledků při provádění testů na ketonech a alkoholech (Cazelle et al., 2014; Eskes et al., 2017; Gautheron et al., 1992; Gordon, 2015; Hagino et al., 1999; Jester et al., 2001; Kolle et al., 2019a; Kolle et al., 2019b; Schrage et al., 2019; Vanparys et al., 1993; Wilson et al., 2015).

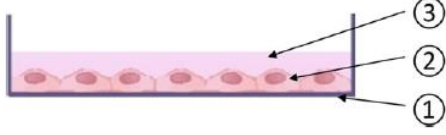
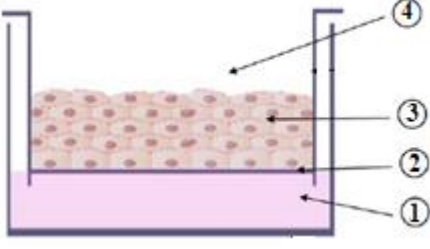
Metoda BCOP je založena na modifikovaném biologickém modelu udržující po krátkou dobu biologické, fyziologické a biochemické vlastnosti izolovaných hovězích rohovek. Jedná se o průhlednou tkáň, která je hlavním refrakčním prvkem v optické dráze pro průchod světla čočkou k sítnici (Barile, 2010; Gautheron et al., 1992).

Hovězí oči jsou získávány z mladých jatečních zvířat jako vedlejšího produktu při zpracování masa pro lidskou spotřebu. Po převozu do laboratoře jsou rohovky opatrně vypreparovány a zkontrolovány na makroskopické poškození. Poté následuje kontrola tloušťky rohovky, úrovně primárního zákalu a případných dalších mechanických poškození. Nevyhovující separované tkáně jsou vyloučeny z testování a zbytek je umístěn do speciálních držáků simulující spolu s kulturačním médiem EMEM (Eeglovo minimální esenciální médium) prostředí oka. Testované látky mohou být aplikovány na povrch biologického modelu jak v pevné formě, kdy musí být pokryt celý epitel rohovky anebo o přesně daném objemu 750 μ l, který je dán pro kapalné vzorky. Vyhodnocení probíhá za pomoci empiricky odvozeného vzorce IVIS (*In Vitro* Irritancy Score) na základě změření změn opacity a permeability po expozici testovanou látkou. Zákal rohovky je hodnocen opacitometrem, jehož principem je měření množství průchodu světla. Druhou monitorovanou změnou je spektrofotometricky vyhodnocovaná permeabilita fluoresceinu sodného rohovkou. Dráždivost látek použitých v experimentu se projevuje jak celkově vysokým skóre IVIS, tak i v průběhu testování, kdy dojde ke snížení propustnosti světla a zvýšení permeability barviva fluoresceinu sodného skrz testovací model (Bhasker et al., 2015; Casterton et al., 2008; Maurer et al., 2002; OECD, 2020b; Verstraelen et al., 2018).

1.7.2 Buněčné linie, kultury a tkáně – 2D a 3D modely

V oblasti oční dráždivosti a leptavosti, je poškození rohovkové tkáně považováno za kritické rozhodovací kritérium. Z tohoto důvodu byly vyvinuty další druhy testovacích modelů k rozpoznání toxicity látek při kontaktu s rohovkou. Mimo již výše zmíněných *ex vivo* metod, je možné klasifikovat potenciál dráždivosti látek i na jednodušších či stavebně složitějších buněčných liniích nahrazující buňky rohovky. Orientační schéma a srovnání vybraných a dále blíže popsanych charakteristických 2D a 3D modelů je uvedeno v tabulce 1 (Huhtala et al., 2008; Kaluzhny a Klausner, 2021; Maurer et al., 2002).

Tabulka 1 - Ukázka biologických modelů rohovkového epitelu (Kaluzhny a Klausner, 2021)

	2D – jednovrstevný model buněčné linie	3D – rekonstruovaný model rohovkového epitelu
Schéma modelu		
Popis	<p>1 Neporézní podpora buněčné kultury</p> <p>2 Monovrstva buněk</p> <p>3 Médium</p>	<p>1 Médium</p> <p>2 Podpurná porézní membrána</p> <p>3 Vícevrstvá epiteliální tkáň</p> <p>4 Povrchová vrstva epitelu</p>
Příklady testovacích modelů	<p>Primární buňky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Normální lidské epiteliální buňky rohovky (NHCE, Human Corneal Epithelial Cells); • Lidské endoteliální buňky rohovky (HCEC, human corneal endothelial cells); • Limbální buňky (Limbal cells). <p>Buněčné linie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lidské epiteliální buňky rohovky (HCE-T, Human corneal epithelial cells); • Keratinocytové buňky (HaCaT keratinocyte cells); • Králičí epiteliální buňky rohovky, (SIRC, Rabbit corneal epithelial cells). 	<p>Králičí epiteliální model rohovky (RCE, Rabbit corneal epithelial model)</p> <p>EpiOcular™</p> <p>SkinEthic™</p> <p>EpiCorneal™</p> <p>LabCyte CORNEA-MODEL24</p>
Využití	<p>Test krátkodobé expozice (STE, Short-time exposure test)</p> <p>Test absorpce neutrální červeně (Neutral red uptake assay)</p>	<p>Test oční dráždivosti (EIT, Eye irritation tests)</p>

1.7.2.1 2D modely – jednovrstevné buněčné linie

Dvojměrné biologické modely lze považovat za jedny z nejjednodušších. Ve výzkumu toxických vlastností látek pro oči byly využívány jako jedny z prvních alternativních metod. Účelem buněčných linií je napodobení svrchního rohovkového epitelu. Vyhodnocení potenciálu dráždivosti vychází z detekce sledované cytotoxicity. Vzhledem k malé korelaci mezi biologickým modelem a okem člověka či zvířete je od těchto metod postupně ustupováno a jsou nahrazovány přesnějšími a citlivějšími postupy. Nejčastějšími nedostatky je nižší citlivost testování a jednodušší stavba tkáně, která neodpovídá reálné komplexnosti složení rohovky. Mezi stále využívané metodiky patří například měření prostupnosti fluoresceinu buněčnou vrstvou (FLT, Fluorescein Leakage Test), test absorpce neutrální červeně (NRU, Neutral red uptake assay) nebo test krátkodobé expozice (STE, Short-time exposure test) prováděný na rohovkových buněčných liniích z králíka (SIRC, Statens seruminstitut rabbit corneal cell line) (Bradlaw et al., 1997; Cottin a Zanvit, 1997; Harbell et al., 1997; Hockley a Baxter, 1986; Repetto et al., 2008; Wilson et al., 2015).

Doporučenou metodou toxikologického testování oční dráždivosti na monovrstvě buněčné linie pro sledování a identifikaci silně dráždivých a leptavých látek je FLT (Fluorescein Leakage Test). Metodika byla schválena OECD v roce 2017 pod číslem testovací směrnice 460 (OECD TG. 460). Testování je založené na principu detekce množství prošlého fluoresceinu přes biologický buněčný model po narušení vazeb v experimentální buněčné kultuře cizorodou látkou s toxickými vlastnostmi. Vyhodnocení probíhá na základě spektrofluorometrického měření koncentrace prošlého fluoresceinu přes narušenou buněčnou integritu do jamky (Jones et al., 2019; OECD, 2017; Zanvit et al., 1999).

Dalším vybraným publikovaným testem je absorpce neutrální červeně. Principem metodiky je sledování množství pojatého barviva buňkou po aplikaci neznámé látky. Předpokládaná predikce je, že buňky poškozené po vystavení toxické nebo dráždivé látky pojmu méně barviva než buňky normální. Výsledek je vypočten na základě závislosti mezi množstvím živých buněk a množstvím barviva, které je sledováno po narušení buněčné membrány fluorimetricky. I přes provedenou validační studii koordinovanou Evropským sdružením pro kosmetiku, toaletní potřeby a parfumerii (COLIPA, The European Cosmetic and Perfumery Association) a dobrou reprodukovatelností se nepodařilo test validovat. Metoda zůstává v procesu optimalizace postupů, mezi které patří snížení doby expozice, odstranění nutnosti ředit zkoušené látky, zvýšení citlivosti atd. (Babich a Borenfreund, 1990; Bhanushali et al., 2010; Jones et al., 1999; Repetto et al., 2008).

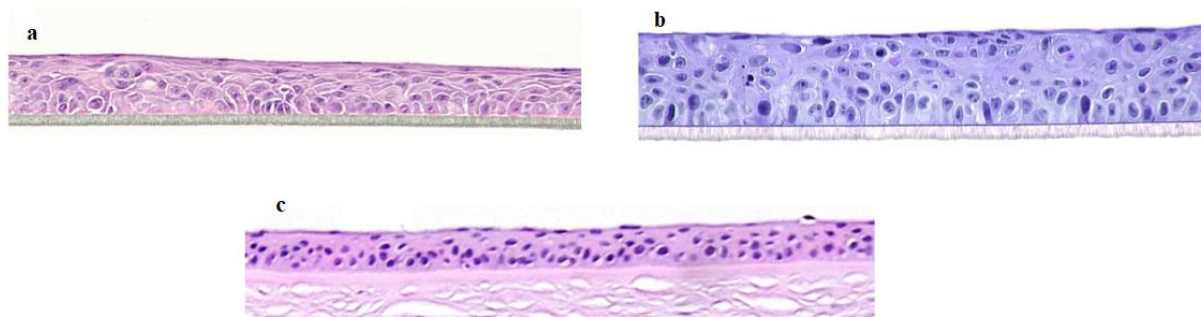
Zajímavým jednovrstevným modelem je test krátkodobé expozice prováděný na SIRC buňkách. Účinky zkoušených látek jsou klasifikovány na základě cytotoxicity. Oproti předešlým metodám je hodnocen potenciál podráždění očí již po 5minutové expozici chemikálií, která více odráží skutečné podmínky. Dalším rozdílem je možná volba použitého média jak pro látky rozpustné ve vodě (fyziologický roztok), tak i pro látky ve vodě nerozpustné (minerální olej). Výsledkem testu je sledování životaschopnosti buněk barvivem MTT (3-(4,5,-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Vlivem metabolických pochodů zdravých buněk dojde ke změně barvicí látky MTT ze žluté na fialovou barvu (formazan). Tento jev je při 570 nm spektrofotometricky vyhodnocen (Adriaens et al., 2018; Kojima et al., 2013; Sakaguchi et al., 2011; Takahashi et al., 2008).

Obecně se tyto metody vyznačují vysokým počtem provedených replikací testování, komerční dostupnost biologických modelů apod. Dále jsou zvláště vhodné pro víceúrovňové testování a ke klasifikaci nedráždivých a silně dráždivých látek. Nedostatkem metody je fyziologická nepřesnost a nižší relevantnost při vyhodnocování výsledků. Dále jsou často využívány buňky, které nepochází z rohovkového epitelu, což snižuje míru spolehlivosti a úrovně možné korelace výsledků s *in vivo* daty (Adriaens et al., 2018; Kaluzhny a Klausner, 2021).

1.7.2.2 3D tkáňové modely tkáně rohovky

Trojrozměrná buněčná kultura v co největší míře napodobuje organizaci a mikroarchitekturu živých orgánů a tkání. Uplatnění tohoto rychle se rozvíjejícího odvětví se našlo v oblasti výroby biologických 3D modelů pro epitel kůže, krevních cév, rohovky a mnoha dalších. Z hlediska oční dráždivosti jsou sledovány modely rohovkové tkáně, které se svojí stavbou blíží fyziologickému popisu lidského oka, respektive rohovky, více nežli modely buněčných linií popsanych výše. Vývoj a dostupnost těchto progresivních modelů roste každým rokem. Dosažitelnost a použití vyvinutých technik není pouze rámcově vědeckého charakteru, ale i komerčního. Mezi takové protagonisty patří například americká společnost MatTek, francouzská SkinEthic aj. Důvody k takto masivnímu rozvoji nových alternativních *in vitro* technik byly mimo jiné i společensko-etické tlaky na kosmetický průmysl, využívající k toxikologickému testování laboratorní zvířata, který se poté stal aktivním inovátorem nutných *in vitro* testů (Bédard et al., 2020; Castro et al., 2019; Huh et al., 2011; Kaluzhny et al., 2018; Van Rompay et al., 2018; Wang et al., 2017).

Ukázka vybraných 3D biologických modelů od společností MatTek (EpiOcular™) a SkinEthic (SkinEthic™ HCE) je zobrazena spolu se srovnáním lidské rohovkové tkáně na obrázku 5 (Kaluzhny a Klausner, 2021).



Obrázek 5 - Histologické srovnání vybraných biologických modelů rohovkové tkáně s lidskou rohovkou - EpiOcular™ (a), SkinEthic™ HCE (b) a lidská rohovka (c) (upraveno z: Kaluzhny a Klausner, 2021; <https://www.mattek.com/products/epiocular/>)

Vybraným modelem k bližšímu popisu je výše zmíněný komerčně dostupný EpiOcular™ EIT, uvedený na trh v roce 1996. Jedná se o trojrozměrný *in vitro* model epitelu lidské rohovky složený z epidermálních keratinocytů získaných z člověka. Buňky jsou kultivovány na porézní polykarbonátovou membránu na vzduchovém rozhraní. Instalované soubory buněk tvoří vícevrstevný epitel napodobující svrchní tkáň rohovky oka u savců. Testovaná látka je nanášena přímo na model a je sledována cytotoxicita za pomoci barviva MTT. Pokud je životaschopnost vyšší než 60 % po ošetření testovanou látkou, je tato neznámá substance klasifikována jako nedráždivá. Výsledná intenzita zbarvení je měřena a vyhodnocena spektrofotometricky. Alternativní toxikologický tkáňový model byl v roce 2017 schválen OECD, respektive v roce 2019 aktualizován jako testovací metoda. Souhrnně se jedná stratifikovaný model epitelu rohovky s vhodným rozhráním buněčné kultury vzduch-kapalina. Fyziologická relevantnost spolu s komerční dostupností a dobrou reprodukovatelností (mimo jiné zajišťující i pravidelné kontroly šarží před expirací) dělá z EpiOcular™ velice spolehlivý a vyhledávaný model pro testování oční toxicity (Lee et al., 2017; OECD, 2019; Sheasgreen et al., 2019; Ubels a Clousing, 2005; Wilson et al., 2015).

1.7.3 Organotypické modely – chorioalantoidní membrána kuřecího embrya

Vedle organotypických biologických modelů, využívající enukleované oči nebo izolovanou rohovkovou tkáň k zjištění potenciálu podráždění oka toxickou látkou

(popsaných výše), existují dále i metodiky, které se zajímají o toxicitu neznámých látek na další důležité a exponované části lidského zraťového ústrojí – spojivce. Tato alternativní metoda byla pro nalezení odpovídajícího modelu a testovacího postupu, díky složitosti cévního systému mírně komplikovanější. Experimenty jsou prováděny na oplozených drůbežích vejcích v různém stádiu jejich vývoje v závislosti na vybraném testovacím modelu. Míra nárůstu a zdokonalení krevního řečiště na chorioalantoidní membráně v průběhu inkubace je uvedena na obrázku 6. Základem testu je odkrytá, bohatě prokrvená chorioalantoidní membrána (CAM, chorioallantoic membrane) oplozených drůbežích vajec, která po přesně definovanou dobu připomíná cévní systém savčí spojivkové tkáně. CAM je vaskularizovaná respirační membrána zajišťující životaschopnost kuřecího embrya, vznikla spojením alantois (jehož funkce jsou jako dýchací, vylučovací a zásobní orgán) a chorionu během vývoje zárodka. Proces poškození tkáně je velice podobný *in vivo* testům na králičích očích. Potenciál dráždivosti toxických látek je sledován v kontextu s rychlostí nástupu dráždivého účinku (lézí apod.) v závislosti na době působení testované látky. Ve většině případů je hodnoceno poškození cévního řečiště membrány způsobem, uvedeným níže (Barile, 2010; Hagino et al., 1999; Lee et al., 2017; Luepke, 1985; Wilson et al., 2015; Ying et al., 2019):

- Hemoragie

K hemoragii (krvácení) dochází při poruše srážení krve přes narušenou kompaktnost stěn cév. Dále mohou vznikat modřiny či tromby. Ukázka vzniku hemoragie je zobrazena na obrázku 7 (C) níže (Abdelkader et al., 2012; Budai et al., 2021; Derouiche a Abdennour, 2017; Steiling, 1994).

- Hyperemie

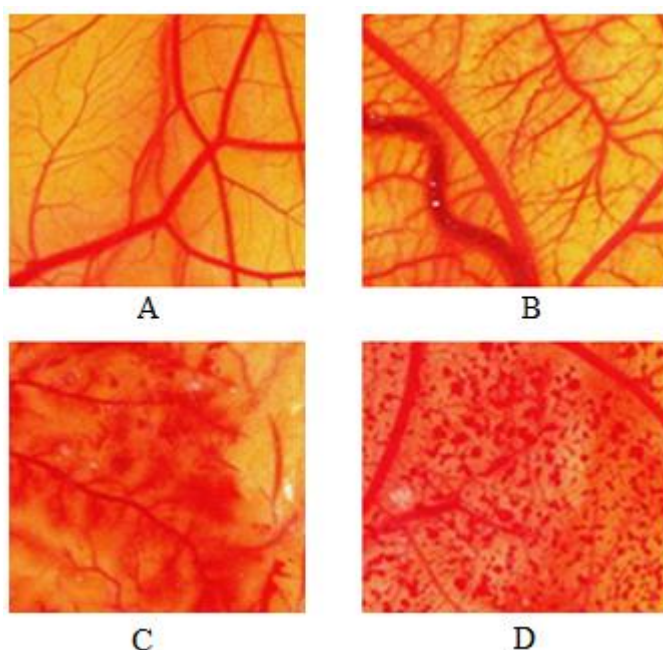
Hyperemie neboli překrvení se po aplikaci neznámé cizorodé látky projevuje jako dilatace kapilár, které jsou naplněny krví viz obrázek 7 (B) níže (Abdelkader et al., 2012; Budai et al., 2021; Derouiche a Abdennour, 2017; Steiling, 1994).

- Koagulace

Koagulace je obecně proces, při kterém krev ztrácí tekutost a mění svoje skupenství na gel za vzniku krevních sraženin. V oblasti oční dráždivosti tento pojem popisuje denuraci extra nebo intra-vaskulárních proteinů, projevem je vznik tmavých skvrn viz obrázek 7 (D) (Abdelkader et al., 2012; Budai et al., 2021; Derouiche a Abdennour, 2017; Steiling, 1994).



Obrázek 6 - Ukázka vývoje cévního řečiště CAM – primitivní vaskulární plexus 3. den po oplodnění (A), růst a remodelace cév 7. den po oplodnění (B) a desátý den vývoje embrya jsou cévy plně diferenciované (C) (upraveno z: Nowak-Sliwinska et al., 2014)



Obrázek 7 - Zobrazení charakteristických reakcí CAM na neznámou látku – bez reakce (A), hyperemie (B), hemoragie (C), koagulace (D) (upraveno z: doi:10.1111/wrr.12689)

Poprvé bylo využití chorioalantoidní membrány publikováno v roce 1911. Tématem studie bylo prokázání růstu kuřecího sarkomu transplantovaného do CAM (Rous a Murphy, 1911). Poté následovalo rychlé rozšíření biologického modelu napříč výzkumnými oblastmi jako je kosmetika, medicína a farmacie, biologie či bioinženýrství aj. Důvodem velkého zájmu byla síť jemných cév na povrchu membrány embrya schopná simulovat citlivé lidské tkáně. Ve zkoumané toxikologické oblasti oční dráždivosti bylo testování na fertilizovaných slepičích vejcích primárně využíváno pro simulaci spojivkové savčí tkáně. Metoda byla modifikována do tří vyhodnocovacích technik probíhajících na CAM. Níže popsány alternativními testy jsou právě tyto tři úpravy, mezi které patří HET-CAM, CAMVA a CAM-TBS (Bagley et al., 1999; Harnoss et al., 2019; Nowak-Sliwinska et al., 2014; Vinardell a García, 2000).

1.7.3.1 HET-CAM – test oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya

Jedná se o model fertilizovaného slepičího vejce, simulující savčí spojivkovou tkáň oka. Metodika experimentu byla v roce 2010 sepsána a aktualizována v protokolu ICCVAM pro *in vitro* metody navržené k identifikaci potenciálu nebezpečí poranění při expozici toxickou chemickou látkou nebo produktem (ICCVAM, 2010).

K testování jsou využívána fertilizovaná slepičí vejce plemene Leghorn o předepsané hmotnosti. Po přepravě do laboratoře jsou vejce uložena do líhně zajišťující optimální podmínky pro vývoj zárodku. Inkubace probíhá devět dní. Devátý den se provede kontrola přítomnosti zárodku ve vejci a odpreparuje se vyznačená část skořápky nad vzduchovou bublinou. Odkrytá papírová blána se zvlhčí fyziologickým roztokem a vejce jsou znovu uložena k inkubaci. Po třiceti minutách se opatrně odstraní papírová membrána a vejce se vloží pod stereomikroskop (ukázka použitého zařízení zobrazena na obrázku 8), čímž se model připravil k aplikaci testovaných látek na chorioalantoidní membránu. Definované množství zkoušených substancí je pro kapaliny 0,3 ml a 0,3 g pro pevné látky. Stereomikroskop pracuje až s 100násobným zvětšením obrazu, a navíc pořizuje video záznam z průběhu reakce cév po daných aplikacích. Na získaných videích lze sledovat změny na prokrvené CAM v závislosti na čase. Testování jedné látky díky předepsané časové hranici nepřesáhne 300 s. Mezi vyhodnocované projevy podráždění patří vaskulární léze, hemoragie či koagulace cévních proteinů. Dle nástupu nežádoucích projevů jsou v daných časových intervalech tyto změny ohodnoceny odpovídající numerickou hodnotou. Ze získaných bodů se vypočítá iritační skóre pro cizorodé látky v experimentu. Stupeň dráždivosti poté odpovídá velikosti iritačního skóre (ICCVAM, 2010; Luepke, 1985; Luepke a Kemper, 1986).



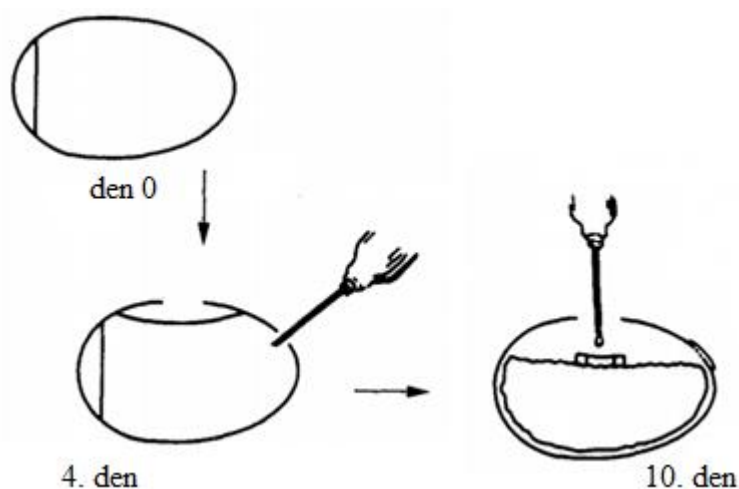
Obrázek 8 - Stereomikroskop, Leica S8 APO (převzato z: <http://www.mikro.cz/foto/produkty/283-20140324105623.jpg>)

Metoda je zařazena mezi doporučenou metodiku ECVAM, ale dosud nebyla zařazena mezi schválené zkoušky OECD a ani validována. Jako jeden z parametrů, díky kterým nedošlo k validaci metody může být subjektivnost hodnocení nástupu a velikosti vznikajících lézí. Návrhy vylepšených a objektivnějších postupů jsou dnes již zveřejněny v mnoha publikacích jako například kvantifikace získaného obrazového materiálu za pomoci softwarové analýzy v programech Photoshop® a ImageJ (Batista-Duharte et al., 2016; Gilleron et al., 1997; McKenzie et al., 2015).

1.7.3.2 CAMVA – vaskulární test oční dráždivosti

Metoda byla vyvinuta a aktualizována na konci minulého století jako modifikace testu HET-CAM (Leighton et al., 1985). Zjednodušené chronologické schéma postupu testování je uvedeno na obrázku 9.

Zkontrolovaná oplozená vejce se inkubují po dobu čtyř dní. Poté se do skořápky provedou 2 otvory (viz obr. 9). Jeden slouží k odebrání malého množství bílku, aby se lépe vyvíjel zárodek a druhý otvor bude posléze využit k aplikaci testované látky. Vytvořené otvory se zalepí a model je vložen zpět do inkubátoru. Po šesti dnech je vejce vyndáno z líhně k provedení samotného testování. Zkoušená látka je aplikována přímo vrchním otvorem na CAM. Pro zpřesnění testu je možné použít teflonový nebo silikonový kroužek ke specifikaci místa expozice. Působení cizorodé látky trvá třicet minut a poté jsou sledovány změny na cévách membrány (léze, krvácení aj.). Vyhodnocení testu se provádí na základě statistického zpracování získaných dat (Bagley et al., 1999; Donahue et al., 2011; Spielmann et al., 1997).

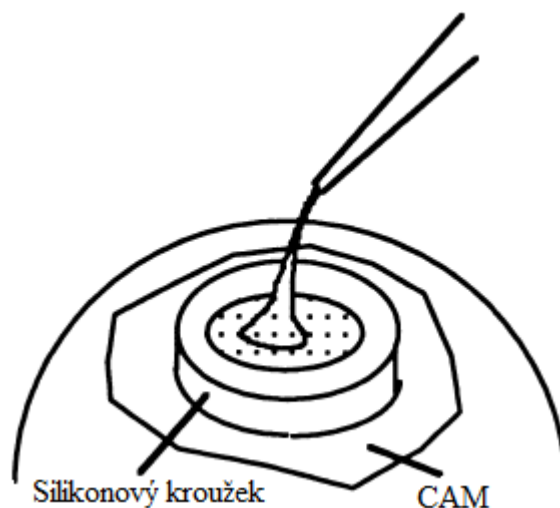


Obrázek 9 - Schéma postupu testování metodou CAMVA (upraveno z: doi: 10.1016/0278-6915(85)90031-6)

1.7.3.3 CAM-TBS – vyhodnocení oční dráždivosti v kombinaci s Trypanovou modří

Nevýhodou metody HET-CAM při posouzení možného potenciálu chemické látky způsobit podráždění očí je subjektivita při vyhodnocování laboratorním pracovníkem. K zamezení tohoto ovlivnění byla vyvinuta nová testovací strategie. CAM-TBS je vyhodnocována dle schopnosti barviva Trypanové modří proniknout poškozenými membránami. Stanovení množství barviva absorbovaného chorioalantoidní membránou po vystavení testované látce probíhá za pomoci spektrofotometru (Hagino et al., 1993).

Příprava vajec k experimentu je shodná s metodikou pro HET-CAM. Modifikace metody začíná u aplikace zkoušené látky do ohraničeného prostoru silikonovým kroužkem (viz obrázek 10), kam je po jejím vymytí je aplikován roztok Trypanové modří podle testovacího protokolu. Po přesně definovaném čase je barvivo odstraněno. Mrtvé buňky (s poškozenými buněčnými stěnami) se obarví Trypanovou modří. Množství absorbovaného barviva koreluje s množstvím mrtvých buněk CAM. Barvení s Trypanovou modří je obecně používáno k měření životaschopnosti buněk, které detekuje destrukci a denaturaci membrány. Výsledkem použité metody je hodnota absorbance barviva, která je přepočítána za pomoci vzorce na celkové iritační skóre, které rozhodne o potenciálu dráždivosti látky použité v experimentu (Hagino et al., 1999; Lagarto et al., 2006; Ohno et al., 1999; Reis Mansur et al., 2016; Vinardell a García, 2000).



Obrázek 10 - Aplikace kapalné látky do definovaného prostoru na CAM (upraveno z: doi:10.1016/S0887-2333(98)00065-4)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 *In vivo* testování oční dráždivosti/leptavosti

Testování oční dráždivosti a leptavosti za pomoci *in vivo* Draizeho testu prováděném na laboratorních zvířatech (albinotičtí králíci) nebylo předmětem této diplomové práce. Použité výsledky zkoušek byly shromážděny z testů provedených dle nařízení REACH pro registraci chemických látek a ze zkoušek hodnocení jejich nebezpečnosti. Zdrojem naměřených experimentálních dat byl archiv Výzkumného ústavu organických syntéz a.s., volně dostupné internetové stránky ECHA nebo jiná publikovaná literatura. Laboratorní pokusy byly prováděny dle aktuálně platných pracovních postupů. Metodika pro tento typ testování byla přijata organizací OECD v roce 1981 pod označením TG No. 405 Acute Eye Irritation/Corrosion (akutní oční dráždivost/leptavost). Aktuální verze tohoto dokumentu z roku 2020 upravuje testování zvířat pod mírnou sedací (OECD, 2020a).

Reakce rohovky, duhovky, spojivky a víček byla po podání látky sledována v pravidelných časových intervalech. Všechny změny byly zaznamenávány do protokolu dle normy pro vyhodnocení podráždění. Testování na živých jedincích umožňuje hodnotit i systémovou toxicitu látek a regeneraci poškozené tkáně během 21 dnů po aplikaci. Získaná experimentální data byla klasifikována dle stupnice potenciálu oční dráždivosti. Schématická ukázka bodového vyhodnocovacího systému akutní oční toxicity je uvedena v tabulce 2 (OECD,2020a; Wilhelmus,2001).

Tabulka 2 - Bodové vyhodnocení potenciálu dráždivosti chemických látek za pomoci Draizeho *in vivo* testu oční dráždivosti/leptavosti (upraveno z: doi:10.1016/j.tiv.2005.10.003)

Klasifikace látky	Bodové vyhodnocení oční dráždivosti
nedráždivá	0 – 4,9
mírně dráždivá	5 – 14,9
dráždivá	15 – 29,9
silně dráždivá	30 – 59,9
velmi silně dráždivá	60 – 79,9
extrémně dráždivá	80 – 110

2.2 Popis vybraných alternativních toxikologických postupů

V experimentální části jsou popsány aktuální laboratorní postupy založené na schválených mezinárodních metodikách a protokolech pro vybrané alternativní toxikologické testy. Mezi těmito alternativními metodami jsou dvě, které se běžně provádějí na pracovišti Výzkumného ústavu organických syntéz a.s., Rybitví a mají svůj standardní operační postup (SOP). Jedná se o testy BCOP a HET-CAM prováděné na izolovaných hovězích rohovkách, respektive na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya. Třetí prováděná metoda, využívající stejného biologického modelu jako HET-CAM, na externím výzkumném pracovišti nebyla zavedena. Z tohoto důvodu bylo testování oční dráždivosti CAM-TBS provedeno dle aktuálního protokolu ECVAM.

2.2.1 Metoda BCOP

Testování opacity a permeability na izolovaných hovězích rohovkách po vystavení účinkům zkoušené látky bylo provedeno v souladu s postupem č. 437 OECD. Výsledky této metody se používají ke klasifikaci silně dráždivých až leptavých látek, dle UN GHS (Kategorie 1), bez nutnosti ověření formou *in vivo* testování (OECD, 2020b).

2.2.1.1 Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky

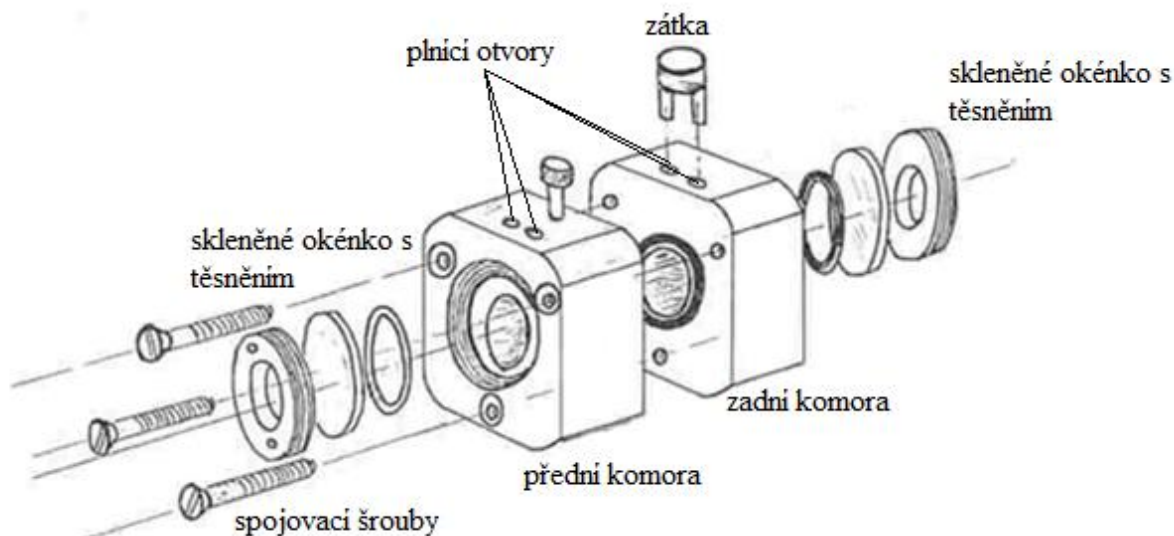
- Použité přístroje
 - Inkubační třepačka ES – 20/60 (BIOSAN, Litva)
 - Opacitometr MC2 (Le spécialiste du laboratoire, Francie)
 - Spektrofotometr Genesys 10S UV/VIS (Thermo Scientific, USA)
 - Analytické váhy (Sartorius AC210S)
 - Speciální držák rohovek skotu, šroubovák
 - Skalpel, nůžky, kleště, špachtlička, lžička, pipeta, stříčka, kapátko
- Použité chemikálie a roztoky
 - EMEM (Sigma-Aldrich)
 - HBSS (Sigma-Aldrich)
 - Roztok fluoresceinu sodného (Sigma-Aldrich)
 - 0,9% roztok chloridu sodného (B. Braun Medical s.r.o.)
 - DMFA 100% - Dimethylformamid (PENTA s.r.o.)
 - 20% Imidazol (Sigma-Aldrich)
 - Testované látky (popsány samostatně v kapitole 2.3.2)

2.2.1.2 Postup alternativní metody prováděné na izolovaných hovězích rohovkách

Jako organotypický biologický model pro toxikologické testování oční dráždivosti a leptavosti byla použita izolovaná hovězí rohovka. Testovaná tkáň byla získána, jako vedlejší produkt, při zpracování zdravého skotu na jatkách. Zdrojem hovězích očí byly pouze dospělí jedinci ve věku mezi dvanácti až šedesáti měsíci. Důvodem věkového omezení byla vhodná velikost a průměr rohovky skotu. Oči byly opatrně enukleovány zaměstnanci jatek ihned po usmrcení zvířete. Rychlým postupem bylo předcházeno možnému poškození získaného *ex vivo* modelu. Oplach vyjmutých očí byl proveden vodou bez přidaných detergentů. Čistící prostředky by v tomto případě mohly být pro čerstvě odebranou tkáň potencionálně dráždivou látkou.

Získané hovězí oči byly v co nejkratší době převezeny do laboratoře. Tyto izolované biologické modely byly při transferu chlazeny suchým ledem a uloženy do fyziologického roztoku HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) obsahujícího antibiotika (penicilin 100 IU/ml a streptomycin 100 µg/ml). Po celou dobu přepravy byly zajištěny stabilní podmínky k zamezení kontaminace a udržení fyziologických, biologických a biochemických vlastností organotypického modelu. Vzhledem ke krátkodobému udržení žádaných vlastností zájmové části oka pro daný experiment, proběhlo testování oční dráždivosti stejný den, jako byl proveden jejich odběr.

Izolované oči byly ihned po převzetí do laboratoře zkontrolovány. Sledovanými defekty byly jak viditelná makroskopická poškození vzniklá přepravou, tak i zákal nebo pigmentace rohovky. Oči, které nevyhovovaly vstupním požadavkům na kvalitu, byly vyřazeny. Počáteční separací byla vybrána vhodná skupina testovaných objektů do další fáze zkoušky. U nepoškozených očí byla provedena preparace rohovky s 2-3 mm lemlem bělimy. Získaný model rohovky byl zamontován do speciálního držáku (viz obrázek 11), který po naplnění médiem vytvoří simulovaný model oční bulvy. Držák se skládá z přední a zadní komory. V prostoru mezi komorami byla upevněna rohovka. Sklíčka v přední a zadní části umožňovaly průchod světelného záření. Uzavíratelnými plnicími otvory na vrchu držáku byla nejdříve naplněna predehřátým kultivačním roztokem EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) zadní a až poté přední komora. Přesně dané pořadí plnění komor způsobilo přirozené vyklenutí rohovky. Připravený speciální držák obsahující rohovku a médium byl preinkubován po dobu šedesáti minut, a to při stejné teplotě jako kultivační roztok, 32 ± 1 °C.



Obrázek 11 - Schéma speciálního držáku na hovězí rohovku (upraveno z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R1152&from=CS>)

Po hodinové inkubaci byla změřena opacita u všech rohovek zařazených do testu. Z experimentu byly vyřazeny rohovky, které měly hodnotu naměřené opacitě větší nežli 7 nebo vykazovaly viditelné poškození tkání.

U vyhovujících rohovek bylo pokračováno v testování dle použité metodiky. Byly vytvořeny 3 skupiny biologických modelů. První skupina byla vybrána pro aplikaci pozitivní kontroly (PK), další pro negativní kontrolu (NK) a třetí skupina sloužila k samotnému testování chemických látek v daném experimentu. Jeden vzorek byl vždy zkoušen na třech rohovkách.

- Pozitivní kontrola (100% DMFA pro kapaliny a 20% Imidazol pro pevné látky)

Pozitivní kontrolní látka vyvolá poškození testované tkáně. Jedná se o validitu zkoušky a citlivosti modelu.

- Negativní kontrola (Fyziologický roztok)

Negativní kontrolní látka by neměla vyvolat žádnou reakci sledované tkáně. Využívá se k detekci možné reaktivity rozpouštědla se zkušebním systémem.

Aplikování látek do speciálních držáků bylo provedeno dvěma odlišnými postupy. Výběr byl proveden na základě viskozity chemických látek. Pro kapaliny neviskózní až mírně viskózní byl použit postup s uzavřenou komorou. Plnicími otvory v přední komoře (epiteliální strana rohovky) bylo aplikováno 750 μ l testované látky, aby došlo k pokrytí celé tkáně. Nutné

bylo eliminovat vznik bublinek při aplikaci. Poté byly plnicí otvory zavřeny zátkou. Druhou metodou pro polo/viskózní kapaliny a pevné látky byla aplikace přes otevřenou komoru. Principem metody byla aplikace dostatečného množství testované látky skrz odstraněné skleněné okénko z přední komory. Objem testované substance byl metodikou stanoven na 750 μ l. Pokud nebylo možné aplikovat předepsaný objem, tak bylo nanášeno dostatečné množství látky pro pokrytí rohovky. Po provedeném úkonu byla skleněná okénka znovu navrácena do speciálního držáku.

Expozice zkoušených látek byla rozdílná v závislosti na jejich fyzikálním charakteru. Tekutiny spolu s vosky, polotuhými látkami a pastami byly aplikovány neřaděné a reakční doba byla deset minut při teplotě $32 \pm 1^\circ\text{C}$. U pevných látek byla doba expozice prodloužena na 4 hodiny.

Po odpovídající době kontaktu (10 minut anebo 4 hodiny) byly zkoušené látky vymyty EMEM médiem s fenolovou červení. Oplachování epiteliální strany rohovky v přední komoře bylo provedeno minimálně třikrát. Při stálé změně barvy indikátoru (žlutá nebo purpurová) nebo viditelnému zůstatku testované látky bylo v omývání pokračováno. Ke konečnému oplachu bylo použito čisté médium EMEM bez přidaného indikátoru a současně s ním byla naplněna přední komora. Vzorky s kratší desetiminutovou inkubací byly ještě dvě hodiny inkubovány při teplotě $32 \pm 1^\circ\text{C}$. U druhé skupiny látek nebyla potřeba další inkubace. Po uplynutí dvou hodin bylo vyměněno kultivační médium v obou komorách a změřena opacita všech otestovaných rohovek.

Měření opacity bylo provedeno opacitometrem MC2 (Le spécialiste du laboratoire, Francie). Jedná se o přístroj k měření světelné propustnosti. V principu se jedná o zdroj záření vysílající světlo přes kontrolní (prázdnou) část a fotobuňku do zkušebního prostoru (obsahujícího rohovku). Provedená analýza se vyhodnocovala za pomoci porovnání světelné propustnosti referenčního prostoru a vzorkovací komory. Výsledkem byla numerická hodnota určující zákalové jednotky. Opacita byla měřena na začátku a po ukončení experimentu (po expozici rohovky se zkoušenými látkami). Zvýšený zákal rohovky koreluje s mírou jejího poškození, které lze díky opacitometru objektivně vyhodnotit. Změna průhlednosti izolované části oka je prvním důležitým sledovaným bodem, protože přímo omezuje schopnost zraku.

Po ukončení kvantitativního měření míry zákalu rohovky byl z přední komory odstraněn EMEM roztok a v zadní části byl vyměněn. Plnicími otvory v přední straně byl aplikován 1 ml roztoku fluoresceinu sodného (5 mg/ml). Model byl ve svislé poloze inkubován

90 ± 5 minut při teplotě 32 ± 1°C. Po uplynutí předepsané doby byla sledována permeabilita hovězí rohovky pomocí prošlého fluoresceinu sodného.

Ze zadní komory byl odebrán roztok ke zjištění množství prošlého indikátoru přes všechny vrstvy buněk rohovky. Absorbance byla měřena za pomoci spektrofotometru při 490 nm. Pokud zůstane rohovka neporušena je naměřená hodnota rovna nule. S větší mírou poškození roste i absorbance fluoresceinu sodného.

Průběžné výsledky zákalu rohovky a propustnosti fluoresceinu sodného (schématická ukázka postupu výpočtu je zobrazena níže v tabulce 3 pro opacitu, respektive v tabulce 4 pro permeabilitu) byly dle platné metodiky zpracovány a upraveny do průměrných hodnot charakteristických pro každou látku použitou v experimentu. S takto připravenými hodnotami bylo dále získáno *in vitro* skóre oční dráždivosti IVIS.

Tabulka 3 - Přepočet výchozích hodnot opacity pro výpočet IVIS

Ukázka výpočtů	
<p>1. Od hodnoty opacity po kontaktu s testovanou chemikálií byla pro každou rohovku odečtena hodnota opacity před expozicí.</p> <p>Výpočtem byla zjištěna individuální upravená opacita, značená $O_{(ind)}$.</p>	$O_{\text{po aplikaci}} - O_{\text{pozadí opacity}}^*$ $=$ $O_{(ind) \text{ NK/PK/TL}}$
<p>2. Z $O_{(ind)}$ byla spočítána průměrná opacita (\bar{O}) pro pozitivní kontrolu (PK), negativní kontrolu (NK) a pro každou testovanou látku (TL).</p>	$\sum O_{(ind) \text{ NK/PK/TL}} / 3 \text{ (počet rohovek)}$ $=$ $\bar{O}_{\text{NK/PK/TL}}$
<p>3. Zpřesnění průměrných hodnot zákalu rohovky pro pozitivní kontrolu a testované látky bylo provedeno odečtením průměrné hodnoty opacity negativní kontroly. Výsledkem je bezrozměrné číslo $O_{(cor)}$.</p>	$\bar{O}_{\text{PK/TL}} - \bar{O}_{\text{NK}}$ $=$ $O_{(cor) \text{ PK/TL}}$

Tabulka 4 - Přepočet výchozích hodnot permeability pro výpočet IVIS

	Ukázka výpočtu
1. Byla vypočítána průměrná hodnota permeability pro pozitivní kontrolu (PK) a testované látky (TL). Z třech provedených replikací měření každé chemikálie.	\bar{P}_{PK} a \bar{P}_{TL}
2. Průměrná permeabilita pro PK a TL byla zpřesněna odečtením průměrné permeability negativní kontroly (NK), charakterizující nepoškozenou rohovku. Výsledkem bylo bezrozměrné číslo $P_{(cor)}$	$\bar{P}_{PK/TL} - \bar{P}_{NK}$ $=$ $P_{(cor) PK/TL}$

Potenciál dráždivosti zkoušených látek byl nakonec ze všech pomocných hodnot stanoven pomocí empiricky odvozeného vzorce IVIS:

$$IVIS = O_{(cor) PK/TL} + (15 \times P_{(cor) PK/TL})$$

Rozhodujícím kritériem pro zařazení dráždivosti látek byla klasifikační stupnice dle UN GHS (uvedena v tabulce 5). Z tabulky plyne, že při hodnotě IVIS menší nebo rovno třem byla příslušná zkoušená látka považována za bezpečnou (nedráždivou) bez nutnosti potvrzení výsledků jinou alternativní nebo *in vivo* metodou. Při výsledné hodnotě iritačního skóre testu v rozmezí 3 až 55 naopak nelze látkou přesně zařadit do příslušných skupin dráždivosti a bylo třeba pokračovat formou dalších *in vitro* testů nebo zkoušek na laboratorních zvířatech. Poslední skupinou byly látky s hodnotou IVIS vyšší než 55, které byly klasifikovány jako látky způsobující vážné poškození očí.

Tabulka 5 - Klasifikace potenciálně dráždivých látek za pomoci metody BCOP

IVIS	klasifikace dle UN GHS
≤ 3	nedráždivá
$> 3 \leq 55$	nelze vyhodnotit
> 55	silně dráždivá/leptavá

2.2.2 Metoda HET-CAM

Testování oční dráždivosti a leptavosti, simulující spojivkovou tkáň, probíhalo na *in vitro* organotypickém biologickém modelu bohatě prokrvené chorioalantoidní membráně fertilizovaného slepičího vejce. Vybraná tkáň velice dobře koreluje s hustým cévním řečištěm savčí spojivky. Použitá metoda HET-CAM nepatří mezi testovací postupy OECD jako výše popsany test na izolovaných hovězích rohovkách. Laboratorní postup experimentu vycházel z protokolu ICCVAM pro identifikaci potenciálu nebezpečí poranění očí chemickou látkou nebo jiným produktem (ICCVAM, 2010).

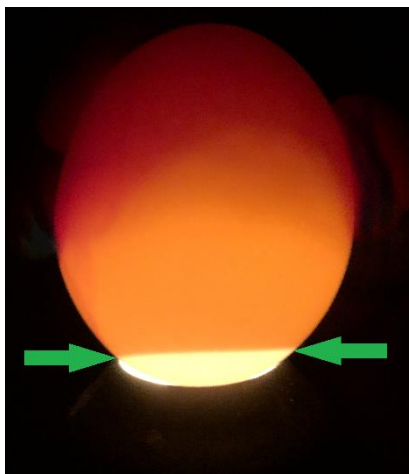
2.2.2.1 Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky

- Použité přístroje
 - Automatická líheň KING SURO 20 (AUTO ELEX Co., LTD, Gyeongsangnam-do Korea)
 - Stereoskopický mikroskop LEICA S8 APO (MIKRO, spol.s.r.o.,ČR)
 - Analytické váhy (Sartorius AC210S)
 - Baterka k prosvícení vajec EGGTESTER Super Flash
 - Skalpel, nůžky, kleště, pinzeta, špachtlička, lžička
 - Pipety, kapátko, stříčka
- Použité chemikálie a roztoky
 - 0,9% roztok chloridu sodného (B. Braun Medical s.r.o.)
 - 1% roztok hydroxidu sodný (PENTA s.r.o.)
 - Testované látky (popsány samostatně v kapitole 2.3.2)

2.2.2.2 Postup alternativní metody prováděné na chorioalantoidní membráně

Biologickým modelem pro metodu HET-CAM byla oplozená slepičí vejce plemene White Leghorn získána z vhodného komerčního chovu. Hmotnost použitých vajec byla mezi 50 až 60 g. V laboratoři proběhla prvotní vizuální kontrola makroskopických defektů skořápky a prosvícení celého vejce ke zjištění přítomnosti kuřecího zárodku. Nevyhovující vejce byla odstraněna a zdravá byla vložena do automatické líhně při předepsané teplotě i vlhkosti. Líheň prováděla v průběhu inkubace kývavý pohyb. Vejce byla minimálně 1krát denně ručně otáčena, aby se zabránilo přilepení zárodku k jedné straně. Teplotní a vlhkostní podmínky v líhni byly pravidelně kontrolovány.

Osmý den vývoje zárodku byla vejce opět prosvícena baterkou. Pomocí grafitové tužky byla vyznačena hranice vzduchové bubliny (její znázornění je zobrazeno pomocí zelených šipek na obrázku 12 níže) na všech vejcích. Chybějící vyvíjející se kuřecí zárodek byl důvodem k odstranění vajec ze zkoušky. Ostatní byla po označení vrácena do líhně.



Obrázek 12 – Prosvícený model vajíčka s označenou vzduchovou bublinou

Devátý den byla ukončena inkubace vajec a provedeno jejich rozdělení do skupin po nejméně třech vejcích. Pro každé testování bylo třeba mít skupinu vajec pro pozitivní kontrolu, negativní kontrolu a testované látky. Označení skupiny a čísla bylo čitelně zaznamenáno na bok vejce, aby nedocházelo k jejich záměnám. Poté byly za pomoci skalpelu a nůžek vytvořeny na vrcholu každého vajíčka dírký nad vzduchovou bublinou. Zvětšení otvorů bylo prováděno velice opatrně za pomoci nůžek. Vystřížená vrchní část vejce kopírovala vyznačenou hranici, která ochraňovala chorioalantoidní membránu před poškozením. Vyznačené vzduchové bubliny (na obr. 13 nahoře) a ukázka již odstraněné skořápky (na obr. 13 dole) je zobrazena níže.



Obrázek 13 - Příprava testu HET-CAM a odstranění skořápek

Po odstranění skořápky byla svrchní papírová membrána smočena fyziologickým roztokem a vejce byla vrácena na 30 minut do automatické líhně. Bez funkce kývavého pohybu.

Testovaná vejce byla po půl hodině inkubace vyndána. Přebytek fyziologického roztoku byl z povrchu otevřeného vejce vylit. Pomocí zahnuté, špičaté pinzety byla opatrně odstraněna papírová membrána chránící CAM (odstranění svrchní membrány je znázorněno na obrázku 14 níže). Na takto připravený model s odrytým bohatě prokrveným řečištěm byly aplikovány testované látky nebo pozitivní a negativní kontroly.



Obrázek 14 - Odstranění svrchní papírové membrány

Způsob dávkování látek se lišil v závislosti na jejich fyzikálních vlastnostech. Kapalné látky a pasty byly aplikovány za pomoci pipety o předepsaném množství 0,3 ml. Podrcené pevné látky do hmotnosti 0,3 g byly aplikovány pipetou o objemu stejném jako kapaliny. Pokud došlo při objemu 0,3 ml k překročení limitní hmotnosti 0,3 g, pak musela být látka aplikována pomocí špachtličky. Dle doporučení metodiky byly všechny látky zkoušené v neředěném a nerozpuštěném stavu.

Aplikace látek na prokrvenou membránu byla prováděna pod stereomikroskopem (Leica S8 APO) s kamerou (Leica MC 170HD). Každá sledovaná reakce na cévách CAM byla díky tomu zaznamenána a posléze vyhodnocena. Ověření spolehlivosti metody bylo prováděno na pozitivní (jistě poškození cév) a negativní (bez poškození cév) kontrole souběžně s každým testováním.

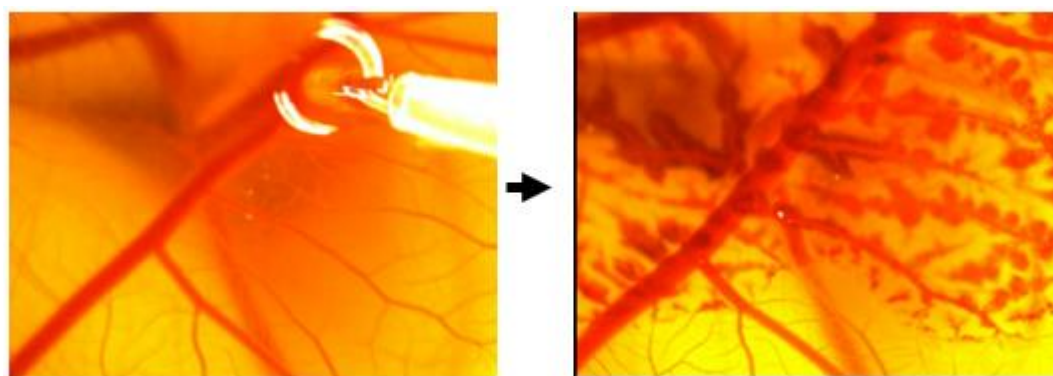
Stereoskopickým mikroskopem byly při vyhodnocení sledovány hlavně tyto změny: hemoragie (krvácení z cév), koagulace (denaturace vaskulárních proteinů) a rozklad cév. Rychlost nástupu monitorovaných defektů byla podrobně zaznamenána. Maximální čas

kontaktu testované látky, k projevu případných toxických vlastností, byl stanoven na 300 sekund. V této stanovené době byly v metodikou určených časových intervalech zaznamenávány vzniklá poškození s odpovídajícími body (viz tabulka 6). Záznamy byly pořizovány 0,5 min, 2 min a 5 min po aplikaci. Z tabulky 6 a uvedených číselných hodnot vyplývá, že vyšší hodnota byla přiřazena závažnějším a větším poškození, jako byla například koagulace. Rozdíl chorioalantoidní membrány před aplikací a po aplikaci s vznikem koagulace na celém cévním řečišti je zobrazen na obrázku 15 níže.

Tabulka 6 - Bodové hodnocení vzniklého poškození cév v závislosti na čase

Čas	0,5 min	2 min	5 min
Efekt	Dílčí iritační skóre		
Vaskulární léze	5	3	1
Hemoragie	7	5	6
Koagulace	9	7	5

Na základě získaných výsledků pak bylo stanoveno iritační skóre (IS) pro danou látku. Pokud v předdefinovaném čase 300 sekund nedošlo k žádnému zjevnému poškození bohatě prokrvené membrány kuřecího embrya, byla tato látka označena za nedráždivou pro spojivku tkáň savců, a to včetně člověka.



Obrázek 15 - CAM před aplikací X CAM po aplikaci a vzniku koagulace

Iritační skóre bylo získáno sečtením numerických hodnot, které odpovídaly době vzniku a velikosti cévních lézí, koagulaci a hemoragii. Maximální hodnota IS byla 21 a dle výsledku testování a vyhodnocovací stupnici bylo možné posoudit potenciál dráždivosti látek v experimentu. Stupnice podráždění dle vypočítané číselné hodnoty je uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7 - Klasifikace potencionálu dráždivosti chemických látek na základě vypočítaných hodnot IS

Potenciál dráždivosti látky	IS
Nedráždivá	<1
Mírně dráždivá	1 <5
Středně dráždivá	5 <9
Leptavá/silně dráždivá	9 – 21

2.2.3 Metoda CAM-TBS

Vznikla jako modifikace alternativního testu oční dráždivosti/leptavosti HET-CAM s objektivním spektrofotometrickým vyhodnocením. Rozšíření klasické metody na chorioalantoidní membráně spočívalo ve využití barviva Trypanové modře, které bylo aplikováno po odstranění testované látky. Toto barvivo bylo využito díky jeho vlastnosti barvení poškozené tkáně, v tomto případě CAM. Čím větší bylo obarvení tkáně tím byl větší potenciál dráždivosti u testované látky. Poté byla Trypanová modř z membrány extrahována. Množství barviva bylo měřeno spektrofotometricky. Klasifikační stupnice pro zjištění míry toxicity zkoušených látek byly použity dvě. První byla totožná s vyhodnocením zkoušky HET-CAM (ICCVAM, 2010) a druhá byla převzata z publikované literatury (Lagarto et al., 2006).

2.2.3.1 Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky

- Použité přístroje
 - Automatická líheň KING SURO 20 (AUTO ELEX Co., LTD, Gyeongsangnam-do Korea)
 - Stereoskopický mikroskop LEICA S8 APO (MIKRO, spol.s.r.o., ČR)
 - Spektrofotometr Genesys 10S UV/VIS (Thermo Scientific, USA)
 - Centrifuga CENTRIFUGE 5804 Eppendorf® (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., ČR)
 - Analytické váhy (Sartorius AC210S)
 - Baterka k prosvícení vajec EGGTESTER Super Flash
 - Silikonový kroužek O-kroužek ČSN 18 x 2 Si (Pikron s.r.o., ČR)
 - Skalpel, nůžky, kleště, pinzeta, špachtlička, lžička, pipety, kapátko, stříčka
 - Kádinky, zkumavky, odměrné válce, odměrné baňky, Petriho misky

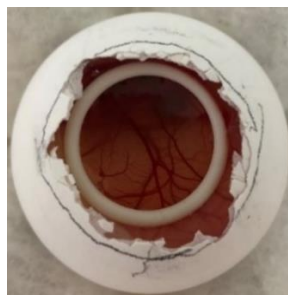
- Použité chemikálie a roztoky
 - 0,9% roztok chloridu sodného (B. Braun Medical s.r.o.)
 - roztok PBS (Phosphate buffered saline) o pH 7,4 (Sigma-Aldrich)
 - 0,4% Trypan blue (Sigma-Aldrich)
 - Formamid (PENTA s.r.o.)
 - Testované látky (popsány samostatně v kapitolách 2.3.1 a 2.3.2)

2.2.3.2 Postup alternativní metody prováděné na CAM v kombinaci s Trypanovou modří

Laboratorní postup byl prováděn na základě protokolu ECVAM pro CAM-TBS (DB-ALM Protocol n° 108: CAM-TBS test, 2007). Přípravná část experimentu byla shodná s výše popsaným postupem HET-CAM. Původ, přeprava do laboratoře a prvotní kontroly před vložením vajec do automatické líhně, provádějící kývavý pohyb zamezující přilepení embrya k jedné straně, byly identické.

Od prvního dne inkubace byla vejce pravidelně kontrolována. Sledovala se zejména stabilita jejich prostředí (vlhkost a teplota). Devátý den byla vejce vyjmuta, prosvícena a na každém byla tužkou označena hranice vzduchové bubliny. Po vyznačení rozhraní mezi dutou skořápkou a zárodkem byla všechny dobře se vyvíjející vejce vrácena zpět do líhně. Ostatní byla z testování vyřazena.

Desátý den byla inkubace ukončena. Skalpelem byl doprostřed skořáčky (nad vzduchovou bublinou) vytvořen otvor. Za pomoci nůžek byl otvor zarovnán těsně nad zvýrazněnou hranicí. Případné úlomky skořáčky spadlé na svrchní papírovou membránu byly opatrně odstraněny, aby nedošlo k poškození cév. Poté byla membrána smočena fyziologickým roztokem a vejce byly vloženy na 30 minut do inkubátoru. Po vyndání vajec byl odstraněn (vylit) přebytečný fyziologický roztok a stažena svrchní papírová blána. Na odkrytou chorioalantoidní membránu byl vložen silikonový kroužek o vnitřním průměru 18 mm. Účelem použití kroužku bylo definování exponované oblasti a snížení možné variability testu. Ukázka aplikace kroužku na CAM je zobrazena na obrázku 16.



Obrázek 16 - Aplikace silikonového kroužku o průměru 18 mm na CAM

Do definovaného prostoru bylo aplikováno 200 μl zkoušené látky v čistém nebo zředěném stavu. Množství použité pevné látky k testování bylo 200 μg . Časová expozice zkoušené látky na chorioalantoidní membráně byla 20 sekund. Celá aplikace a následná reakce byla provedena a zaznamenávána pod stereomikroskopem s kamerou. Po dvaceti sekundách byla látka vymyta fyziologickým roztokem a aplikováno 500 μl 0,1% roztoku Trypanové modři v PBS. Postup byl znovu prováděn pod stereomikroskopem. Membrána byla vystavena působením barviva po dobu šedesáti sekund. Po skončení definovaného času byla nadbytečná Trypanová modř vymývána alespoň 20 sekund fyziologickým roztokem.

Exponovaná část membrány ohraničená silikonovým kroužkem byla za pomoci zahnuté pinzety a nůžek odpreparována (vyjmutou část chorioalantoidní membrány spolu se silikonovým kroužkem je zobrazena na obrázku 17). Izolované části CAM byly poté vloženy do označených zkumavek s 5 ml formamidu a uzavřeny. Testování každé látky probíhalo ve čtyřech replikacích.



Obrázek 17 - Vyjmutá oblast chorioalantoidní membrány

Zkumavky byly přeneseny do centrifugy, kde byl vzorek při 3200 otáčkách 10 minut odstředován. Vzniklý roztok byl přenesen do kyvety. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Genesys 10S UV/VIS (Thermo Scientific, USA) při 595 nm.

Kalibrační křivka byla sestrojena z koncentrací 0 M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M použitého barviva ve formamidu (potřebné objemy ředění na 100 ml roztoku jsou zobrazeny v tabulce 8 níže). Výsledná rovnice sloužila pro určení průměrného množství extrahovaného barviva z chorioalantoidní membrány pro každý testovaný vzorek.

Tabulka 8 - Ředění roztoku do kalibrační křivky na 100 ml vzorku

Koncentrace (M)	Objem roztok barviva (ml)
0	0
1×10^{-6}	0,1
1×10^{-5}	1
5×10^{-5}	5

Vyhodnocení množství absorbované Trypanové modři v CAM bylo přepočítáváno dle následující rovnice, kde d je rovno průměrné molární koncentraci barviva z každého extraktu:

$$\text{množství absorbovaného barvivo} = d * \frac{5}{1000 * 10^9} \text{ (nmol)}$$

Při vyhodnocování získaných výsledků byly použity dvě klasifikační tabulky. První byla stejná jako u předešlého testu HET-CAM vzhledem k potencionální podobnosti obou metod. Druhá byla převzata z publikované literatury zkoumající tento modifikovaný postup. Získané hodnoty byly mezi sebou porovnány. Zvolené vyhodnocovací tabulky jsou zobrazeny níže, jako tabulka 9 respektive 10. Iritační skóre k zařazení látek bylo vypočítáno dle rovnice výše pro množství absorbovaného barviva.

Tabulka 9 - Vyhodnocení dle metody HET-CAM

Potenciál dráždivosti látky	IS
Nedráždivá	<1
Mírně dráždivá	1 <5
Středně dráždivá	5 <9
Leptavá/silně dráždivá	9 – 21

Tabulka 10 – Vybrané v publikaci uváděné vyhodnocení pro metodu CAM-TBS (Lagarto et al., 2006)

Dráždivost látky	Iritační skóre
Nedráždivá / slabě dráždivá	<7
Středně dráždivá	7 <14,5
Silně dráždivá	>14,5

2.3 Výběr testovaných látek

V souladu s cílem diplomové práce byl proveden výběr látek pro ověření modifikace testu HET-CAM a jeho objektivního vyhodnocení pomocí barviva Trypanové modře. Jednalo se o nové rozšíření používaných alternativních metod pro posouzení oční dráždivosti na pracovišti Výzkumného ústavu organických syntéz a.s., Rybitví. V dalším kroku byly získané výsledky porovnány s ostatními vyhodnocovacími metodami použitými v experimentální práci. Účelem korelace získaných výsledků bylo srovnání potenciálu očního podráždění pro nově zavedený test CAM-TBS s toxikologickou zkouškou simulující rohovkovou tkáň, BCOP a s metodou HET-CAM napodobující savčí spojivku, a to včetně lidské. Konečné zhodnocení experimentální práce bylo srovnání citlivosti všech použitých alternativních metod (BCOP, HET-CAM a CAM-TBS) s dohledanými výsledky *in vivo* testů prováděných na laboratorních králících. Pro účely diplomové práce nebyl proveden žádný toxikologický test na zvířatech. Byla zpracovávána data již provedených zkoušek.

2.3.1 Ověření metody CAM-TBS

Ověření metody CAM-TBS bylo provedeno na látkách (viz tabulka 11) se známou oční dráždivostí. Vybrané látky v experimentu měly nedráždivé, mírně dráždivé i leptavé účinky na chorioalantoidní membránu (Hagino et al., 1999; Lagarto et al., 2006). V další fázi bylo provedeno srovnání dvou klasifikačních stupnic pro rozdělení získaných výsledků z ověřované metody CAM-TBS. Pro další sumarizaci a ověření citlivosti alternativních metod bude pracováno již jen s jednou vybranou možností vyhodnocování.

Tabulka 11 - Přehled látek pro ověření alternativní metody CAM-TBS

č.	chemická látka	CAS	skupenství/barva	dráždivost
1	Dodecylsíran sodný	110863-24-6	Pevné/bílé	střední
2	Kyselina mléčná	50-21-5	Kapalné/bezbarvé	střední
3	Kyselina octová	64-19-7	Kapalné/bezbarvé	střední
4	Glycerol	56-81-5	Kapalné/bezbarvé	žádná
5	Ethanol 90%	64-17-5	Kapalné/bezbarvé	silná
6	Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Kapalné/bezbarvé	silná

2.3.2 Ověření citlivosti vybraných alternativních metod oční dráždivosti pomocí výsledků z *in vivo* testování

Spojením více alternativních metod do vhodné testovací strategie by mohlo kompletně nahradit testování oční dráždivosti na zvířatech. Vybranými alternativními metodami této diplomové práce byly tři různé zkoušky. Prvním byl test na izolovaných hovězích rohovkách BCOP, dalším test na chorioalantoidní membráně HET-CAM nahrazující spojivku a poslední použitá metoda byla CAM-TBS, která probíhá na stejném modelu prokrvené membrány jako HET-CAM. U metody vyhodnocené v kombinaci s Trypanovou modří neexistuje definovaný předpoklad o její modelaci k určité části oka. Z modifikace testu lze do jisté míry předpokládat přijatelnost daného modelu pro spojivku. Avšak dle publikovaných studií, které se zabývaly rovněž metodou CAM-TBS, byla pozorována procentuálně vyšší návaznost na zkoušku BCOP, tedy test, který používá rohovkový biologický model.

Výčet použitých látek je uveden v tabulce 12. Do skupiny byly zařazeny jak testování látek v pevném skupenství, tak kapalin. Pro obě modifikace testů prováděných na chorioalantoidní membráně, byla vybraná série chemikálií navíc rozšířena o dvě silně dráždivé/leptavé látky (20% Imidazol a 10% hydroxid draselný). Pro tyto látky nebyly k dispozici výsledky u metody BCOP a testu *in vivo*.

Tabulka 12 specifikuje zvolené chemické látky jejich názvem, identifikačním číslem CAS (Chemical Abstracts Services), primárními fyzikálními vlastnostmi a označením zdrojových informací. Ve většině případů se jednalo o volně dostupné látky zařazené dle nařízení REACH a přístupné na stránkách ECHA. Takové chemikálie byly doplněny kompletním popisem. U ostatních látek, jejichž podkladové informace byly čerpány z dokumentů VUOS a.s., a výsledky studií jsou vlastnictvím zadavatele byl prezentován obecný název bez identifikačního čísla CAS.

Tabulka 12 - Výběr látek pro ověření citlivosti alternativních testů oční dráždivosti

č.	chemická látka/ název	CAS	skupenství/barva	zdroj
1	3-Methyl-1,1-difenyльмоčovina	13114-72-2	pevná látka/bílá až šedá	ECHA
2	dusičnan sodný	7631-99-4	pevná látka/ bílá	ECHA
3	jodid draselný	7681-11-0	pevná látka/ bílá	ECHA
4	dusičnan stříbrný	7761-88-8	pevná látka/ bílá	ECHA
5	1,3-Diethyl-1,3-difenyльмоčovina	85-98-3	pevná látka/ bílá	ECHA
6	octan amonný	631-61-8	pevná látka/ bílá	ECHA
7	dusičnan barnatý	10022-31-8	pevná látka/ bílá	ECHA
8	síran hořečnatý	7487-88-9	pevná látka/ bílá	ECHA
9	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	--	pevná látka/ zelená	VUOS
10	Chloramin-T	149358-73-6 (127-65-1)	pevná látka/ bílá	ECHA
11	Dust, steelmaking	65996-72-7	pevná látka/ hnědošedá	ECHA
12	Direct Black 19	6428-31-5	pevná látka/ černá	ECHA
13	humitan sodný	68131-04-4	kapalina/ tmavě hnědá	ECHA
14	benzyl benzoát	120-51-4	kapalina/ bezbarvá	ECHA
15	xylensulfát sodný (SXS)	1300-72-7	pevná látka/ nažloutlá	ECHA
16	Dimethylformamid	68-12-2	kapalina/ bezbarvá	ECHA
17	adamantan	--	kapalina/ bezbarvá	VUOS
18	Imidazol	288-32-4	kapalina/ bezbarvá	ECHA
19	hydroxid draselný	1310-58-3	kapalina/ bezbarvá	ECHA

Pozn.: VUOS – Výzkumný ústav organických syntéz, a.s.: komerčně testované látky, nelze publikovat detaily.

ECHA – Evropská agentura pro chemické látky: informace o látkách jsou volně přístupné (ECHA, 2020).

V provedených studiích byl kromě popisu podráždění očí navíc zaznamenán i celkový zdravotní stav králíka a jeho změny. Vzhledem ke skutečnosti, že nebylo provedeno žádné testování na zvířatech, je v tabulce 13 spolu se zobrazením výběru látek ukázán i výsledek laboratorních zkoušek oční dráždivosti a leptavosti.

Na skupině vybraných látek byla ověřena citlivost jednotlivých alternativních metod, a to porovnáním jejich výsledků s výsledky *in vivo* metody. Látky byly vybrány k testování na základě dvou parametrů. První možností bylo dohledání výsledků z testování na králících. To znamená mít co nerelevantnější informace o působení zkoušených látek na rohovku, spojivku, duhovku a případná další poškození z průběhu testování. Druhým argumentem bylo vybrání rozmanité skupiny iritantů k charakteristice jejich potenciálu způsobit podráždění očí.

Tabulka 13 - Přehled dráždivých vlastností látek získaných metodou *in vivo* (zdroj: archiv VUOS, ECHA)

č.	chemická látka/ název	podráždění rohovky	podráždění spojivky	jiné léze	Vyhodnocení
1	3-Methyl-1,1-difenyльмоčovina	--	--	--	nedráždí
2	dusičnan sodný	střední	střední	duhovka: mírné podráždění, mžurka: střední podráždění	dráždí
3	jodid draselný	--	mírné až střední	mžurka: mírně	nedráždí
4	dusičnan stříbrný	výrazné	výrazné	otok, slzení	velmi silně dráždí
5	1,3-Diethyl-1,3-difenyльмоčovina	--	mírné	mírné slzení	nedráždí
6	octan amonný	--	mírné	--	nedráždí
7	dusičnan barnatý	--	střední	duhovka: mírné až střední podráždění	dráždí
8	síran hořečnatý	mírné	mírné	duhovka: mírné podráždění	nedráždí
9	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	výrazné	výrazné	duhovka: mírné podráždění	silně dráždí
10	Chloramin-T	výrazné	výrazné	--	silně dráždí
11	Dust, steelmaking	mírné	střední	slzení	nedráždí
12	Direct Black 19	--	mírné	mžurka: mírné podráždění	nedráždí
13	humitan sodný	--	mírný	--	nedráždí
14	benzyl benzoát	--	mírný	--	nedráždí
15	xylensulfát sodný (SXS)	--	střední	mžurka: mírné až střední podráždění	dráždí
16	Dimethylformamid	mírné	výrazné	--	dráždí
17	adamantan	--	mírné až střední	--	mírně dráždí

Pozn.: -- Léze nebyly pozorovány

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo toxikologické testování oční dráždivosti pomocí nové metody, která nebyla dosud zařazena mezi doporučované zkoušky pro testování chemických látek. Citlivost testu byla porovnána s jinými alternativními metodami oční dráždivosti, ale také s výsledky *in vivo* testů na králících.

3.1 Validace a výběr klasifikační tabulky pro metodu CAM-TBS

Metodika experimentální práce je samostatně popsána v kapitole 2.2.3.

3.1.1 Výsledky

Při dvaceti sekundovém vystavení chorioalantoidní membrány testované látce, byla sledována pouze jedna extrémní reakce. Denaturace bílkovin spolu s hemoragií byla pozorována u vzorku č. 5. Celistvost membrány nebyla poškozena ani u jedné replikace testu. Celkové iritační skóre dané chemikálie bylo velmi vysoké (57,95).

Mírnější poškození cév bylo sledováno v různých časových intervalech i intenzitách na vzorcích č. 1, 2, 3 a 6. Nejčastějšími změnami byla vazodilatace a vazokonstrikce cév objevující se v prvním sekundách po aplikaci. U takto porušených cév bylo u části pozorováno i krvácení vzniklé sníženou celistvostí cév. Hodnoty IS se nacházely v rozmezí 7,85 – 15,39. Bez viditelné reakce proběhla aplikace látky č. 4.

Naměřené hodnoty absorbance byly zprůměrovány a vyhodnoceny dle dvou různých klasifikačních stupnic (tabulka č. 9 a 10) uvedených v kapitole 2.2.3 a jsou zobrazeny v tabulce 14. Vyhodnocení validace zkoušky bylo provedeno srovnáním vypočítaného iritačního skóre se známými výsledky a je uvedena níže v tabulce 15

Tabulka 14 - Vyhodnocení naměřených hodnot metody CAM-TBS

č.	chemická látka	hodnota IS	vyhodnocení možnost 1 (dle HET-CAM)	vyhodnocení možnost 2 (Lagarto et al., 2006)
1	Dodecylsírán sodný	7,85	Středně dráždivé	Středně dráždivé
2	10% kyselina mléčná	11,35	Leptavé/silně dráždivé	Středně dráždivé
3	10% kyselina octová	10,62	Leptavé/silně dráždivé	Středně dráždivé
4	Glycerol	0,56	Nedráždivé	Nedráždivé/slabě dráždivé
5	Ethanol 90%	57,95	Leptavé/silně dráždivé	Silně dráždivé
6	Dimethylsulfoxid (DMSO)	15,39	Leptavé/silně dráždivé	Silně dráždivé

Validace metody byla provedena na výběru šesti vzorků a negativní kontroly (fyziologický roztok). Prezentované srovnávací výsledky níže v tabulce 15 byly získány na základě literární rešerše (Hagino et al., 1999; Lagarto et al., 2006). Průměrná hodnota iritačního skóre byla porovnána se známými výsledky. Všech šest vybraných vzorků bylo v toleranci s publikovanými výsledky.

Tabulka 15 - Srovnání vypočítaných hodnot IS s publikovanými výsledky metod CAM-TBS (Hagino et al., 1999; Lagarto et al., 2006)

č.	chemická látka	hodnota IS	publikované výsledky IS	Validace metody
1	Dodecylsíran sodný	7,85	10,09 ± 3,00	v toleranci
2	10% kyselina mléčná	11,35	8,06 ± 3,44	v toleranci
3	10% kyselina octová	10,62	9,03 ± 4,44	v toleranci
4	Glycerol	0,56	1,68 ± 1,17	v toleranci
5	Ethanol 90%	57,95	53,3 ± 12,514	v toleranci
7	Dimethylsulfoxid (DMSO)	15,39	15,15 ± 0,545	v toleranci

3.1.2 Diskuse

Metoda CAM-TBS byla novou modifikací zavedeného testu oční dráždivosti HET-CAM na pracovišti VUOS a.s., Rybitví, která nebyla doposud experimentálně vyzkoušena. Cílem použití této úpravy bylo zajištění objektivnějšího vyhodnocování metody. Postup experimentu byl poměrně jednoduchý. Počáteční odstranění skořápky nad vzduchovou bublinou požaduje určitou manuální zručnost, ale další kroky včetně odkrytí chorioalantoidní membrány nejsou již tak náročné. Testování látek probíhalo na definovaném prostoru membrány, čímž byla snížena variabilita získaných výsledků. Doba kontaktu testovaných látek a Trypanové modři s CAM byla kontrolována na záznamovém zařízení použitého stereomikroskopu. Vyhodnocení metody proběhlo bez subjektivního ovlivnění hodnotitele spektrofotometricky při 595 nm. Poté byla získaná data zprůměrována a dle klasifikace podráždění kategorizována.

Jedním z cílů zkoušky bylo ověření proveditelnosti v laboratorních podmínkách VUOS a.s., Rybitví, na vybraných chemických látkách. Test obsahoval celkově šest vzorků z toho byla jedna pevná látka a zbytek kapaliny. Každá chemikálie byla otestována na čtyřech vejcích. Průměry těchto čtyřech hodnot jsou uvedeny v tabulce 15. Vzhledem k užívání fyziologického roztoku jako média k oplachu a vlhčení testovaných membrán nebyl předpoklad vzniku poškození cév, a proto byl použit jako negativní kontrola. Porovnáním

iritačního skóre ostatních šesti vzorků byla zjištěna úplná shoda s daty experimentálními a publikovanými.

Dalším bodem validace zkoušené metody CAM-TBS byl výběr vhodné klasifikační stupnice k přiřazení míry poškození očí. První tabulka pro vyhodnocení metody byla převzata z aktualizovaného protokolu ICCVAM. Klasifikace získaných hodnot byla od 0 do 21 bodů. Druhou možností posuzování oční dráždivosti látek představovala kategorizace potenciálu míry podráždění dle uvedených stupňů v publikaci Lagarto et al., (2006). Vyhodnocení iritačního skóre prezentovaného ve vybrané publikaci bylo podstatně volnější a nezahrnovalo horní limitující hranici pro kategorizaci látek. Vzhledem k experimentálním výsledkům pohybujících se v rozmezí 0,56 až 57,95 byla vybrána druhá klasifikační stupnice. První nedokáže zařadit případné extrémy vyšší než 21 bodů.

Na základě klasifikační stupnice uvedené v tabulce 10 byla vyhodnocena validace studie. Testování obsahovalo jednu látku nedráždivou až slabě dráždivou s iritačním skóre 0,56 pro glycerol. Tři chemikálie (č. 1, 2 a 3) byly klasifikovány jako středně dráždivé s výslednou hodnotou mezi 7,85 až 11,35. Vzorky č. 5 a 6 o velikosti IS 15,39 a 57,95 odpovídaly silně dráždivým látkám.

Po laboratorním ověření a úspěšné verifikaci bylo možno metodu CAM-TBS použít pro porovnání citlivosti vybraných alternativních metod testování oční dráždivosti.

3.2 Porovnání a ověření citlivosti použitých alternativních metod oční dráždivosti s výsledky *in vivo* testů

Prezentované výsledky alternativních testů oční dráždivosti využívají dva biologické modely, jejich účelem je simulace rohovky a spojivky. Prvním model je izolovaná hovězí rohovka používaná u testu BCOP. Druhým je bohatě prokrvená chorioalantoidní membrána oplozeného kuřecího vejce využívaná metodou HET-CAM. Vzhledem k jejímu subjektivnímu vyhodnocení závislému na zkušenostech hodnotitele byla přidána objektivnější modifikace, která je testována na stejném modelu. Doplněným testem bylo CAM-TBS.

Výsledky alternativních metod jsou dále v samostatných podkapitolách diskutována a porovnávána. Každý alternativní postup má v diskusi uvedenou korelaci s odpovídajícími výsledky *in vivo* testů. Vyhodnocení zkoušek oční dráždivosti na zvířatech je uvedeno

v tabulce 13. Na konci této kapitoly je uvedeno srovnání provedených alternativních testů s výslednými hodnotami oční dráždivosti na zvířatech. Důležitou částí práce bylo porovnání výsledků obou variant zkoušek na chorioalantoidní membráně.

3.2.1 Metoda BCOP

Metodika k alternativnímu testu na hovězích rohovkách byla samostatně popsána v kapitole 2.2.1. Skupina 17 látek (uvedených v tabulce 16) byla vybrána k ověření citlivosti zkoušky BCOP. Pro testování byly vybrány pevné látky i kapaliny. Aplikace byly prováděny v neřaděném stavu k zachování stejných podmínek jako při *in vivo* testech. Každá série zkoušených látek byla doplněna o negativní (0,9% roztok chloridu sodného) a pozitivní kontrolu (20% imidazol pro pevné látky a 100% DMFA pro kapaliny). Vyhodnocení alternativní metody bylo provedeno dle klasifikační stupnice uvedené v tabulce 5.

3.2.1.1 Výsledky

Pevné vzorky (č. 1-12,15) byly aplikovány okénkem v přední komoře držáku na epitelální stranu izolované hovězí rohovky. Po čtyřech hodinách byla testovaná látka omyta roztokem EMEM. U dvou chemikálií (č. 9 a 12) musel být oplach několikrát opakován z důvodu ulpění na povrchu a mírnému obarvení rohovky. Kapaliny (vzorek č. 13, 14, 16, 17) byly aplikovány plnicími otvory přední komory za pomoci pipety o množství 750 μ l. Po 10minutové expozici byly látky odstraňovány EMEM roztokem. Nejdříve byl použit spolu s indikátorem fenolovou červení k detekci zbytků použitých chemikálií a nakonec čistý. Poté byly rohovky ještě 2 hodiny inkubovány a následně proměřeny. Byla sledována míra zákalu rohovky pomocí opacitometru a narušení její celistvosti roztokem fluoresceinu sodného. Opacita byla vyhodnocena na základě rozdílu opacity před a po aplikaci testované látky. Propustnost použitého barviva tkání byla vyhodnocována spektrofotometricky.

Téměř bez projevu zákalu po aplikaci látky byly celkem čtyři vzorky (č. 3, 6, 13 a 14). Naopak i pouhým okem viditelná změna průhlednosti rohovky po vymytí zkoušených látek byla pozorována u chemikálií s číslem 4, 7, 9, 10 a 16. V těchto vyjmenovaných případech byla naměřená hodnota opacity větší než 50.

Permeabilita byla měřena po 90minutové inkubaci, kdy byl roztok fluoresceinu sodného odebrán ze zadní komory, za pomoci absorbance na spektrofotometru. Větší množství prošlého fluoresceinu rohovkou indikující její poškození bylo u vzorků č. 4, 9, 10 a 15.

Ze získaných průměrných hodnot opacity a permeability byla pro každou zkoušenou látku vypočítána hodnota IVIS. Velikost iritačního skóre spolu odpovídající kategorií podráždění je uvedena v tabulce 16. Metoda BCOP dokáže rozlišit pouze látky nedráždivé nebo silně poškozující rohovku. Celkem 8 látek bylo, s hodnotou IVIS menší než 3, klasifikováno jako nedráždivé. Naměřené hodnoty iritačního skóre byly mezi 0,33 až 2,69. Silně dráždivé až leptavé vlastnosti látek (IVIS > 55) byly detekovány u vzorků č. 4, 9 a 10 s výslednými hodnotami potenciálu podráždění 134,06; 129,2 a 76,84.

Tabulka 16 - Výsledky alternativní zkoušky BCOP

č.	chemická látka/ název	hodnota IVIS	Klasifikace oční dráždivosti
1	3-Methyl-1,1-difenylnmočovina	2,69	nedráždivý
2	dusičnan sodný	3,77	nelze hodnotit
3	jodid draselný	1,33	nedráždivý
4	dusičnan stříbrný	134,06	silně dráždivý až leptavý
5	1,3-Diethyl-1,3-difenylnmočovina	2,36	nedráždivý
6	octan amonný	0,33	nedráždivý
7	dusičnan barnatý	42,94	nelze hodnotit
8	síran hořečnatý	4,34	nelze hodnotit
9	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	129,2	silně dráždivý až leptavý
10	Chloramin-T	76,84	silně dráždivý až leptavý
11	Dust, steelmaking	0,33	nedráždivý
12	Direct Black 19	2,34	nedráždivý
13	humitan sodný	0,59	nedráždivý
14	benzyl benzoát	0,67	nedráždivý
15	xylensulfát sodný (SXS)	39,48	nelze hodnotit
16	Dimethylformamid	49	nelze hodnotit
17	adamantan	41,48	nelze hodnotit

3.2.1.2 Diskuse

Touto metodou lze srovnávat pouze krajní případy bezpečnosti látek (nedráždivé a silně dráždivé chemikálie). Porovnáním získaných výsledků s *in vivo* daty byla nalezena shoda u většiny vzorků.

U látek č. 4, 9, 10 způsobující silné poškození očí byla úplná shoda s výsledky na laboratorních králících. Vzorky číslo 1, 3, 5, 6, 11, 12, 13, 14 byly při testování na hovězích rohovkách díky hodnotě IVIS menší než 3 označeny za nedráždivé. Porovnání s *in vivo* metodou byl tento výsledek zcela potvrzen.

Šest testovaných látek s iritačním skóre v intervalu od 3 do 55 nelze vyhodnotit. Použitá metoda BCOP není dostatečně citlivá k posouzení mírného a středního potenciálu poškození

očí. Pro takové případy legislativa nařizuje pokračování na jiných alternativních metodách nebo provést zkoušku na laboratorních králících.

Bylo provedeno ověření citlivosti testu na hovězích izolovaných rohovkách. Na experimentálních výsledcích byla potvrzena schopnost alternativní metody rozlišit testované látky nedráždivé a silně dráždivé až leptavé se 100% přesností. Ostatních šest vzorků s výslednou hodnotou IVIS od 3,77 do 49 nebylo možné vyhodnotit. Odpovídající *in vivo* vzorky byly klasifikovány jako látky nedráždivé, mírně dráždivé a dráždivé.

Porovnání citlivosti testu BCOP s ostatními vybranými alternativními testy je uvedeno na konci kapitoly.

3.2.2 Metoda HET-CAM

Test byl proveden dle metodiky popsané v kapitole 2.2.2. Celkem bylo vybráno pro ověření citlivosti dané zkoušky devatenáct chemikálií. Každý zkoušený vzorek byl testován na třech oplozených vejcích. Do testování byly zařazeny kapaliny i pevné látky.

3.2.2.1 Výsledky

Pevné látky (vzorky č. 1-12 a 15) byly v množství 0,3 g naneseny na chorioalantoidní membránu. Velikost pokryté části byla maximálně polovina povrchu, aby bylo možné sledovat a vyhodnocovat reakce na cévách. Šest vzorků kapalin bylo v množství 0,3 ml aplikováno pipetou na povrch membrány. Ve většině případů byla chemikálie nanesena doprostřed použitého biologického modelu. Výjimkou byly látky barevné, které se opatrně aplikovaly od kraje vejce, aby zbyla viditelná plocha pro vyhodnocení vzniklých lézí. Všechna proběhlá testování byla doplněna negativní (fyziologický roztok) a pozitivní (1% NaOH) kontrolou k ověření získaných výsledků. Iritační skóre a kategorizace zkoušených látek je uvedena v tabulce 17.

Čtyři testované látky měly celkovou hodnotu IS 0 a byly označeny jako nedráždivé. U žádné za čtyř látek nebyla po aplikaci sledována změna celistvosti či tvaru cév. Mírně dráždivé byly dvě chemikálie č. 12 a 14. Jako středně dráždivý byl kategorizován vzorek č. 7. Sledovaným projevem podráždění byla především dilatace cév. V oblasti oční dráždivosti se jedná o poměrně mírné poškození. Toto dokazuje i nízké iritační skóre 1,3; 2 a 5. Na ostatních vzorcích bylo po aplikaci zkoušených látek sledováno více závažnějších lézí. Nejrychleji se projevovalo rozšiřování a zužování cév doprovázené poškozením stěn kapilár a hemoragií. Koagulace byla nejzávažnějším poškozením, které bylo pozorováno po aplikaci

látek č. 4, 16 a 19 spolu s přítomností všech monitorovaných lézí. Vzorky byly klasifikovány jako leptavé / silně dráždivé. IS vyhodnocené skupiny látek bylo mezi hodnotou 9,3 – 21.

Tabulka 17 - Přehled výsledků testování metodou HET-CAM

č.	chemická látka/ název	hodnota IS	Klasifikace oční dráždivosti
1	3-Methyl-1,1-difenylmočovina	0	nedráždivý
2	dusičnan sodný	9,3	leptavý/silně dráždivý
3	jodid draselný	10,7	leptavý/silně dráždivý
4	dusičnan stříbrný	21	leptavý/silně dráždivý
5	1,3-Diethyl-1,3-difenylmočovina	9,3	leptavý/silně dráždivý
6	octan amonný	0	nedráždivý
7	dusičnan barnatý	5	středně dráždivý
8	síran hořečnatý	10,7	leptavý/silně dráždivý
9	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	10	leptavý/silně dráždivý
10	Chloramin-T	19	leptavý/silně dráždivý
11	Dust, steelmaking	0	nedráždivý
12	Direct Black 19	1,3	mírně dráždivý
13	humitan sodný	0	nedráždivý
14	benzyl benzoát	2	mírně dráždivý
15	xylensulfát sodný (SXS)	11,3	leptavý/silně dráždivý
16	Dimethylformamid	16	leptavý/silně dráždivý
17	adamantan	10,7	leptavý/silně dráždivý
18	20% Imidazol	16,5	leptavý/silně dráždivý
19	10% hydroxid draselný	21	leptavý/silně dráždivý

3.2.2.2 Diskuse

Vzhledem k subjektivitě hodnocení vznikajících lézí byl z každého testování pořizován obrazový záznam. Zpětné přezkoumání bylo provedeno u vzorku č. 9. Nalezená kombinace lézí (rozšíření cév a hemoragie) posunuly testovanou chemikálii do kategorie silně dráždivých až leptavých látek.

Dále bylo provedeno srovnání experimentálních dat metody HET-CAM s výsledky testů na zvířatech. Jako velmi silně dráždivé až silně dráždivé chemikálie byly klasifikovány *in vivo* zkouškou pouze 3 testované vzorky (č. 4, 9 a 10) u alternativní metody bylo do kategorie leptavých až silně dráždivých látek zařazeno celkem 12 vzorků. Z tohoto počtu vzorků se látky č. 4, 9 a 10 shodují s výsledky na zvířatech. Extrémním případem poškození byla koroze chorioalantoidní membrány po aplikaci 10% KOH a dusičnanu stříbrném. Při těchto reakcích došlo k rozpadu CAM.

Vzorky č. 2, 7, 15 a 16 byly *in vivo* metodou vyhodnoceny jako dráždivé. Pro takto klasifikované *in vivo* výsledky nelze použít odpovídající vyhodnocovací stupnici metody HET-CAM. Důvodem je odlišný počet stupňů dráždivosti viz tabulka č. 2 a 7. Proto byly výsledky alternativní metody porovnávány i s dílčí reakcí spojivky z testu na zvířatech. Vyhodnocení *in vivo* dráždivosti látek na spojivce u vzorků č. 2, 7 a 15 bylo klasifikováno jako středně dráždivé. Stejného zařazení dle hodnot IS dosáhly i odpovídající vzorky z alternativní metody. Dále byla pozorována shoda mezi výsledky i pro vzorky č. 16. V obou případech bylo pozorované silné podráždění tkáně.

Nedráždivých látek pro oko bylo metodou *in vivo* klasifikováno celkově 9. Shoda s metodou HET-CAM byla pouze ve čtyřech případech u vzorků č. 1, 6, 11 a 13. U zbylých pěti látek bylo nalezeno mírné až střední poškození spojivky u výsledků prováděných na laboratorním zvířeti.

Porovnáním experimentálních dat s *in vivo* testem vyplývá, že používaný alternativní model pro spojivkovou tkáň je metodou citlivější pro látky mírně a středně dráždivé.

3.2.3 Metoda CAM-TBS

Testování citlivosti této nové metody bylo zahájeno až po ověření použitelnosti postupu v podmínkách testovacího pracoviště VUOS a.s. Zkouška byla prováděna dle metodiky uvedené v kapitole 2.2.3. Pro experimenty byla použita stejná skupina látek jako pro metodu HET-CAM. Každá testovaná látka byla proměřena na čtyřech oplozených vejcích. Testované látky byly v odpovídajícím množství aplikovány do prostoru ohraničeného silikonovým kroužkem o průměru 18 mm.

3.2.3.1 Výsledky

Aplikované látky byly po 20 sekundách odstraněny. U vzorku č. 12 byla membrána i přes opakované vymývání lehce zbarvená.

Po oplachu testovaných látek byla do definovaného prostoru na oplozeném vejci nadávkována Trypanová modř. Barvivo bylo po 60 sekundách omyto. Vyjmutá membrána byla vložena do zkumavky s formamidem. Vzorek byl extrahován a odstředěn, aby bylo možné odpipetovat a poté spektrofotometricky vyhodnotit vzniklý roztok při 595 nm. Zprůměrované výsledky čtyř oplozených vajec jsou přehledně uvedeny v tabulce 18.

Vzorky č. 1, 3, 5, 6, 8, 13, 14, 15 a 17 byly klasifikovány jako nedráždivé / slabě dráždivé. Vypočítaná hodnota iritačního skóre byla od 0,02 do 6,01. Jako středně dráždivé chemikálie byly klasifikovány 4 vzorky. Naměřené iritační skóre bylo mezi 7,37 – 11,26. Testované látky č. 9, 12 a 16 měly hodnotu klasifikace potenciálu dráždivosti vyšší než 14,5 a byly zařazeny jako silně dráždivé.

Vzorky č. 4 a 19 nebylo možné vyhodnotit, protože během jedné minuty po aplikaci testovaných látek došlo pokaždé k rozpadu membrány. Látce č. 11 nebyla přiřazena hodnota IS, z důvodu velice nízké absorbance.

Tabulka 18 - Přehled výsledků zkoušky CAM-TBS

č.	chemická látka/ název	hodnota IS	Klasifikace oční dráždivosti
1	3-Methyl-1,1-difenyльмоčovina	0,54	nedráždivá/slabě dráždivá
2	dusičnan sodný	8,48	středně dráždivá
3	jodid draselný	0,02	nedráždivá/slabě dráždivá
4	dusičnan stříbrný	*	*
5	1,3-Diethyl-1,3-difenyльмоčovina	6,01	nedráždivá/slabě dráždivá
6	octan amonný	5,8	nedráždivá/slabě dráždivá
7	dusičnan barnatý	7,55	středně dráždivá
8	síran hořečnatý	4,81	nedráždivá/slabě dráždivá
9	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	17,88	silně dráždivá
10	Chloramin-T	7,37	středně dráždivá
11	Dust, steelmaking	**	**
12	Direct Black 19	134,99	silně dráždivá
13	humitan sodný	2,17	nedráždivá/slabě dráždivá
14	benzyl benzoát	0,86	nedráždivá/slabě dráždivá
15	xylensulfát sodný (SXS)	1,46	nedráždivá/slabě dráždivá
16	Dimethylformamid	22,75	silně dráždivá
17	adamantan	3,66	nedráždivá/slabě dráždivá
18	20% Imidazol	11,26	středně dráždivá
19	10% hydroxid draselný	*	*

*Pozn.: * testovaná membrána se rozpadla, ** výsledek byl mimo oblast kalibrační křivky*

3.2.3.2 Diskuse

Chemické látky č. 4 a 19 nebyly hodnoceny. Důvodem byla koroze membrány, ke které došlo nejpozději při oplachu použité Trypanové modři. Tyto výsledky odpovídají předpokladu, že pro vyhodnocení takto silně dráždivých látek byl použitý model nevhodný.

Vzorek č. 11 také nebyl hodnocen. U testované látky byla naměřena velice nízká absorbance mimo oblast sestavené kalibrační křivky a výrazně nižší, než byl výsledek negativní kontroly. Jednalo se o vzorek prachu, který byl *in vivo* zkouškou hodnocen

na základě mechanického poškození. Vzhledem k povaze vzorku by se dalo také čekat spíše mechanické poškozené testovaného modelu nežli vznik chemického podráždění.

Výsledky zkoušky CAM-TBS byly porovnány s metodou *in vivo* stejně jako testy BCOP a HET-CAM. Jako nedráždivé / slabě dráždivé látky byly klasifikovány vzorky č. 1, 3, 5, 6, 8, 13, 14, 15 a 17. Z toho sedm odpovídalo výsledkům z testování na zvířatech pro kategorii nedráždivé a jeden pro slabě dráždivé. U vzorku č. 15 byl zjištěn rozdíl ve vyhodnocení. *In vivo* testováním byl označen jako dráždivý. Vzorek č. 12 s vypočítaným iritačním skóre 134,99 byl označen za falešně pozitivní výsledek. Jednalo se o barvivo, které nebylo možné dostatečně odstranit z testovacího prostoru, čímž došlo k ovlivnění výsledků. Středně dráždivé látky byly porovnány s dílčím poškozením rohovky a spojivky králíka, jako u metody HET-CAM. Chemikálie č. 2 měla úplnou shodu a vzorek číslo 7 byl shodný s výsledkem podráždění spojivky (rohovka nebyla poškozena). Poslední porovnávaná skupina látek byla klasifikována jako silně dráždivá. Do této kategorie byly při vynechání falešně pozitivního výsledku (látka č. 12) zařazeny dva vzorky s hodnotou IS vyšší než 14,5. Vzorek č. 9 byl v obou testech vyhodnocen jako silně dráždivý. Na rozdíl od chemikálie č. 16, která byla hodnocena na zvířeti pouze jako dráždivá.

Metoda CAM-TBS ukázala velice dobrou predikci při hodnocení látek nedráždivých a slabě dráždivých. Naopak metoda se projevila jako méně vhodná při testování látek barevných. Při vyhodnocení jediného barevného vzorku byl pozorován falešně pozitivní výsledek. Tento test dále není vhodný pro látky korozivní, protože u dvou vzorků došlo k rozpadu testované membrány před vyhodnocením.

3.2.4 Ověření citlivosti použitých alternativních metod oční dráždivosti s výsledky *in vivo* testů

Citlivost toxikologických alternativních metod oční dráždivosti byla sledována na 17 látkách. Souhrnné výsledky *in vivo* testů a třech provedených alternativních zkoušek jsou uvedeny v přehledové tabulce 18.

Porovnáním získaných experimentálních dat s výsledky Draizeho testu je největší shoda sledována u nově zavedené metody CAM-TBS, a to především pro látky nedráždivé až slabě dráždivé. Metoda je relativně vhodná i pro hodnocení silně dráždivých látek. Pro tento typ látek mají vysokou predikční schopnost také druhé dvě alternativní metody.

Výhodou zkoušky BCOP je její mezinárodní validita na úrovni OECD a EU a standardní využití pro silně dráždivé a nedráždivé látky. Pokud je výsledek mezi těmito kategoriemi daná metoda není tak přesná pro jednoznačné vyhodnocení. V tomto případě je třeba provést další alternativní test, například metodou RhCE s 3D tkáňovým modelem dle nařízení REACH. Další možností je metoda HET-CAM, která na rozdíl od testu na izolovaných hovězích rohovkách dokáže kromě silně dráždivých a leptavých látek detekovat i látky středně a mírně dráždivé.

Vzájemné srovnání alternativních metod na základě jejich klasifikačních rozdělení potenciálů dráždivosti je složité. Všechny uváděné zkoušky jsou vyhodnocovány dle svých vlastních kritérií. Rozdíly jsou v počtu kategorií, odlišné citlivosti vyhodnocení či v bodovém hodnocení. Totožné metody nejsou ani při popisu extrémů, kdy je látka nedráždivá a kdy leptavá. I když výsledné kategorie metod nejsou totožné, tak je ze získaných výsledků možné naznačit vhodné vyhodnocovací kombinace pro nahrazení *in vivo* testu anebo porovnat odpovídající stupně dráždivosti mezi sebou.

Srovnáním výsledků metody CAM-TBS s výsledky BCOP byla shoda 52,9 %. Při zahrnutí stupně „nelze hodnotit“ jako slabou a střední dráždivost vzroste procento podobnosti na 76,5 %. S testem HET-CAM byla podobnost nižší, pouze 41,1 %. Naopak při porovnání s Draizeho testem byla sledovaná podobnost o něco vyšší 47,1 %. Přesunutím kategorie střední dráždivosti (u *in vivo* metody se nenachází) CAM-TBS na dráždivost byla podobnost sledovaných metod navýšena na 64,7 %. Vypovídající hodnota testu na chorioalantoidní membráně je omezena jedním falešně pozitivním výsledkem u vzorku číslo 12. Dále u dvou látek chybí vyhodnocení díky rozpadu membrány a výsledku mimo oblasti kalibrační křivky. I přesto, že tři látky nejsou přímo součástí vyhodnocení je s nimi počítáno. Bez započítání těchto chemikálií by v ideálním případě podobnost vzrostla na 88,2 %.

Vhodnou alternativu vyhodnocení by pro *in vivo* metodu byla kombinace testu BCOP s CAM-TBS poskytující shodu 82,4 %.

Tabulka 19 - Souhrnné výsledky vybraných alternativních metod a *in vivo* testů

Vzorek číslo	<i>in vivo</i>	BCOP	HET-CAM	CAM-TBS
1	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
2	dráždí	nelze hodnotit	leptavý/silně dráždivý	středně dráždivý
3	nedráždí	nedráždivý	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
4	velmi silně dráždí	silně dráždivý až leptavý	leptavý/silně dráždivý	*
5	nedráždí	nedráždivý	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
6	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
7	dráždí	nelze hodnotit	středně dráždivý	středně dráždivý
8	nedráždí	nelze hodnotit	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
9	silně dráždí	silně dráždivý až leptavý	leptavý/silně dráždivý	silně dráždivý
10	silně dráždí	silně dráždivý až leptavý	leptavý/silně dráždivý	středně dráždivý
11	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	**
12	nedráždí	nedráždivý	mírně dráždivý	silně dráždivý
13	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
14	nedráždí	nedráždivý	mírně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
15	dráždí	nelze hodnotit	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý
16	dráždí	nelze hodnotit	leptavý/silně dráždivý	silně dráždivý
17	mírně dráždí	nelze hodnotit	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý/slabě dráždivý

Pozn.: * testovaná membrána se rozpadla, ** výsledek byl mimo oblast kalibrační křivky

S literaturou provedené porovnání výsledků použité metody CAM-TBS potvrdilo podobnost s iritačním skóre pro rohovku (Hagino et al., 1999). Tento fakt podpořila také podobnost naměřených hodnot iritačního skóre s testem BCOP, který modeluje rohovku. Snížení variability testu CAM-TBS je dále možné provést zvážením vyjmuté chorioalantoidní membrány (Vinardell a García, 2000). Výhodou uvedené metody je snadné použití, okamžitý výsledek nebo ekonomická dostupnost (Nowak-Sliwinska et al., 2014).

Na problematiku ověření citlivosti metody a případné kombinace alternativních metod k nahrazení *in vivo* testů oční dráždivosti není jednoznačný názor (Scott et al., 2010). Citlivost každé metody závisí hlavně na její specifičnosti pro danou oblast. Dále ji také ovlivňují i fyzikálně-chemické vlastnosti testované látky (McNamee et al., 2009). Vhodná strategie testování má za cíl co nejpřesnější hodnocení testované látky bez potřeby ověření na zvířatech (Hayashi et al., 2012). Pro víceúrovňové testování zkoušených látek jsou doporučovány maximálně tři metody. Příkladem je souběžné použití metod STE a BCOP (Lebrun et al., 2019).

Jednou z cest budoucího vývoje a zpřesnění alternativních metod může být optimalizace aktuálních testů s důrazem na kombinaci různých způsobů vyhodnocení. Příkladem je biologický model CAM, který je používán u metod HET-CAM, CAMVA nebo CAM-TBS. Dále je třeba lépe porozumět mechanismům způsobující podráždění očí a jejich reverzibility (McNamee et al., 2009).

4 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše zaměřená na vývoj a popis alternativních testů oční dráždivosti a leptavosti. V teoretické části byly popsány důvody vzniku systematického toxikologického testování. Dále byl představen výchozí *in vivo* Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti, jehož schopnost odhalit poškození rohovky, spojivky a duhovky se snaží nahradit nové *in vitro*, *ex vivo* a *in silico* testy. Vzhledem k zaměření diplomové práce byly exponované části oka blíže popsány v samostatné kapitole. Práce se také zabývala popisem vybraných skupin alternativních testů. Uvedené metody používaly jako biologický model izolované orgány, 2D a 3D tkáně nebo vaječnou chorioalantoidní membránou.

Cílem experimentální části bylo toxikologické testování oční dráždivosti pomocí alternativních metod, z nichž dvě nebyly dosud zařazeny mezi doporučované zkoušky pro chemické látky. Citlivost jednotlivých alternativních metod byla porovnána s jinými metodami oční dráždivosti, včetně *in vivo* testů na králících. Experimenty prokázaly různou citlivost alternativních metod. Velkým přínosem bylo ověření nové metody CAM-TBS, která se ukázala jako velmi citlivá a v laboratorních podmínkách dobře proveditelná. Bude uvažováno o zavedení tohoto testu mezi standardně komerčně nabízené alternativní metody pracoviště VUOS a.s. Druhá část experimentální práce byla zaměřena na porovnání citlivosti všech použitých metod s výsledky *in vivo* zkoušek.

Výsledky testování nově zavedené metody CAM-TBS měly úplnou shodu s údaji publikovanými v literatuře a test mohl být použit spolu s dalšími dvěma metodami k porovnání a ověření citlivosti testování s *in vivo* daty. Test na izolovaných hovězích rohovkách BCOP potvrdil předpoklad velice dobré predikce pro látky nedráždivé a silně dráždivé až leptavé. Metody HET-CAM a CAM-TBS využívají stejný biologický model prokrvené chorioalantoidní membrány. Subjektivní metoda HET-CAM se ukázala jako vhodná pro testování látek mírně až silně dráždivých.

U metody CAM-TBS byla experimentálně potvrzena vysoká korelace s výsledky testu BCOP 76,5 %. Porovnáním s metodou HET-CAM byla podobnost pouze 41,1 %. Jako vhodná alternativa k *in vivo* testu byla uvedena kombinace metod CAM-TBS a BCOP se shodou 82,4 %.

5 POUŽITÁ LITERATURA

AALTOLA, Elisa. The Philosophy behind the Movement: Animal Studies versus Animal Rights. *Society & Animals* [online]. 2011, **19**(4), 393-406 [cit. 2021-03-25]. ISSN 1063-1119. DOI: 10.1163/156853011X590042

ABDELKADER, Hamdy, Sayed ISMAIL, Amal HUSSEIN, Zimei WU, Raida AL-KASSAS a Raid G. ALANY. Conjunctival and corneal tolerability assessment of ocular naltrexone niosomes and their ingredients on the hen's egg chorioallantoic membrane and excised bovine cornea models. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, **432**(1-2), 1-10 [cit. 2021-04-09]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.063

ADLER, Sarah, David BASKETTER, Stuart CRETON, et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. *Archives of Toxicology* [online]. 2011, **85**(5), 367-485 [cit. 2021-03-26]. ISSN 0340-5761. DOI: 10.1007/s00204-011-0693-2

ADRIAENS, E., J.A. WILLOUGHBY, B.R. MEYER, et al. CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, **49**, 65-76 [cit. 2021-04-06]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.08.002

ADRIAENS, Els, João BARROSO, Chantra ESKES, et al. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Archives of Toxicology* [online]. 2014, **88**(3), 701-723 [cit. 2021-03-14]. ISSN 0340-5761. DOI: 10.1007/s00204-013-1156-8

AKPEK, E K a J D GOTTSCHE. Immune defense at the ocular surface. *Eye* [online]. 2003, **17**(8), 949-956 [cit. 2021-03-20]. ISSN 0950-222X. DOI: 10.1038/sj.eye.6700617

AWWAD, Sahar, Abeer H A MOHAMED AHMED, Garima SHARMA, Jacob S HENG, Peng T KHAW, Steve BROCCINI a Alastair LOCKWOOD. Principles of pharmacology in the eye. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2017, **174**(23), 4205-4223 [cit. 2021-03-17]. ISSN 00071188. DOI: 10.1111/bph.14024

BABICH, Harvey a Ellen BORENFREUND. Applications of the Neutral Red Cytotoxicity Assay to In Vitro Toxicology. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 1990, **18**(1_part_1), 129-144 [cit. 2021-04-06]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119299001800116.1

BADYAL, DineshK a Chetna DESAI. Animal use in pharmacology education and research: The changing scenario. *Indian Journal of Pharmacology* [online]. 2014, **46**(3) [cit. 2021-03-27]. ISSN 0253-7613. DOI: 10.4103/0253-7613.132153

BAGLEY, D.M, D CERVEN a J HARBELL. Assessment of the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) in the COLIPA in vitro eye irritation validation study. *Toxicology in Vitro* [online]. 1999, **13**(2), 285-293 [cit. 2021-04-10]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00089-7

BALLS, Michael, Bas BLAAUBOER, David BRUSICK, et al. Report and Recommendations of the CAAT/ERGATT Workshop on the Validation of Toxicity Test Procedures. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 1990, **18**(1_part_1), 313-337 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119299001800131.1

BALLS, Michael, Patric AMCOFF, Susanne BREMER, et al. The Principles of Weight of Evidence Validation of Test Methods and Testing Strategies. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **34**(6), 603-620 [cit. 2021-03-28]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119290603400604

BARAR J, ASADI M, MORTAZAVI-TABATABAEI SA, OMIDI Y. Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models. *J Ophthalmic Vis Res* [online]. 2009 Oct; **4**(4):238-52 [cit. 2021-03-16]. PMID: 23198080; PMCID: PMC3498862. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498862/>

BARILE, Frank A. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2010, **61**(2), 136-145 [cit. 2021-03-28]. ISSN 10568719. DOI: 10.1016/j.vascn.2010.01.001

BARROSO, João, Uwe PFANNENBECKER, Els ADRIAENS, et al. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology* [online]. 2017, **91**(2), 521-547 [cit. 2021-03-24]. ISSN 0340-5761. DOI: 10.1007/s00204-016-1679-x

BAS, Aurora, Nicole BURNS, Andrew GULOTTA, et al. Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. *Small* [online]. 2021, [cit. 2021-03-30]. ISSN 1613-6810. DOI: 10.1002/sml.202006027

BATISTA-DUHARTE, Alexander, Gisela JORGE MURILLO, Ulpiano Marqués PÉREZ, et al. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. *International Journal of Toxicology* [online]. 2016, **35**(6), 627-633 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1091-5818. DOI: 10.1177/1091581816672187

BÉDARD, Patrick, Sara GAUVIN, Karel FERLAND, Christophe CANEPARO, Ève PELLERIN, Stéphane CHABAUD a Stéphane BOLDUC. Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. *Bioengineering* [online]. 2020, **7**(3) [cit. 2021-04-07]. ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering7030115

BENFENATI, Emilio. Using toxicological evidence from QSAR models in practice. *ALTEX* [online]. 2013, **30**(1), 19-40 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1868596X. DOI: 10.14573/altex.2013.1.019

BENTHALL, J. Animal Liberation and Rights. *Anthropology Today* [online]. 2007, **23**(2), 1-3 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/4620341>

BHANUSHALI, M., V. BAGALE, A. SHIRODE, Y. JOSHI a V. KADAM. An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, **1**(1), 15-31 [cit. 2021-04-06]. ISSN 09761055. DOI: 10.5138/ijaps.2010.0976.1055.01002

BHASKER, Sriramoju, Roy KISLAY, Kanwar K. RUPINDER a Kanwar R. JAGAT. Evaluation of nanoformulated therapeutics in an ex-vivo bovine corneal irritation model. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, **29**(5), 917-925 [cit. 2021-04-03]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.01.007

BITO, Laszlo Z. Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: a hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms, and the choice of experimental animals for eye research. *Experimental Eye Research* [online]. 1984, **39**(6), 807-829 [cit. 2021-03-20]. ISSN 00144835. DOI: 10.1016/0014-4835(84)90079-4

BORCHERS, Andrea T., Frank HAGIE, Carl L. KEEN a M. Eric GERSHWIN. The history and contemporary challenges of the US Food and Drug Administration. *Clinical Therapeutics* [online]. 2007, **29**(1), 1-16 [cit. 2021-03-13]. ISSN 01492918. DOI: 10.1016/j.clinthera.2007.01.006

BRADLAW, J., K. GUPTA, S. GREEN, R. HILL a N. WILCOX. Practical application of non-whole animal alternatives: summary of IRAG workshop on eye irritation testing. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1997, **35**(1), 175-178 [cit. 2021-04-04]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/S0278-6915(96)00110-X

BRANTOM, P.G., L.H. BRUNER, M. CHAMBERLAIN, et al. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [online]. 1997, **11**(1-2), 141-179 [cit. 2021-03-30]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(96)00069-0

BUDAI, Péter, Éva KORMOS, István BUDA, Gergő SOMODY a József LEHEL. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. *Toxicology in Vitro* [online]. 2021, **74** [cit. 2021-04-09]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2021.105150

BURTON, A.B.G. A method for the objective assessment of eye irritation. *Food and Cosmetics Toxicology* [online]. 1972, **10**(2), 209-217 [cit. 2021-03-16]. ISSN 00156264. DOI: 10.1016/S0015-6264(72)80198-6

CALLICOTT, J. B. Animal Liberation. *Environmental Ethics* [online]. 1980, **2**(4), 311-338 [cit. 2021-03-25]. ISSN 0163-4275. DOI: 10.5840/enviroethics19802424

CALLICOTT, J. B. Animal liberation and environmental ethics: back together again. *Between the Species* [online]. 1988, **4**(3), 3 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1703&context=bts>

CASTERTON, P. L., L. F. POTTS a B. D. KLEIN. A Novel Approach to Assessing Eye Irritation Potential Using the Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. 2008, **15**(2), 147-163 [cit. 2021-03-30]. ISSN 0731-3829. DOI: 10.3109/15569529609048870

CAZEDEY, Edith Cristina Laignier, Flávia Chiva CARVALHO, Flávia Angélica Másquio FIORENTINO, Maria Palmira Daflon GREMIÃO a Hériida Regina Nunes SALGADO. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **45**(4), 759-766 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1984-8250. DOI: 10.1590/S1984-82502009000400021

CAZELLE, Elodie, Chantra ESKES, Martina HERMANN, Penny JONES, Pauline MCNAMEE, Menk PRINSEN, Hannah TAYLOR a Marcel V.W. WIJNANDS. Suitability of histopathology as an additional endpoint to the Isolated Chicken Eye Test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. *Toxicology in Vitro* [online]. 2014, **28**(4), 657-666 [cit. 2021-04-03]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.01.010

CHAMBERLAIN, M., S.C. GAD, P. GAUTHERON a M.K. PRINSEN. Irag Working Group 1: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1997, **35**(1), 23-37 [cit. 2021-03-31]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/S0278-6915(96)00100-7

COOPER, K.J, L.K EARL, J HARBELL a H RAABE. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicology in Vitro* [online]. 2001, **15**(2), 95-103 [cit. 2021-03-31]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(00)00060-6

CORVARO, M., S. GEHEN, K. ANDREWS, R. CHATFIELD, F. MACLEOD a J. MEHTA. A retrospective analysis of in vivo eye irritation, skin irritation and skin sensitisation studies with agrochemical formulations: Setting the scene for development of alternative strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2017, **89**, 131-147 [cit. 2021-03-25]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.06.014

CORVI, R., S. ALBERTINI, T. HARTUNG, S. HOFFMANN, D. MAURICI, S. PFUHLER, J. VAN BENTHEM a P. VANPARYS. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* [online]. 2008, **23**(4), 271-283 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0267-8357. DOI: 10.1093/mutage/gen010

COTTIN, M. a A. ZANVIT. Fluorescein leakage test: a useful tool in ocular safety assessment. *Toxicology in Vitro* [online]. 1997, **11**(4), 399-405 [cit. 2021-04-04]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00020-9

CUNHA-VAZ, José. The blood-ocular barriers. *Survey of Ophthalmology* [online]. 1979, **23**(5), 279-296 [cit. 2021-03-20]. ISSN 00396257. DOI: 10.1016/0039-6257(79)90158-9

CURREN, Rodger D., Jacqueline A. SOUTHEE, Horst SPIELMANN, Manfred LIEBSCH, Julia H. FENTEM a Michael BALLS. The Role of Prevalidation in the Development, Validation and Acceptance of Alternative Methods. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 1995, **23**(2), 211-217 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119299502300206

DAVIS, F. A. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Transactions of the American Ophthalmological Society* [online]. 1929, 27, 2-441 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1316745/>

DB-ALM Protocol n° 108 : CAM-TBS Test: Eye Irritation. *EURL ECVAM DATABASE SERVICE ON ALTERNATIVE METHODS TO ANIMAL EXPERIMENTATION: Alternative methods* [online]. 2007 [cit. 2021-04-18]. Dostupné z: http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/108_P_%20CAMTBS%20Test.pdf

DEROUICHE, Mohamed Tahar Taha a Sara ABDENNOUR. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, 45, 393-396 [cit. 2021-04-09]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.05.024

DHOLAKIYA, Sanjay L a Frank A BARILE. Alternative methods for ocular toxicology testing: validation, applications and troubleshooting. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2013, 9(6), 699-712 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1742-5255. DOI: 10.1517/17425255.2013.783013

DICKENS, Michael S., Oliver FLINT, Stephen D. GETTINGS, et al. Framework for Validation and Implementation of In Vitro Toxicity Tests: Report of the Validation and Technology Transfer Committee of the Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing. *Journal of the American College of Toxicology* [online]. 1993, 12(1), 23-30 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0730-0913. DOI: 10.3109/10915819309140619

DONAHUE, D.A., L.E. KAUFMAN, J. AVALOS, F.A. SIMION a D.R. CERVEN. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. *Toxicology in Vitro* [online]. 2011, 25(2), 563-572 [cit. 2021-04-10]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.12.003

DRAIZE, John H.; WOODARD, Geoffrey; CALVERY, Herbert O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 1944, **82**(3), 377-390 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10004944611/>

DUA, H. S. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology* [online]. 1998, **82**(12), 1407-1411 [cit. 2021-03-21]. ISSN 0007-1161. DOI: 10.1136/bjo.82.12.1407

DUSINSKA, Maria, Elise RUNDÉN-PRAN, Jürgen SCHNEKENBURGER a Jun KANNO. Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials* [online]. Elsevier, 2017, s. 51-82 [cit. 2021-03-27]. ISBN 9780128091999. DOI: 10.1016/B978-0-12-809199-9.00003-3

EARL, L.K., A.D. DICKENS a M.J. ROWSON. A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. *Toxicology in Vitro* [online]. 1997, **11**(3), 295-304 [cit. 2021-03-14]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00016-7

ECHA: Registrované látky. *European chemicals agency* [online]. 2020 [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/information-on-chemicals/registered-substances>

EKINS, S., J., MESTRES a B., TESTA. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2007a, **152**(1), 9-20 [cit. 2021-03-26]. ISSN 00071188. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707305

EKINS, S, J MESTRES a B TESTA. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2007b, **152**(1), 21-37 [cit. 2021-03-26]. ISSN 00071188. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707306

EpiOcular™. In: *MatTek LIFE SCIENTES* [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://www.mattek.com/products/epiocular/>

ESKES, Chantra, Ann-Charlotte BOSTRÖM, Gerhard BOWE, et al. Good cell culture practices & in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, **45**, 272-277 [cit. 2021-04-03]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.04.022

FRANCO, N. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals* [online]. 2013, **3**(1), 238-273 [cit. 2021-03-25]. ISSN 2076-2615. DOI: 10.3390/ani3010238

FREEBERG, F. Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundamental and Applied Toxicology* [online]. 1986, **7**(4), 626-634 [cit. 2021-03-14]. ISSN 02720590. DOI: 10.1016/0272-0590(86)90112-0

GAUTHERON, Pierre, Martine DUKIK, Danielle ALIX a Joseph F. SINA. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: An in Vitro Assay of Ocular Irritancy. *Toxicological Sciences* [online]. 1992, **18**(3), 442-449 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1096-6080. DOI: 10.1093/toxsci/18.3.442

GORDON, Sarah. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. *ALTEX* [online]. 2015, **32**(4), 327-378 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1868596X. DOI: 10.14573/altex.1510051

GREGORY-EVANS, Kevin, A. M.A. EMRAN BASHAR a Malcolm TAN. Ex Vivo Gene Therapy and Vision. *Current Gene Therapy* [online]. 2012, **12**(2), 103-115 [cit. 2021-03-27]. ISSN 15665232. DOI: 10.2174/156652312800099607

GRIESINGER, Claudius, Bertrand DESPREZ, Sandra COECKE, Warren CASEY a Valérie ZUANG. Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. ESKES, Chantra a Maurice WHELAN, ed. *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-09-27, s. 65-132 [cit. 2021-03-26]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-33824-8. DOI: 10.1007/978-3-319-33826-2_4

GROSSNIKLAUS, Hans E., Eldon E. GEISERT a John M. NICKERSON. Introduction to the Retina. *Molecular Biology of Eye Disease* [online]. Elsevier, 2015, 383-396 [cit. 2021-03-17]. Progress in Molecular Biology and Translational Science. ISBN 9780128010594. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.001

HAGINO, S., H. ITAGAKI, S. KATO a T. KOBAYASHI. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. *Toxicology in Vitro* [online]. 1993, **7**(1), 35-39 [cit. 2021-04-11]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/0887-2333(93)90110-Q

HAGINO, S, S KINOSHITA, N TANI, et al. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicology in Vitro* [online]. 1999, **13**(1), 99-113 [cit. 2021-04-02]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00065-4

HARBELL, J.W., S.W. KOONTZ, R.W. LEWIS, D. LOVELL a D. ACOSTA. IRAG Working Group 4: Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1997, **35**(1), 79-126 [cit. 2021-04-04]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/S0278-6915(96)00101-9

HARDY, Anthony, Diane BENFORD, Thorhallur HALLDORSSON, et al. Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. *EFSA Journal* [online]. 2017, **15**(8) [cit. 2021-03-28]. ISSN 18314732. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4971

HARNOSS, Julian Camill, Qasim Mahmoud Abu ELRUB, Jin-On JUNG, et al. Irritative potency of selected wound antiseptics in the hen's egg test on chorioallantoic membrane to predict their compatibility to wounds. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2019, **27**(2), 183-189 [cit. 2021-04-08]. ISSN 10671927. DOI: 10.1111/wrr.12689

HARTUNG, Thomas. First alternative method validated by a retrospective weight-of-evidence approach to replace the Draize eye test for the identification of non-irritant substances for a defined applicability domain. *ALTEX* [online]. 2010, 43-51 [cit. 2021-03-14]. ISSN 1868596X. DOI: 10.14573/altex.2010.1.43

HARTUNG, Thomas, Susanne BREMER, Silvia CASATI, et al. A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **32**(5), 467-472 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119290403200503

HAYASHI, Kazuhiko, Taeko MORI, Takayuki ABO, et al. Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicology in Vitro* [online]. 2012, **26**(7), 1199-1208 [cit. 2021-04-29]. ISSN 08872333. DOI:10.1016/j.tiv.2012.06.008

HENDRIKSEN, Coenraad FM. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2014, **8**(3), 313-322 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1476-0584. DOI: 10.1586/14760584.8.3.313

HUH, Dongeun, Geraldine A. HAMILTON a Donald E. INGBER. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology* [online]. 2011, **21**(12), 745-754 [cit. 2021-04-07]. ISSN 09628924. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.005

HUHTALA, A., SALMINEN, L., TÄHTI, H., a UUSITALO, H. Corneal models for the toxicity testing of drugs and drug releasing materials. *Topics in multifunctional biomaterials and devices* [online]. 2008, **1**(2), 1-23 [cit. 2021-03-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Anne-Huhtala/publication/228971270_Corneal_Models_for_the-Toxicity_Testing_of_Drugs_and_Drug_Releasing_Materials/links/004635364ffe50d39c000000/Corneal-Models-for-the-Toxicity-Testing-of-Drugs-and-Drug-Releasing-Materials.pdf

HOON, Mrinalini, Haruhisa OKAWA, Luca DELLA SANTINA a Rachel O.L. WONG. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* [online]. 2014, **42**, 44-84 [cit. 2021-03-31]. ISSN 13509462. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003

ICCVAM. *ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products: The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane Test Method* [online]. In: . 2010, s. 19-26 [cit. 2021-04-09]. Dostupné z: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/invitro-2010/tmer-vol1.pdf

IDAKWO, Gabriel, Joseph LUTTRELL, Minjun CHEN, Huixiao HONG, Zhaoxian ZHOU, Ping GONG a Chaoyang ZHANG. A review on machine learning methods for in silico toxicity prediction. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. 2018, **36**(4), 169-191 [cit. 2021-03-26]. ISSN 1059-0501. DOI: 10.1080/10590501.2018.1537118

INGRE-KHANS, Ellen, Marlene ÅGERSTRAND, Anna BERONIUS a Christina RUDÉN. Reliability and relevance evaluations of REACH data. *Toxicology Research* [online]. 2019, **8**(1), 46-56 [cit. 2021-03-27]. ISSN 2045-452X. DOI: 10.1039/C8TX00216A

JAMIESON, D. Animal Liberation is an Environmental Ethic. *Environmental Values* [online]. 1998, **7**(1), 41-57 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/30302268>

JESTER, J.V, Li LI, A MOLAI a J.K MAURER. Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests. *Toxicology in Vitro* [online]. 2001, **15**(2), 115-130 [cit. 2021-03-31]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(00)00065-5

JESTER, J. V., PETROLL, W. M., BEAN, J., PARKER, R. D., CARR, G. J., CAVANAGH, H. D., a MAURER, J. K. Area and depth of surfactant-induced corneal injury predicts extent of subsequent ocular responses. *Investigative ophthalmology & visual science* [online]. 1998, **39**(13), 2610-2625 [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161815>

JONES, P.A., M. BRACHER, K. MARENUS a H. KOJIMA. Performance of the Neutral Red uptake assay in the COLIPA international validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [online]. 1999, **13**(2), 325-333 [cit. 2021-04-06]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00080-0

JONES, Penny A., Ella BUDYNSKY, Karen J. COOPER, Denise DECKER, Heather A. GRIFFITHS a Julia H. FENTEM. Comparative Evaluation of Five In Vitro Tests for Assessing the Eye Irritation Potential of Hair-care Products. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **29**(6), 669-692 [cit. 2021-04-06]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119290102900606

JOSE, Jobin, S DEEPTHI a D S SANDEEP. Methods for Testing Ocular Toxicity: Current Status. *Research Journal of Pharmacy and Technology* [online]. 2018, **11**(4) [cit. 2021-03-16]. ISSN 0974-3618. DOI: 10.5958/0974-360X.2018.00279.2

KALTENHÄUSER, Johanna, Carsten KNEUER, Philip MARX-STOELTING, Lars NIEMANN, Jens SCHUBERT, Bernd STEIN a Roland SOLECKI. Relevance and reliability of experimental data in human health risk assessment of pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2017, **88**, 227-237 [cit. 2021-03-27]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.06.010

KALUZHNY, Yulia, Miriam W. KINUTHIA, Thoa TRUONG, Allison M. LAPOINTE, Patrick HAYDEN a Mitchell KLAUSNER. New Human Organotypic Corneal Tissue Model for Ophthalmic Drug Delivery Studies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2018, **59**(7) [cit. 2021-04-07]. ISSN 1552-5783. DOI: 10.1167/iovs.18-23944

KALUZHNY, Yulia a Mitchell KLAUSNER. In vitro reconstructed 3D corneal tissue models for ocular toxicology and ophthalmic drug development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. 2021, **57**(2), 207-237 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1071-2690. DOI: 10.1007/s11626-020-00533-7

KANDÁROVÁ, Helena a Silvia LETAŠIOVÁ. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2011, **4**(3) [cit. 2021-03-27]. ISSN 1337-9569. DOI: 10.2478/v10102-011-0018-6

KASE, Robert, Muris KORKARIC, Inge WERNER a Marlene ÅGERSTRAND. Criteria for Reporting and Evaluating ecotoxicity Data (CRED): comparison and perception of the Klimisch and CRED methods for evaluating reliability and relevance of ecotoxicity studies. *Environmental Sciences Europe* [online]. 2016, **28**(1) [cit. 2021-03-27]. ISSN 2190-4707. DOI: 10.1186/s12302-016-0073-x

KAY, G. Healthy Public Relations: The FDA's 1930s Legislative Campaign. *Bulletin of the History of Medicine* [online]. 2001, **75**(3), 446-487 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/44445664>

KELS, Barry D., Andrzej GRZYBOWSKI a Jane M. GRANT-KELS. Human ocular anatomy. *Clinics in Dermatology* [online]. 2015, **33**(2), 140-146 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0738081X. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.006

KO, Kyung Yuk, Hye Lyun JEON, Joohwan KIM, et al. Two tiered approaches combining alternative test methods and minimizing the use of reconstructed human cornea-like epithelium tests for the evaluation of eye irritation potency of test chemicals. *Toxicology in Vitro* [online]. 2020, **63** [cit. 2021-03-28]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104675

KOLLE, Susanne N., Helena KANDÁROVÁ, Britta WAREING, Bennard VAN RAVENZWAAY a Robert LANDSIEDEL. In-house Validation of the EpiOcular™ Eye Irritation Test and its Combination with the Bovine Corneal Opacity and Permeability Test for the Assessment of Ocular Irritation. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019a, **39**(4), 365-387 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119291103900410

KOLLE, Susanne N., Maria Cecilia Rey MORENO, Winfried MAYER, Andrew VAN COTT, Bennard VAN RAVENZWAAY a Robert LANDSIEDEL. The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for the In Vitro Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular Eye Irritation Test and BCOP Test Data According to the UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA Classification Schemes. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019b, **43**(3), 181-198 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119291504300307

LAGARTO, A., R. VEGA, I. GUERRA a R. GONZÁLEZ. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [online]. 2006, **20**(5), 699-702 [cit. 2021-04-11]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.10.003

LEBRUN, Stewart, Yilu XIE, Sara CHAVEZ, Roxanne CHAN a James V. JESTER. An in vitro depth of injury prediction model for a histopathologic classification of EPA and GHS eye irritants. *Toxicology in Vitro* [online]. 2019, **61** [cit. 2021-03-13]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104628

LECLAIRE, Jacques a Odile DE SILVA. Industry experience with alternative methods. *Toxicology Letters* [online]. 1998, **102-103**, 575-579 [cit. 2021-03-30]. ISSN 03784274. DOI: 10.1016/S0378-4274(98)00251-3

LEE, Hyung-yul, Amy L. INSELMAN, Jyotshnabala KANUNGO a Deborah K. HANSEN. Alternative models in developmental toxicology. *Systems Biology in Reproductive Medicine* [online]. 2012, **58**(1), 10-22 [cit. 2021-03-25]. ISSN 1939-6368. DOI: 10.3109/19396368.2011.648302

LEE, Miri, Jee-Hyun HWANG a Kyung-Min LIM. Alternatives to In Vivo Draize Rabbit Eye and Skin Irritation Tests with a Focus on 3D Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium and Epidermis Models. *Toxicological Research* [online]. 2017, **33**(3), 191-203 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1976-8257. DOI: 10.5487/TR.2017.33.3.191

LEICA S8 APO. In: *MIKRO* [online]. [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <http://www.mikro.cz/foto/produkty/283-20140324105623.jpg>

LEIGHTON, J., J. NASSAUER a R. TCHAO. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1985, **23**(2), 293-298 [cit. 2021-04-10]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(85)90031-6

LEMP, M. A., a BLACKMAN, H. J. Ocular surface defense mechanisms. *Annals of ophthalmology* [online]. 1981, **13**(1), 61-63 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/7247160>

LIEBSCH, Manfred, Barbara GRUNE, Andrea SEILER, et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Archives of Toxicology* [online]. 2011, **85**(8), 841-858 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0340-5761. DOI: 10.1007/s00204-011-0718-x

LILIENBLUM, W., W. DEKANT, H. FOTH, et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives of Toxicology* [online]. 2008, **82**(4), 211-236 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0340-5761. DOI: 10.1007/s00204-008-0279-9

LIMONCIEL, Alice. The Past, Present, and Future of Chemical Risk Assessment. BAL-PRICE, Anna a Paul JENNINGS, ed. *In Vitro Toxicology Systems* [online]. New York, NY: Springer New York, 2014,4-9, s. 3-23 [cit. 2021-03-25]. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. ISBN 978-1-4939-0520-1. DOI: 10.1007/978-1-4939-0521-8_1

LLOYD, M H, B W FODEN a S E WOLFENSOHN. Refinement: promoting the three Rs in practice. *Laboratory Animals* [online]. 2008, **42**(3), 284-293 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0023-6772. DOI: 10.1258/la.2007.007045

LOTZ, Christian. Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. *ALTEX* [online]. 2016, 55-67 [cit. 2021-03-14]. ISSN 1868596X. DOI: 10.14573/altex.1508241

LOTZ, C., L. KIESEWETTER, F. F. SCHMID, J. HANSMANN, H. WALLEES a F. GROEBER-BECKER. Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2021-03-25]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-018-33118-2

LUEPKE, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1985, **23**(2), 287-291 [cit. 2021-04-08]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(85)90030-4

LUEPKE, N.P. a F.H. KEMPER. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1986, **24**(6-7), 495-496 [cit. 2021-04-08]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(86)90099-2

MACFARLANE, Martin, Penny JONES, Carsten GOEBEL, et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2009, **54**(2), 188-196 [cit. 2021-03-28]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.04.003

MALHOTRA, Ajay, Frank J. MINJA, Alison CRUM a Delilah BURROWES. Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* [online]. 2011, **32**(1), 2-13 [cit. 2021-03-17]. ISSN 08872171. DOI: 10.1053/j.sult.2010.10.009

MANCERO, Axel, Osvaldo HERNÁNDEZ, Yana GONZÁLEZ, Lizet ALDANA a Onelio CARBALLO. Assessment of skin and eye irritation of 14 products under the stepwise approach of the OECD. *Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. 2008, **27**(3), 173-185 [cit. 2021-03-13]. ISSN 1556-9527. DOI: 10.1080/15569520701712984

MAURER, James K., Ron D. PARKER a James V. JESTER. Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2002, **36**(1), 106-117 [cit. 2021-04-03]. ISSN 02732300. DOI: 10.1006/rtph.2002.1551

MCCALLY, A. W. Corneal ulceration following use of lash-lure. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 1933, **101**(20) [cit. 2021-03-13]. ISSN 0098-7484. DOI: 10.1001/jama.1933.27430450003009c

MCCLELLAN, K.A. Mucosal defense of the outer eye. *Survey of Ophthalmology* [online]. 1997, **42**(3), 233-246 [cit. 2021-03-20]. ISSN 00396257. DOI: 10.1016/S0039-6257(97)00090-8

MCKENZIE, Barbara, Graeme KAY, Kerr H. MATTHEWS, Rachel M. KNOTT a Donald CAIRNS. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **490**(1-2), 1-8 [cit. 2021-04-10]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.023

MCNAMEE, Pauline, Jalila HIBATALLAH, Margit COSTABEL-FARKAS, et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2009, **54**(2), 197-209 [cit. 2021-03-27]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.04.004

MEADOWS, M. A century of ensuring safe foods and cosmetics. *FDA consumer* [online]. 2006, **40**(1), 6-13 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/about-fda/histories-product-regulation/historical-case-studies-food-cosmetics-regulation>

MOUSA, Hazem M., Daniel R. SABAN a Victor L. PEREZ. The cornea IV immunology, infection, neovascularization, and surgery chapter 1: Corneal immunology. *Experimental Eye Research* [online]. 2021, **205** [cit. 2021-03-20]. ISSN 00144835. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108502

MULVEY, Fiona. Eye Anatomy, Eye Movements and Vision. MAJARANTA, Päivi, Hirotaka AOKI, Mick DONEGAN, Dan Witzner HANSEN, John Paulin HANSEN, Aulikki HYRSKYKARI a Kari-Jouko RÄIHÄ. *Gaze Interaction and Applications of Eye Tracking* [online]. IGI Global, 2012, s. 10-20 [cit. 2021-03-17]. ISBN 9781613500989. DOI: 10.4018/978-1-61350-098-9.ch002

MYATT, Glenn J., Ernst AHLBERG, Yumi AKAHORI, et al. In silico toxicology protocols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2018, **96**, 1-17 [cit. 2021-03-26]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2016/918 ze dne 19. května 2016, kterým se pro účely přizpůsobení vědeckotechnickému pokroku mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. In: *Úřední věstník Evropské unie*. Brusel, 2016, L 156. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0918&rid=1>

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1152/2010 ze dne 8. prosince 2010, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku nařízení (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH). In: *Úřední věstník Evropské unie*. Brusel, 2010, L 324, 1152/2010. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R1152&from=CS>

NICHOLS, B., DAWSON, C. R., a TOGNI, B. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* [online]. 1983, **24**(5), 570-576 [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2176685>

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja, Tatiana SEGURA a M. Luisa IRUELA-ARISPE. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* [online]. 2014, **17**(4), 779-804 [cit. 2021-04-08]. ISSN 0969-6970. DOI: 10.1007/s10456-014-9440-7

OECD. *Detailed Review Document on Classification Systems for Eye Irritation/Corrosion in OECD Member Countries* [online]. OECD, 2002 [cit. 2021-03-28]. OECD Series on Testing and Assessment. ISBN 9789264078321. DOI: 10.1787/9789264078321-en

OECD. *Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion* [online]. OECD, 2020a [cit. 2021-03-14]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264185333. DOI: 10.1787/9789264185333-en

OECD. *Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage* [online]. OECD, 2020b [cit. 2021-03-27]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264203846. DOI: 10.1787/9789264203846-en

OECD *Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage* [online]. OECD, 2018 [cit. 2021-04-02]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264203860. DOI: 10.1787/9789264203860-en

OECD. *Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants* [online]. OECD, 2017 [cit. 2021-04-06]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264185401. DOI: 10.1787/9789264185401-en

OECD. *Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage* [online]. OECD, 2019 [cit. 2021-03-26]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264242548. DOI: 10.1787/9789264242548-en

OHNO, Y, T KANEKO, T INOUE, et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro* [online]. 1999, **13**(1), 73-98 [cit. 2021-04-11]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00064-2

OLIVEIRA, I. S., ALEXANDRE-SILVA, G. M., CORDEIRO, F. A., PINHEIRO-JÚNIOR, E. L., FERREIRA, I. G., CERNI, F. A., ZOTTICH, U., a PUCCA, M. B. Research Models in Biomedical Sciences: Advantages and Limitations. *Open Access Journal of Biomedical Science* [online]. 2020, **2**(4) [cit. 2021-03-26]. ISSN 2690487X. DOI: 10.38125/OAJBS.000197

Optický systém oka. In: *WikiSkripta* [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Optick%C3%BD_syst%C3%A9m_oka

PARASCANDOLA, J. The Development of the Draize Test for Eye Toxicity. *Pharmacy in History* [online]. 1991, **33**(3), 111-117 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/41060388>

PEARSON, R.M. In-vitro techniques: can they replace animal testing?. *Human Reproduction* [online]. 1986, **1**(8), 559-560 [cit. 2021-03-26]. ISSN 1460-2350. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136473

PRINSEN, M.K. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1996, **34**(3), 291-296 [cit. 2021-03-28]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00115-8

PRINSEN, M.K. a H.B.W.M. KOËTER. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the draize eye irritation test with rabbits. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1993, **31**(1), 69-76 [cit. 2021-03-24]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(93)90182-X

PRINSEN, Menk K., Coenraad F.M. HENDRIKSEN, Cyrille A.M. KRUL a Ruud A. WOUTERSEN. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2017, **85**, 132-149 [cit. 2021-04-02]. ISSN 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.01.009

REIS MANSUR, Maria Cristina P.P., Suzana Guimarães LEITÃO, Cristal CERQUEIRA-COUTINHO, et al. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2016, **26**(2), 251-258 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0102695X. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.11.006

ROTH, N. a P. CIFFROY. A critical review of frameworks used for evaluating reliability and relevance of (eco)toxicity data: Perspectives for an integrated eco-human decision-making framework. *Environment International* [online]. 2016, **95**, 16-29 [cit. 2021-03-27]. ISSN 01604120. DOI: 10.1016/j.envint.2016.07.011

ROUS, P. a J.B. MURPHY. Tumor implantations in the developing embryo. *J Am Med Assoc.* 1911; 56:741

ROWAN, ANDREW N. The Search for Alternatives. *Toxicological Sciences* [online]. 1984, **4**(4), 508-516 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1096-6080. DOI: 10.1093/toxsci/4.4.508

RUSSELL, W. M. S., a BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique* 1959. Methuen.

SAITO, Kazutoshi, Masaaki MIYAZAWA, Yuko NUKADA, Kyo EI, Takayuki ABO a Hitoshi SAKAGUCHI. Predictive performance of the Short Time Exposure test for identifying eye irritation potential of chemical mixtures. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, **29**(3), 617-620 [cit. 2021-03-25]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.01.008

SAKAGUCHI, Hitoshi, Naoko OTA, Takashi OMORI, et al. Validation study of the Short Time Exposure (STE) test to assess the eye irritation potential of chemicals. *Toxicology in Vitro* [online]. 2011, **25**(4), 796-809 [cit. 2021-04-06]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.01.015

SALINER, A. G., a WORTH, A. P. Testing Strategies for the Prediction of Skin and Eye Irritation and Corrosion for Regulatory Purposes. *EUR 22881* [online] EN. 2007, Luxembourg: OPOCE. [cit. 2021-03-28]; JRC37853. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/testing-strategies-prediction-skin-and-eye-irritation-and-corrosion-regulatory-purposes>

SCHECHTMAN, Leonard M. Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacement): Validation and Regulatory Acceptance Considerations for Alternative Toxicological Test Methods. *ILAR Journal* [online]. 2002, **43**(Suppl_1), S85-S94 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1930-6180. DOI: 10.1093/ilar.43.Suppl_1.S85

Schéma struktur přední části oka. In: *WikiSkripta* [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Rohovka>

SCHRAGE, Arnhild, Susanne N. KOLLE, Maria C. Rey MORENO, Kimberly NORMAN, Hans RAABE, Rodger CURREN, Bennard VAN RAVENZWAAY a Robert LANDSIEDEL. The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test in Routine Ocular Irritation Testing and its Improvement within the Limits of OECD Test Guideline 437. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **39**(1), 37-53 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119291103900119

SCOTT, Laurie, Chantra ESKES, Sebastian HOFFMANN, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, **24**(1), 1-9 [cit. 2021-03-14]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.05.019

SCOTTI, Luciana, Jahan GHASEMI a Marcus T. SCOTTI. Editorial: In Silico Methodologies Applied to Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* [online]. 2018, **21**(3), 150-151 [cit. 2021-03-26]. ISSN 13862073. DOI: 10.2174/138620732103180423125817

SEBASTIAN, E. T. The complexity and origins of the human eye: A brief study on the anatomy, physiology, and origin of the eye. *Senior Honors Theses* [online]. 2010, 116, [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://digitalcommons.liberty.edu/honors/116/>

SECCHI, Antonio a Velika DELIGIANNI. Ocular toxicology: the Draize eye test. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* [online]. 2006, **6**(5), 367-372 [cit. 2021-03-16]. ISSN 1528-4050. DOI: 10.1097/01.all.0000244798.26110.00

SHARMA, KK, T ARORA, V JOSHI, N RATHOR, AK MEHTA, KD MEHTA a PK MEDIRATTA. Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4R's. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **73**(1) [cit. 2021-03-27]. ISSN 0250-474X. DOI: 10.4103/0250-474X.89750

SHARPE, R. The Draize test—Motivations for change. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1985, **23**(2), 139-143 [cit. 2021-03-14]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(85)90005-5

SHAW, A.J., M. BALLS, R.H. CLOTHIER a N.D. BATEMAN. Predicting ocular irritancy and recovery from injury using Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 1991, **5**(5-6), 569-571 [cit. 2021-03-25]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/0887-2333(91)90095-U

SHEASGREEN, John, Mitch KLAUSNER, Helena KANDÁROVÁ a David INGALLS. The MatTek Story — How the Three Rs Principles Led to 3-D Tissue Success! *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **37**(6), 611-622 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119290903700606

SPIELMANN, H., M. LIEBSCH, F. MOLDENHAUER, et al. IRAG Working Group 2: CAM-based assays. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1997, **35**(1), 39-66 [cit. 2021-04-10]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/S0278-6915(96)00103-2

SPIELMANN, Horst, Barbara GRUNE, Manfred LIEBSCH, Andrea SEILER a Richard VOGEL. Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 2008, **60**(2-3), 225-233 [cit. 2021-03-27]. ISSN 09402993. DOI: 10.1016/j.etp.2008.01.012

SREEDHAR D., MANJULA N., Ajay PISE, Shilpa PISE a LIGADE VS. Ban of Cosmetic Testing on Animals: A Brief Overview. *International Journal of Current Research and Review* [online]. 2020, **12**(14), 113-116 [cit. 2021-03-14]. ISSN 22312196. DOI: 10.31782/IJCRR.2020.121424

STEILING, W. The hen's egg test on the chorioallantoic membrane. *The ERGATT/FRAME database of in vitro techniques (INVITTOX) IP-96* [online]. 1994, 1-23 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0960-2194. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/264086638_The_Hens_Egg_Test_on_the_Chorioallantoic_Membrane_HET-CAM

STEPHENS, Martin L. a Nina S. MAK. CHAPTER 1. History of the 3Rs in Toxicity Testing: From Russell and Burch to 21st Century Toxicology. ALLEN, Dave a Mike D WATERS, ed. *Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, s. 1-43 [cit. 2021-03-25]. Issues in Toxicology. ISBN 978-1-84973-652-7. DOI: 10.1039/9781849737920-00001

STOKES, WS. Animals and the 3Rs in toxicology research and testing. *Human & Experimental Toxicology* [online]. 2015, **34**(12), 1297-1303 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0960-3271. DOI: 10.1177/0960327115598410

SYNEK, Svatopluk a Šárka SKORKOVSKÁ. *Fyziologie oka a vidění. 2., dopl. a přeprac.* vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3992-2.

TACKEN, Paul J., I. Jolanda M. DE VRIES, Ruurd TORENSMA a Carl G. FIGDOR. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2007, **7**(10), 790-802 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2173

TAKAHASHI, Yutaka, Mirei KOIKE, Hiroshi HONDA, Yuichi ITO, Hitoshi SAKAGUCHI, Hiroyuki SUZUKI a Naohiro NISHIYAMA. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2008, **22**(3), 760-770 [cit. 2021-04-06]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.11.018

TÖRNQVIST, Elin, Anita ANNAS, Britta GRANATH, Elisabeth JALKESTEN, Ian COTGREAVE, Mattias ÖBERG a Kathrin ELLER. Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(7) [cit. 2021-03-27]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0101638

UBELS, John L. a Daniel P. CLOUSING. In Vitro Alternatives to the Use of Animals in Ocular Toxicology Testing. *The Ocular Surface* [online]. 2005, **3**(3), 126-142 [cit. 2021-03-30]. ISSN 15420124. DOI: 10.1016/S1542-0124(12)70195-7

UNGER, William G, John M BUTLER a David F COLE. Prostaglandin and an increased sensitivity of the sympathetically denervated rabbit eye to laser-induced irritation of the iris. *Experimental Eye Research* [online]. 1981, **32**(6), 699-707 [cit. 2021-03-21]. ISSN 00144835. DOI: 10.1016/0014-4835(81)90019-1

VANDEBRIEL, Rob J. a Henk van LOVEREN. Non-animal sensitization testing: State-of-the-art. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2010, **40**(5), 389-404 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1040-8444. DOI: 10.3109/10408440903524262

VAN DEN BERGHE, C., M.C. GUILLET a D. COMPAN. Performance of porcine corneal opacity and permeability assay to predict eye irritation for water-soluble cosmetic ingredients. *Toxicology in Vitro* [online]. 2005, **19**(6), 823-830 [cit. 2021-04-02]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.04.006

VANPARYS, Ph., Gh. DEKNUDT, M. SYSMANS, G. TEUNS, W. COUSSEMENT a H. VAN CAUTEREN. Evaluation of the bovine corneal opacity-permeability assay as an in vitro alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [online]. 1993, **7**(4), 471-476 [cit. 2021-04-02]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/0887-2333(93)90049-B

VAN ROMPAY, A.R., N. ALÉPÉE, L. NARDELLI, et al. CON4EI: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test (SkinEthic™ HCE EIT) for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, **49**, 11-20 [cit. 2021-04-07]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.06.012

VEGA Montalvo, R., a Álvarez FONG, M. Irritación ocular: Modelos alternativos. *Revista Cubana de Farmacia* [online]. 2001, **35**(3), 211-218 [cit. 2021-03-14]. ISSN 1561-2988. Dostupné z: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475152001000300010&script=sci_arttext&tlng=pt

VERSTRAELEN, Sandra, An JACOBS, Bart DE WEVER a Philippe VANPARYS. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [online]. 2013, **27**(4), 1298-1311 [cit. 2021-04-02]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.02.018

VERSTRAELEN, Sandra, Gareth MAGLENNON, Karen HOLLANDERS, et al. Reprint of “CON4EI: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals”. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, **49**, 53-64 [cit. 2021-04-03]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.03.005

VINARDELL, M.P a L GARCÍA. The quantitative chlorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. *Toxicology in Vitro* [online]. 2000, **14**(6), 551-555 [cit. 2021-04-09]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(00)00050-3

VINARDELL, M.P. a M. MITJANS. Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, **97**(1), 46-59 [cit. 2021-03-25]. ISSN 00223549. DOI: 10.1002/jps.21088

WANG, Siran, Chiara E. GHEZZI, Rachel GOMES, Rachel E. POLLARD, James L. FUNDERBURGH a David L. KAPLAN. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation. *Biomaterials* [online]. 2017, **112**, 1-9 [cit. 2021-04-07]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.030

WAX, Paul M. Elixirs, Diluents, and the Passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1995, **122**(6) [cit. 2021-03-13]. ISSN 0003-4819. DOI: 10.7326/0003-4819-122-6-199503150-00009

WILHELMUS, Kirk R. The Draize Eye Test. *Survey of Ophthalmology* [online]. 2001, **45**(6), 493-515 [cit. 2021-03-13]. ISSN 00396257. DOI: 10.1016/S0039-6257(01)00211-9

WILSON, Samantha L., Mark AHEARNE a Andrew HOPKINSON. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology* [online]. 2015, **327**, 32-46 [cit. 2021-03-14]. ISSN 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2014.11.003

WILSON, Steven E. Bowman's layer in the cornea— structure and function and regeneration. *Experimental Eye Research* [online]. 2020, **195** [cit. 2021-03-20]. ISSN 00144835. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108033

WORTH, Andrew P. a Michael BALLS. The Principles of Validation and the ECVAM Validation Process. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2002, **30**(2_suppl), 15-21 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119290203002S03

YING, Yang, Yang XINGFEN, Zhang WENGAI, et al. Combined In Vitro Tests as an Alternative to In Vivo Eye Irritation Tests. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **38**(4), 303-314 [cit. 2021-04-08]. ISSN 0261-1929. DOI: 10.1177/026119291003800413

YORK, M., a STEILING, W. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. In *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications* [online]. 1998, **18**(4), 233-240 [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199807/08)18:4<233::AID-JAT496>3.0.CO;2-Y

ZANVIT, A., P.A. MEUNIER, R. CLOTHIER, R. WARD a M. BUIATTI-TCHENG. Ocular Irritancy Assessment of Cosmetics Formulations and Ingredients: Fluorescein Leakage Test. *Toxicology in Vitro* [online]. 1999, **13**(2), 385-391 [cit. 2021-04-06]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00084-8

ZHOU, Wei, Yonghua WANG, Aiping LU a Ge ZHANG. Systems Pharmacology in Small Molecular Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(2) [cit. 2021-03-26]. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms17020246

ZUANG, Valérie, Andrew P. WORTH a Michael BALLS. The Role of ECVAM. *The History of Alternative Test Methods in Toxicology* [online]. Elsevier, 2019, s. 95-107 [cit. 2021-03-30]. ISBN 9780128136973. DOI: 10.1016/B978-0-12-813697-3.00013-5