UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019 Ondřej Černík

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Alternativní toxikologické testy v oblasti oční dráždivosti

Ondřej Černík

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2018/2019**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Ondřej Černík**
Osobní číslo:	**C16656**
Studijní program:	**B2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor:	**Ochrana životního prostředí**
Název tématu:	**Alternativní toxikologické testy v oblasti oční dráždivosti**
Zadávající katedra:	**Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši (od roku 2014 včetně) na toxikologickou oblast oční dráždivosti a leptavosti. Pozornost zaměřte především na princip oční toxicity, rozdílnost přístupů in vivo a in vitro, na použití různých alternativních biologických modelů, zejména jejich výhody a nevýhody a na požadavky legislativy pro chemické látky.
2. Získané poznatky doplňte o praktické zkušenosti z experimentálního pracoviště, kde jsou vybrané alternativní metody používány. Popište metodiku zkoušek, omezující faktory a oblast chemických látek, pro které jsou dané zkoušky vhodné.
3. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Petra Plodíková**

Datum zadání bakalářské práce: **8. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 8. února 2019

Prohlašuji:
Tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 7. 2019

Ondřej Černík

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce prof. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. Za odborné vedení, ochotu, pomoc a velkou trpělivost při tvorbě mé práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Petře Plodíkové a Ing. Zdeňce Rösslerové za velikou vstřícnost a pomoc při experimentální části práce a dále také o chuť se podělit o nabrané zkušenosti v dané oblasti dále pak za ochotu a trpělivost. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat svým rodičům za udělenou možnost studování na vysoké škole.

Anotace

V předkládané bakalářské práci byla zpracovávána literární rešerše týkající se alternativních testů v oblasti oční dráždivosti. V experimentální části byla testována oční dráždivost dimethylformamidu a 20 %-ního roztoku imidazolu pomocí metody BCOP na hovězích rohovkách. Bylo zjištěno, že se jedná o látky silně dráždivé, a tedy mohou sloužit jako pozitivní kontrola při aplikaci tohoto testu na dalších látkách.

Klíčová slova

alternativní testy, BCOP, toxikologie, oční dráždivost

Tittle

Alternative toxicological testing of eye irritation

Annotation

In this bachelor thesis, a literature review of alternative tests in the field of eye irritation was elaborated. In the experimental part, the eye irritation of dimethylformamide and 20% imidazole solution was tested using the BCOP method on bovine corneas. They have been found to be highly irritating and thus can serve as a positive control in the application of this test to other substances.

Keywords

Alternative tests, BCOP, toxikology, eye irritancy

Obsah

Úvod....11

1 Teoretická část....12

1.1 Toxikologie jako vědní obor....12

1.1.1 Rozdělení toxikologických zkoušek....13

1.1.1.1 Zkoušky dle doby expozice....14

1.1.1.2 Zkoušky dle použitého modelu pro testování....15

1.1.1.3 Zkoušky dle cesty vstupu....16

1.2 Vývoj alternativních testů v toxikologii....17

1.3 Alternativní testy na koncepci 3R....18

1.3.1 Náhrada pokusných jedinců v testování (Replacement)....19

1.3.2 Snížení počtu zvířat v toxikologických studiích (Reduction)....19

1.3.3 Snížení stresových podnětů pokusných zvířat v rámci testování toxicity (Refinement)....20

1.4 Testy oční dráždivosti....20

1.4.1 Oko – cílový orgán....20

1.4.2 Princip oční dráždivosti....22

1.4.3 Legislativa pro chemické látky....24

1.4.4 Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti metodou *in vivo*....24

1.4.5 Vybraná organotypická skupina alternativních testů pro posuzování oční dráždivosti....25

1.5 Metodika vybraných alternativních zkoušek....26

1.5.1 BCOP – Bovine Corneal Opacity and Permeability (test na izolovaných hovězích rohovkách), OECD TG. 437....26

1.5.2 HET-CAM test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya....26

1.5.3 EpiOcular^{TM} RCE tkáňový model, OECD TG. 492....27

2 Experimentální část....29

2.1 Použité chemikálie a roztoky 29
2.2 Použité přístroje 29
2.3 Výběr rohovek a aplikace alternativní metody BCOP 29
3 Výsledky a diskuse 32
4 Závěr 40
5 Použitá literatura 41

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 Anatomie oční koule [44] 21
Obrázek 2 Struktura složení rohovky [49] 22
Obrázek 3 Dráždivost oka – dotčená místa [50] 23
Obrázek 4 Vzniklá hemoragie cév po aplikaci látky.....27
Obrázek 5 Cévy před aplikací látky 27
Obrázek 6 Vzniklá koagulace cév po aplikaci látky 27
Obrázek 7 Aplikace látek na tkáňový 3D model.....28

Tabulka 1 Výsledky zjištění vhodnosti rohovek pro použití k testu oční dráždivosti.....33
Tabulka 2 Přidělení rohovek k jednotlivým testovaným látkám.....34
Tabulka 3 Vzhled rohovek po vystavení testovaným látkám.....34
Tabulka 4 Výsledky měření prostupu záření skrz exponované rohovky a výpočtu opacit.....35
Tabulka 5 Hodnoty opacit 36
Tabulka 6 Hodnoty permeabilit.....37
Tabulka 7 Stanovené hodnoty IVIS pro jednotlivá testovaní látky.....38
Tabulka 8 Rozhodující kritérium pro rozřazení účinku látek.....38

Seznam zkratek a značek

DMFA	Dimethylformamid
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability – test oční dráždivosti a leptavosti na hovězí rohovce
LD	Letální (smrtelná) dávka
HET-CAM	Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane, test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantiodní membráně kuřecího embrya
3R	Refinement, replacement, reduction – zmírnění, náhrada, snížení
QSAR	Quantitative Structure Aktivity Relationship – predikční metoda pro odhad toxicity
EU	Evropská unie
REACH	Registration, Evaluaiton, Authorisation and Restriction of Chemicals, (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek)
ECHA	European Chemicals Agency – Evropská agentura pro chemické látky
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development, (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
TG	Test guidelines – pokyny pro testování
ICE	The Isolated Chicken Eye Test Method – test oční dráždivosti a leptavosti na izolovaném slepičím oku
IRE	The Isolated Rabbit Eye Test Method – test oční dráždivosti a leptavosti na izolovaném oku králíka
IVIS	*In vitro* irritancy score – in vitro skoré oční dráždivosti
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution – Hankův balancovaný solný roztok
EMEM	Eagle’s Minimum Essential Medium – kultivační médium
UN GHS	The United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals – Globálně harmonizovaný systém OSN pro klasifikaci a označování chemických látek.

Úvod

Toxikologii lze rozdělit do několika oblastí. Jedná se například o klinickou, forenzní nebo průmyslovou toxikologii. Znalosti, potřebné pro pochopení působení látek musí mít multidisciplinární např. z farmacie, lékařství, biologie či analytické chemie. Nejdůležitějším faktorem toxikologického testování je ochrana zdraví člověka, ale také životní prostředí okolo nás. Vlastnosti chemických látek jsou zkoumány jak na bázi biologické – působení cizorodých látek na živé organismy, jejich tkáně, buňky nebo na metabolismus a reakce probíhající uvnitř živých organismů, tak i z důvodů fyzikálně chemických vlastností látek. Pod tímto si lze představit odbouratelnost látek, jejich vzájemné reakce či stabilitu v okolních podmínkách. Chemické látky, jsou všude kolem nás a je jisté to, že ne všechny látky jsou bezpečné nebo určené k použití bez jakéhokoliv omezení. Z tohoto důvodu se systematicky provádí testování bezpečnosti chemických látek. Oblastí, kde je požadována detailní znalost toxikologických účinků chemických látek je několik. Patří sem testování zdravotních prostředků a léčiv, testování látek používaných v domácnostech, průmyslových chemikálií, látek užívaných v zemědělství (jako např. inhibitory či podpůrné látky). Negativní vlastnosti jsou zjišťovány i u produktů lidské činnosti jako jsou zbytky spalin (u stacionárních nebo mobilních zdrojů), odpady z výroby, domácností apod.

Škodlivé působení látek se v počátcích systematické toxikologie zjišťovalo především pomocí pokusných živých zvířat, a to jak při akutní, tak dlouhodobé toxicitě. Vždy se sledovaly různé možnosti vstupu do organismu – orální, dermální, inhalační, intravenózní a další. Cílem bylo a stále je, experiment co nejvíce přiblížit možnému kontaktu člověka s danou zkoušenou látkou. Použití laboratorních zvířat je na základě společenského tlaku postupně nahrazováno použitím vhodných biologických modelů, které musí být schopny dát podobnou odpověď jako původní *in vivo* test. V současné době je tato snaha již požadována legislativně a postupně se počet alternativních metod zvyšuje. V této době již existuje mnoho metod testování, u kterých je nahrazení použití zvířat buď úplně anebo jenom z části. Pro tento účel jsou používány biologické nebo počítačové modely. Také jsou používány nižší organismy jako jsou bakterie.

Účelem této bakalářské práce je popis zmíněných alternativních testů, a to ve specifické oblasti oční dráždivosti. V rámci práce je testováno a porovnáváno toxické působení dvou látek, a to 100% dimethylformamidu (DMFA) a 20% imidazolu, které se používají jako pozitivní kontrola v rámci postupů daných metodikou BCOP TG. 437 (Bovine Corneal Opacity and Permeability).

1 Teoretická část

1.1 Toxikologie jako vědní obor

Dnešní doba si žádá spoustu změn a nejrůznějších inovací v mnoha odvětvích a profesích různých oborů. Není tomu jinak ani ve velice rychle se rozvíjející oblasti toxikologie. Testování látek probíhá už od nepaměti a vyvíjí se ruku v ruce s vývojem civilizace. Nejdříve se jednalo jenom o prosté sledování účinků látek přírodního původu na živé organismy. Poznatky o účincích látek byly dále předávány nejčastěji lidovou slovesností a znalost byla často limitována lokalitou, kde se sledovaný subjekt nacházel. Dále bylo zkoušení látek zpřesňováno a začínaly se používat pojmy jako farmaka či jed. Často se jednalo i o jednu látku, kde mezi podpůrným či negativním vlivem rozhodovala pouze dávka (smrtelná dávka kuchyňské soli – NaCl – cca 200 g) nebo způsob úpravy (solanin – jedovatá látka v zelených bramborách). Pro tento rozvoj toxikologie v podobě, kdy byly předávány zkušenosti nejenom slovesně, ale i písemně, se v průběhu historie zapsalo několik osobností, jako jsou Paracelsus (1493 - 1541), u kterého se objevuje užívání pojmu dávka či M. J. B. Orfila (1787 - 1853) označován jako „otec toxikologie“ a mnozí další [1, 2].

Ve 20. století narostl počet chemických látek, se kterými mohl člověk přijít v běžném životě do styku. Rozmach a vývoj nových sloučenin probíhal hlavně v armádě, dále pak ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. V těchto oblastech byly a stále jsou nejvyšší požadavky na vytváření nových látek. Jedním z důvodů této aktivity byla, a stále přetrvává tvorba syntetických substancí, které by nahradily určité funkční skupiny látek přírodních způsobujících vůni, povzbuzení organismu nebo snížení bolesti (analgetika). Dalším argumentem pro syntetické výroby těchto látek je jejich velké nadužívání, které by se nedalo jenom z přírodních zdrojů zajistit tak, aby pokryly požadavky lidí v globálním měřítku. Poptávka rostla rychleji, nežli nabídka přírodních produktů mohla pokrýt [2, 3].

Zpočátku byl u těchto látek sledován spíše jejich účinek a důsledky či vedlejší projevy bývaly často opomíjeny. V dnešní době jsou požadavky na testování ohledně bezpečnosti či nebezpečnosti látek povinné [3].

Zkoušky toxicity jsou prováděny na odborných toxikologických pracovištích rozmístěných po celém světě. Byla zavedena jednotná pravidla a normy pro prováděné zkoušky. Tím bylo docíleno sjednocení průběhu a výsledků testování. Tento normativní model byl implementován do experimentálních pracovišť pro zajištění reprodukovatelnosti

prováděných laboratorních činností. Dosažení těchto cílů jde souběžně s dodržováním obecných základních pravidel, která jsou rozdělena na tři reprezentativní požadavky [4].

Prvním je přesné popsání způsobu provedení testu, kterým je zajišťována opakovatelnost celé toxikologické studie. V popisu testu musí být zahrnuty části přípravy, průběhu a zakončení testu spolu s jeho vyhodnocením. Tento způsob práce je stejný pro živé organismy i pro chemické látky. Při provádění studie na zvířatech (například při testování na laboratorním potkanovi (Rattus norvegicus)) jsou popisovány podmínky jejich chovu, věk, pohlaví, původ a další. Na to je navazován většinou standardizovaný protokol o průběhu testování (jsou zapisovány hlavně vnější změny zvířete). Vyhodnocení a množství informací nutných k získání od sledovaného subjektu záleží na zaměření experimentu. Nižší organismy na buněčné úrovni jsou sledovány stejně. Specifikum této skupiny organismů zahrnuje popis zdroje, kultivační podmínky či výběr vhodného média. Chemické látky užité při testování by měly být označené dostupným původem včetně čísla šarže. Jsou-li použity v dnešní době moderní nanomateriály, je důležité přidat k testu jejich komplexní popis unikátních fyzikálních vlastností [5, 6].

Druhým základním požadavkem je spolehlivé vyhodnocení výsledků toxikologického zkoumání. Testování obsahující velkou sumu experimentálních dat je nejčastěji statisticky zpracováváno, čímž je získán jasný a přehledný soubor výsledků. Zachování kvality zpracovaných výsledných hodnot je docíleno vhodným výběrem metody a dostatečným popisem získaných výsledků [5, 6].

Posledním nezbytným pravidlem musí být dodržení objektivity informací z provedené toxikologické studie [5, 6].

Jsou-li tyto požadavky experimentální práce dodrženy, bude toxikologie vědou reprezentativní. Takto získané poznatky o toxicitě látek jsou poté sdíleny mezi institucemi a jsou podkladem pro spolupráci a rozvoj oboru [6].

1.1.1 Rozdělení toxikologických zkoušek

Z důvodu rozsáhlosti toxikologie jako multidisciplinární vědy je rozdělení toxikologických testů náročné. Důvodem je velké množství požadovaných informací, které je nutné přehledně diverzifikovat do kategorií. Průřez rozdělení jednotlivých zkoušek toxicity je diskutován níže [7].

1.1.1.1 Zkoušky dle doby expozice

Rozdělení toxikologických zkoušek na základě doby, po kterou je objekt vystaven působení látky lze definovat na [8]:

- Akutní toxicitu – jednorázová či opakovaná expozice, účinek se projeví okamžitě nebo do 24 hodin
- Subakutní toxicitu – opakovaná nebo trvalá expozice, negativní účinky se objeví mezi jedním až dvacátým osmým dnem
- Subchronickou toxicitu – vystavení expozici je stejné jako u subakutní toxicity, nepříznivé účinky nastupují maximálně do 90 dní (doba nepřesáhne 10 % života)
- Chronickou toxicitu – opakovaná nebo stálá expozice, po větší část života sledovaného jedince [8].

Akutní intoxikace organismu je většinou způsobena velkou dávkou xenobiotika nebo užitím malého množství látky, ale s velkou toxicitou za krátký čas. Nepříznivé účinky testované cizorodé látky se projeví ihned po podání první nebo více dávek během 24 hodin [8-10].

Subakutní a subchronická toxicita je oproti akutní intoxikaci organismu dlouhodobější. Díky tomu jsou podávány při experimentu menší dávky cizorodých látek. Delší doba expozice si žádá i vyšší počet použitých zvířat v rámci testování, aby bylo možné sledované parametry vyhodnotit bez zkreslení. V dnešní době je kladen důraz na snížení počtu testovaných zvířat a zároveň jsou používány především menší druhy. Toxikologická studie musí být prováděna na třech různých skupinách, aby bylo docíleno objektivity a spolehlivosti testů. Jedna skupina je pokusná, na kterou je aplikována látka. Další skupina je kontrolní, zvířata jsou vystavena stejným podmínkám jako pokusná, ale není do nich aplikováno xenobiotikum. Poslední je volná skupina, kde jedinci nejsou vystaveni stresujícím činitelům prostředí ani cizorodé látce. Konec experimentu je spojen s usmrcením kontrolní i pokusné skupiny zvířat. Následuje pitva, laboratorní vyšetření jednotlivých orgánů a tělních tekutin a další kroky vedoucí k zjištění toxicity aplikované látky [8-10].

Chronické účinky se projeví po opakovaném vystavení toxickému činiteli, během kterého se v cílovém orgánu (játra, ledviny atd.) nastřádá kritické množství látky. Doba vystavení musí být alespoň většina života pokusného jedince. Rozsah poškození záleží na tom, zda se bude jednat o látky působící na nějaký cílový orgán nebo zda nastanou systémové

změny. Do tohoto dlouhodobého testování látek patří testy specializované např. na karcinogenitu, mutagenitu, teratogenitu či vliv látek ovlivňující reprodukci. Právě poslední druh testování dokáže velice znatelně prodloužit dobu prováděné studie z důvodu aplikace vícegeneračních testů [8-10].

Testy prováděné dlouhodobě jsou časově i finančně náročné a mají velké požadavky na odbornost a kvalitní zdravotní stav laboratorní obsluhy.

1.1.1.2 Zkoušky dle použitého modelu pro testování

Testování toxicity látek může probíhat za různých podmínek, ale většinou se realizují čtyři základní metody [11]:

- *In vivo*
- *Ex vivo*
- *In vitro*
- *In silico*

Toto základní rozdělení dělí zkoušky toxicity a testování látek do modelů, podle kterých se pozná, na jakém principu byl proveden daný experiment, aniž by se znal jeho průběh. Rozezná se provedení na živém organismy, na tkáni z mrtvého jedince, testování v laboratoři na skle či pomocí počítačů na speciálních softwarech. V dnešní době jsou užívány kroky, které omezují používání *in vivo* metod a hledají se odpovídající náhrady ve zbylých metodách. Všechny tyto zkratky mají svůj původ v latinském jazyce a reflektují svoji oblast použití [12].

In vivo je heslo složené ze dvou latinských slov a představuje testování „na živém“. Experiment je prováděn za použití živého organismu, který se nechá vystavit účinkům vybrané látky. Počet, druh, pohlaví, staří, doba aplikace a další podmínky závisí pouze na tom jaká studie se právě provádí, a které podmínky musí být splněny pro správný průběh celé studie. Protože nelze pro všechny látky vzít stejný druh a počet organismů, z toho důvodu, že účinky látek jsou pro každý druh organismu v něčem jiné, je zapotřebí hledat vhodné podobnosti pro zjištění spolehlivých výsledků [11, 13, 14].

Ex vivo znamená testování „mimo živé“. Testování je prováděno mimo organismus, čímž je vyřešen etický problém oproti testování *in vivo*. Důležité je dodržet stabilní a sterilní prostředí po celou dobu přípravy a testu. Pro každý experiment je třeba mít určitou část tkáně, buď celou (např. izolované orgány) anebo jenom část. V této bakalářské práci je dále blíže

popsáno užití dvou testů využívajících tuto metodu. Prvním testováním je BCOP, které nahrazuje dlouho používaný Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti. BCOP test je založen na izolovaných hovězích rohovkách, které pochází z usmrceného skotu. Pro zachování živé tkáně po celou dobu testu byl použit kultivační roztok. Díky této náhradě a vyvinutí alternativní metody bylo ušetřeno od dalších experimentů spoustu albínských králíků. Tento alternativní test zcela nahrazuje Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti. Druhým diskutovaným testem je HET-CAM test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya [15, 16, 17].

In vitro označuje testovací techniky prováděné nejčastěji v lékařství, biologii či v toxikologii. Znamená to „zkoumání na skle“. Testy prováděné touto metodou probíhají nejčastěji ve zkumavkách, Petriho miskách a jiných laboratorních sklech. Předmětem studie mohou být izolované orgány, tkáně ať už vyrobené uměle anebo odebrány neinvazivní zákrokem z živého jedince. Nevýhodou používání této metody u synteticky vyrobených modelů je, že nedokáží reflektovat přesnou buněčnou stavbu a reakci sledované tkáně. Vybraným a blíže dále popsaným testem je EpiOcular^{TM} RCE tkáňový model. Testy na oční dráždivost se provádějí v tomto případě na syntetických modelech [11, 12, 14, 18].

In silico je metoda, založená na počítačových simulacích. Jedná se o velice rychle se rozvíjející obor zkoumání, který je užíván posledních 30 let. Moderní technologie dávají možnost díky speciálním softwarům namodelovat účinky a reakce vybraných látek, díky čemuž je jejich zkoumání rychlejší. Tato metoda má v sobě veliký potenciál, a to z mnoha důvodů. Jednoznačné pozitivum je snížení počtu testů *in vivo* a *in vitro*, následkem čehož, se sníží i užívání zvířat. Dalším kladným přínosem je snadná volba modelových situací. U výkonných modelovacích softwarů je možné si navolit spoustu podmínek, na které by se dalo pří použití skutečného objektu a ostatních metod jenom velice těžko dosáhnout [12, 19, 20].

1.1.1.3 Zkoušky dle cesty vstupu

Cizorodé látky ať už budou chemické, biologické nebo jiného charakteru se mohou do těl organismů dostat 4 základními cestami [21]:

- Inhalačně
- Perorálně
- Dermálně
- Intravaskulárně

Podle vstupu látky do organismu se nedá objektivně předpokládat její toxické působení. Důvodem je to, že každá látka má jiné vlastnosti ať už chemické či fyzikální a obecně předpokládat nejnebezpečnější vstup pro všechny látky nelze. Tento závěr jde udělat pouze pro konkrétní látku, u které budeme znát její chování, reakci či akumulaci v organismu. Existují i další cesty vstupu látek do organismů jako třeba: intramuskulární, intraperitoneální, subkutánní a jiné. Vzhledem k jinému zaměření práce a malému využití těchto metod jsou v práci pouze zmíněny [21].

Inhalačně se do těla mohou dostat látky pomoci dýchací soustavy, která primárně dostává kyslík k životně důležitým orgánům. Nejvíce poškozují dýchací soustavu látky těkavé anebo snadno sublimující. Poškozeným orgánem těmito cizorodými látkami bývá nejčastěji mozek [22–25].

Perorálně přijaté látky se zažívacím traktem dostanou přes tenké střevo do krevního řečiště, kde většina látek začne projevovat své toxické účinky. Jen málo látek začne reagovat již v dutině ústní (hlavně díky krátce strávené době). Příkladem toxikace látkou přijatou trávicím ústrojím je požití jedovatých hub. Účinek se projeví až po chvíli (minuty až dny) a následky jsou poté fatální ve formě systémových otrav u těch nejjedovatějších druhů. Průběh, a tedy i rychlost závisí na tom, zda je trávicí trakt prázdný či jak přijatá látka reaguje na změny pH způsobené přechodem mezi různými částmi zažívání. Vstřebávání cizorodé látky v organismu závisí na ploše střev [26–29].

Dermálně neboli přes kůži se dostávají xenobiotika do krve. Aby se to nestávalo tak často, je mezi tělním a okolním prostředím ochranná membrána – kůže. Jedná se o největší orgán v těle, který zmírňuje dopady nebezpečných látek. Viditelná dermální intoxikace je například zarudnutí pokožky [25, 30].

Intravaskulárně podaná látka má velice rychlý nástup účinku. V krvi může dojít ihned k negativní reakci [31].

1.2 Vývoj alternativních testů v toxikologii

Toxikologické testování látek bylo od svého vzniku závislé na zvířatech. Avšak v dnešní době už tomu tak není a do popředí se dostávají alternativní testy, které splňují koncepci 3R (Replacement, Reduction, Refinement) jakožto základ alternativních testů. [32].

Pro toxikologické testování látek se používají nejčastěji Myš laboratorní (Mus musculus), Potkan laboratorní (Rattus norvegicus), Morče domácí (Cavia porcellus), Křeček zlatý (Mesocricetus auratus), Králík domácí (Oryctolagus cuniculus) a další. Aby mohlo být nějaké zvíře použito k pokusu, je třeba ho brát z chovu speciálně určeného pro testování. V žádném případě nelze brát volně žijící organismy [33].

Příkladem užití laboratorních zvířat k testování účinků toxicity látek slouží mimo jiné tzv. akutní test toxicity. Vzhledem k tomu, že bude prováděn metodou *in vivo* na živých organismech a výsledky se budou vyhodnocovat pomocí LD_{50}, tak pro neznámou látku se počítá s úmrtím jedinců. Letální (smrtelná) dávka LD_{50} je dávka látky, jednorázově podaná pokusným jedincům, která způsobí u 50 % testovaných živočichů úhyn. Počet zvířat, které uhynou nebo budou usmrceny není konečný. Často je nařízeno pro každé testování použít nová pokusná zvířata. To znamená, že když během testu uhyne 50 % jedinců tak zbytek pokusné studie musí být také utracen kvůli způsobenému zdravotnímu poškození nebo vystavení velkému stresu. Stresované zvíře by mohlo negativně ovlivnit výsledky v jiných studiích. Testy způsobující utrpení nebo úmrtí zvířat jako v uvedeném příkladu u LD_{50} byly hlavním důvodem k zavádění nových alternativních testů. Tyto etické důvody vedly k hledání dalších způsobů testování toxicity látek, které by byly rychlé, stejně průkazné a případně i levnější (testování na živých modelech je náročné jak na odbornou obsluhu, tak i z ekonomického hlediska) [34, 35].

Nahrazení zvířat dosud používaných v testech by mělo probíhat pomocí nově vytvořených alternativních testů. Důležitým bodem je zachovat spolehlivost průběhu testování a získání nezkreslených výsledků. V jiném případě by daný test byl nefunkční [36].

Alternativní testování by mělo poskytnout stejnou informační kvalitu o toxicitě dané látky, jako testy klasické, probíhající na zvířatech, avšak za užití nižšího počtu živých pokusných jedinců, způsobení menšího utrpení nebo úplného vyloučení zvířat [32].

Alternativní testy se zaměřují na použití náhradních biologických modelů, syntetických tkání, či matematického modelování [18, 34].

1.3 Alternativní testy na koncepci 3R

První hlasy, které se ozývaly na omezení testů na zvířatech nebyly nijak systematické. Teprve v roce 1959 vychází kniha s názvem „*The principles of humane experimental technique*“ (Principy humánní experimentální techniky) od autorů W.M.S. Russella

a R.L. Burcha [32], kde se objevuje koncepce 3R. Jedná se o zkratku ze tří počátečních písmen anglických slov: Replacement (nahradit), Reduction (snížit počet), Refinement (zjemnit). Snížení použitých jedinců ve zkoušení látek se dá zajistit pomocí naplánovaných a dobře připravených experimentů, například na jednom jedinci lze provést při jedné studii více navzájem si nekonkurujících testů. Také je důležité nevystavovat laboratorní zvířata stresovým a bolestivým situacím. Pokud je to možné, tak provádět testy na nižších organismech [34, 37, 38].

1.3.1 Náhrada pokusných jedinců v testování (Replacement)

Náhradu zvířete lze provést úplně nebo z části. Toto se dá docílit použitím testů *in vitro* nebo *in silico*. Obě tyto metody nahrazují vhodný test jako celek anebo se dají použít k zjištění jenom části informací o zkoumané látce. Když jsou tyto metody použity na počátku testů, tak se ušetří pokusní jedinci, a to proto že je zřejmé, zda látka je toxická či nikoli [37–40].

In vitro metoda používá izolované orgány, kmenové buňky, tkáně, nepotřebný materiál z jatek, nižší organismy aj. [37, 39].

In silico metoda je používána kupříkladu ve farmacii. Pomocí počítačové modelace se provede počáteční screening molekul, kde se nasimulují různé biologické reakce nebo toxické účinky. Toto jednoduché testování pomáhá vybrat do dalších stupňů prověřování jenom ty nejstabilnější molekuly. Jeden z modelů, který takovéto simulace provádí je QSAR (Quantitative Structure Aktivity Relationship), který popisuje vztahy mezi změnou struktury a aktivitou látek. Uplatnění nachází především v chemickém nebo farmaceutickém průmyslu [39, 41].

1.3.2 Snížení počtu zvířat v toxikologických studiích (Reduction)

Redukce pokusných jedinců potřebných k testování je závislá na dobrém návrhu experimentu, odborném zpracování výsledků, použití nejmodernějších měřících technik a sdílení získaných výsledků. Souvisí s tím také omezení opakování provedených pokusů. Obecně proto platí pravidlo: získat více informací od stejného počtu zvířat anebo od menšího počtu jedinců získat srovnatelné výsledky jako z experimentů s větším počtem zvířat [37–40].

1.3.3 Snížení stresových podnětů pokusných zvířat v rámci testování toxicity (Refinement)

Hlavní myšlenka je založena na tom, že organismus, který je ve stresu, dokáže zkreslit výsledky testů (hlavně díky výkyvům hormonální hladiny). V tomto případě by se celý test měl opakovat. Z tohoto důvodu je třeba vytvořit zvířatům co nejlepší životní podmínky a v případě nutnosti jim podávat různá anestetika nebo analgetika pro úlevu od bolesti při toxikologickém testování [37–40].

1.4 Testy oční dráždivosti

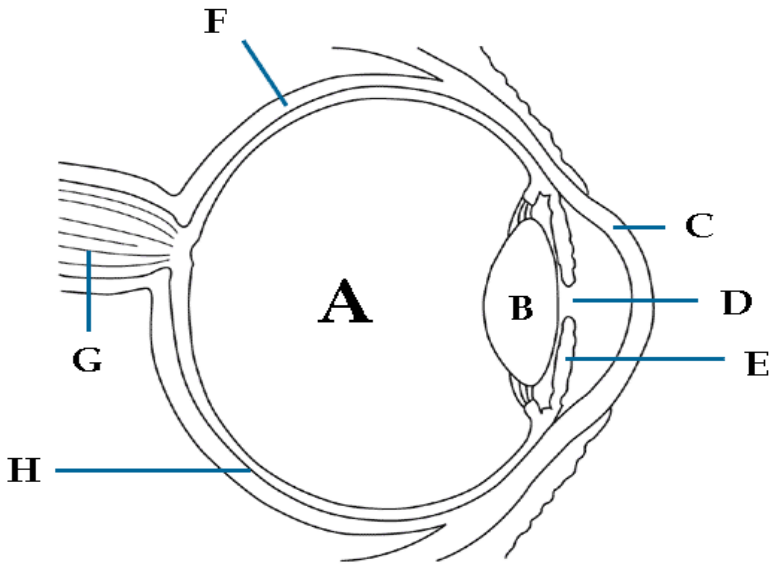
Z důvodu ochrany zdraví a vytvoření bezpečného pracovního prostoru vznikla nutnost testování cizorodých chemických látek, vyvolávající oční dráždivost. Pro ochranu očí je používáno speciálních ochranných pomůcek. Při jejichž užívání je oko do jisté míry chráněno. Látky poškozující zrak mohou být různé fyzikální (pevné, kapalné nebo plynné látky) či chemické (kyseliny, louhy, silná oxidovadla a jiné látky) struktury [42].

Z těchto argumentů vyplynulo kvantum látek, které by mohly poškozovat oči. Díky velké rozmanitosti chemických substancí v oběhu, se kterými se setkáme v průmyslu, lékařství, farmacii, domácnostech a dalších oblastech vznikla potřeba zmapování účinků dostupných a používaných chemických látek [42].

Cílem prováděných testů oční dráždivosti je dokázat možnou toxicitu nebo neutralitu látek. Za pomoci toxikologických, testů, které byly od počátku inovovány a jejich vývoj pokračuje stále dál.

1.4.1 Oko – cílový orgán

Lidské oko je jedním z nejdůležitějších a nejzranitelnějších smyslových orgánů lidského těla. Pomocí něhož, je přijímán a předáván nervový vzruch z oka do mozku, kde se vytvoří zrakový vjem podoby okolí. Jedná se o párový orgán, díky kterému lze vidět trojrozměrné prostředí okolo nás [43]. Model lidského oka je znázorněn na obrázku 1:



A – sklivec

B – čočka

C – rohovka

D – zornice

E – duhovka

F – oční bělmo

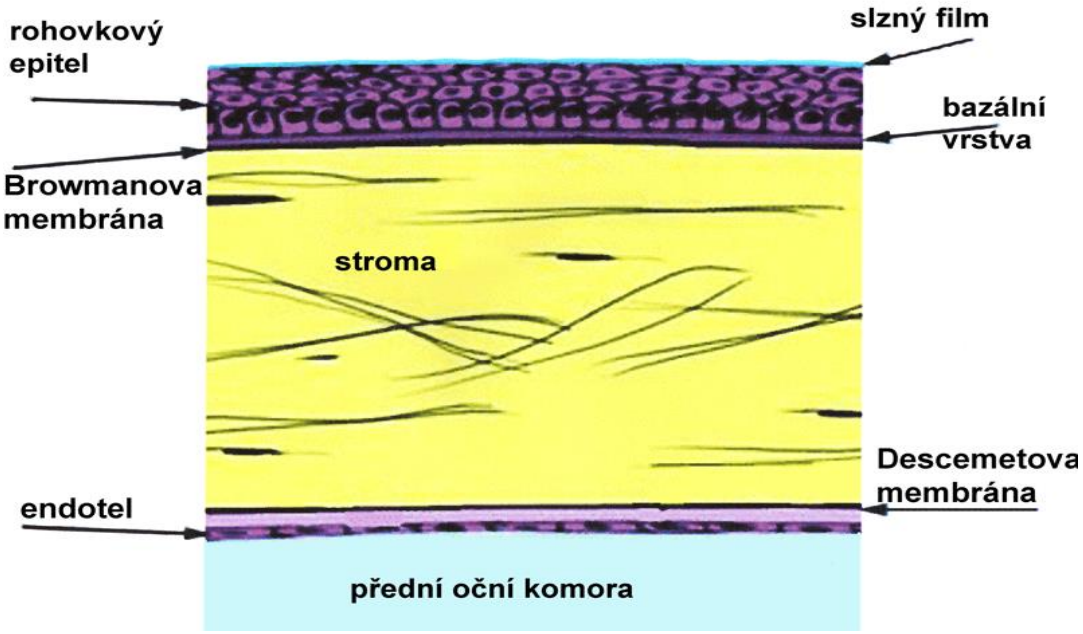
G – zrakový nerv

H – sítnice

Obrázek 1 Anatomie oční koule [44]

Místa, kudy prochází paprsek světla musí být průhledná, aby daný paprsek mohl projít skrze celý prostor oka až k sítnici (H), na které dochází k zaostřování přijatého podnětu (obrazu). Cesta světla okem začíná na rohovce (C), přes kterou prostupuje do oblasti zornice (D), jejíž funkcí je reagovat na sílu přijatého světla pomocí svého roztažení či stažení. Dále světlo postupuje do čočky (B), která má funkci směřovat všechny přijaté paprsky do sítnice (H), a ta nakonec z přijatého světelného vjemu z okolí vytvoří převrácený obraz. Sítnice má své vlastní smyslové buňky, které fungují jako fotoreceptory (tyčinky a čípky). Ze světločivných očních buněk pomocí nervového vzruchu proudí získaný vjem přes zrakový nerv (G) přímo do místa zpracování a otočení obrazu – mozku. Většinu prostoru oční koule zabírá sklivec (A), jehož funkcí je udržení tlaku a tvaru oka. Obsahem sklivce je průhledná, rosolovitá hmota [43, 45, 46, 47].

Rohovka je svrchní průhlednou a pevnou vrstvou oka. Chrání vnitřní části oka před infekcí nebo mechanickým poškozením. Rohovka se skládá z pěti vrstev zahrnujících epitel, Bowmanovu vrstvu, stromu, Descemetovu membránu a endotel [46, 48]. Tyto části jsou zobrazené na obrázku 2.

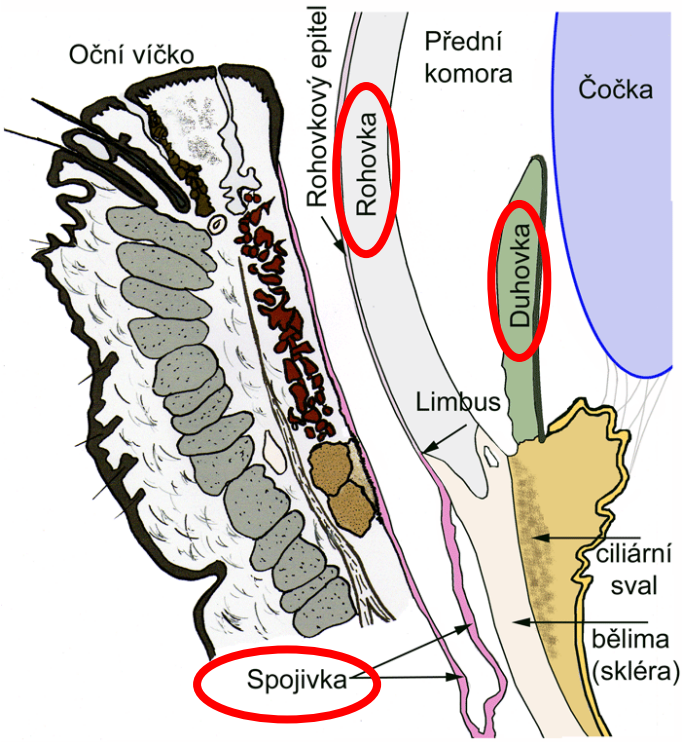


Obrázek 2 Struktura složení rohovky [49]

Rohovkový epitel je první vrstva oka, která je vystavena okolí. Probíhá v něm lom dopadajícího světla. Správné funkci epitelu je docíleno neustálým vlhčením ze slzných kanálků pomocí slzného filmu. Epitel se dokáže na rozdíl od Bowmanovy membrány stále obnovovat. Další vrstvou rohovky je stroma obsahující keratocyty rozptýlené mezi sítěmi kolagenových fibril, rozmístěných pro udržení co největší průhlednosti rohovky. Ideální průhlednost rohovky závisí na obsahu vody v oku. V případě odchýlení od jejího normálního objemu dojde ke změně rozestupů a průměrů stromálních kolagenových fibril, což má za následek negativní ovlivnění rohovky. Regulace obsahu vody stromy je proto důležitá. Poslední vrstvou rohovky je endotel, který se stará o přenos tekutiny a živin [46, 48].

1.4.2 Princip oční dráždivosti

Dráždivé účinky se projeví jen na místech, kam se může dostat cizorodá látka. V případě lidského oka mohou být poškozeny hlavně rohovka, spojivka či duhovka. Na obrázku 3 je znázorněna přesná lokalizace citlivých míst.



Obrázek 3 Dráždivost oka – dotčená místa [50]

Rohovka je přirozenou ochranou bariérou oka před vstupem cizorodých látek. Na jejím povrchu je rohovkový epitel tvořen vrstvami buněk, které mají schopnost se regenerovat. Při menším poškození bude děj reverzibilní, a epitel se dokáže sám obnovit. V případě většího poškození, které nedokáže přirozená obnova buněk napravit je defekt na rohovce dlouhodobý. Podobně negativní ireverzibilní změny jsou vyvolány i porušení endotelu (způsobí i slepotu) [51, 52].

Pod rohovkou se nachází bohatě prokrvená a hodně inervovaná spojivka. Tímto charakterem je již předurčena k vysoké citlivosti na okolní podněty. Pří zánětu, mechanickém nebo chemickém poškození spojivka napuchne, zrudne a spouští velice bolestivé podněty. Funkce spojivky je ochrana oka (produkuje hlen, který je součástí ochranného slzného filmu oka), je zde i centrum imunitních buněk [51, 52].

Duhovka je barevná tkáň obklopující zornici. Jedná se bohatě prokrvenou část oka, která dokáže stahem svého svalstva regulovat velikost zornice a tím pádem i množství prošlého slunečního svitu na oblast sítnice. Poškození duhovky znamená omezení reakce zornice na světlo, které vede k poškození kvality zraku [51, 52].

1.4.3 Legislativa pro chemické látky

Laboratorní činnosti, pro testování chemických látek jsou upravovány legislativou, jejímž obsahem je správná laboratorní praxe, která musí být institucemi dodržována. Patří sem jak požadavky na laboratorní pracovníky (tvoření záznamů z testování, provádění experimentu podle normy a jiné), tak i pro chemické látky (chemická látka je zkoumána v takovém stavu, ve kterém je uváděna na trh) [53].

Popis testování toxických látek spolu s rozdělením metod shrnují také právní předpisy EU – Evropské unie. Nařízení Evropské komise jsou implementována do Sbírky zákonů České republiky [54].

Testování nebezpečnosti a toxicity látek je prováděno stále především na zvířatech. Je nutné mít v legislativě pravidla, které se budou při experimentálních činnostech s pokusnými zvířaty dodržovat. Sem patří zachování vhodných životních podmínek, minimalizace vzniku bolesti či stresu, což je zajišťováno tlumivými medikamenty a další. Laboratorní pracovníci musí být proškoleni pro práci s pokusnými zvířaty, a musí vlastnit aktuální oprávnění k provádění testování [55].

Informace o vlastnostech látek vyrobených, dovezených nebo používaných na území Evropské unie jsou shromažďovány a hodnoceny dle nařízení REACH – Registration, Evaluaiton, Authorisation and Restriction of Chemicals (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek). Hodnotícím a regulujícím orgánem vlastností a možných rizik chemických látek je ECHA – Evropská agentura pro chemické látky [56-58].

1.4.4 Draizeho test oční dráždivosti a leptavosti metodou *in vivo*

Historicky prvním systematickým testem pro oční toxicitu látek byl Draizeho test oční dráždivost a leptavosti publikovaný v roce 1944 [59]. Jedná se o validovaný test pod záštitou Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj – OECD TG. 405 [60]. Testování akutní oční toxicity touto metodou je standardizované a slouží k ověření či hodnocení nových alternativních zkoušek, které již nepoužívají do testů živá pokusná zvířata [61].

K testování se užívají albínští králíci. Počet testovaných jedinců závisí na druhu studie. Obvykle je používáno 3 a 6 králíků. Testovaná látka je při vědomí králíka aplikovaná do jednoho oka a druhé je ponecháno pro kontrolu. Průběžné zapisování a hodnocení zkoušky probíhá po 1, 24, 48 a 72 hodině od aplikace látky. V případě potřeby zjištění reverzibility

reakce látky na oko je test prodloužen až na 21 dní. Během této doby jsou sledovány: zakalení rohovky, podráždění, zčervenání nebo opuchnutí spojivek a další. Všechny tyto fyziologické změny jsou zaznamenávány a porovnávány s normativním bodovacím systémem. Po skončení testu je pokusný králík usmrcen a vlastnosti látky jsou vyhodnoceny dle metodiky [61].

Tato *in vivo* metoda je schopná při jednom testování charakterizovat komplexní účinky látky na oko. Při provádění testu je získána jak reakce rohovky, tak i spojivky. Další výhoda je možnost testování kapalných i pevných látek. Nevýhodou testování na živých zvířatech je provádění testování na živých jedincích, dále pak náročná obsluha, podmínky na prostor a jiné [60, 62, 63].

Níže popsané alternativní metody při testování nevyužívají živých zvířat, což je výhodou, ale pro získaní výsledků jako z Draizeho testu je třeba provést více testů, díky užšímu zaměření metod. Obvykle jen na jednu část oka [64, 65].

1.4.5 Vybraná organotypická skupina alternativních testů pro posuzování oční dráždivosti

Alternativní testy jsou prováděné na různých očních modelech. Mezi které patří také testy organotypické, kde testování oční dráždivosti probíhá na izolovaných orgánech. Seznam používaných testů je zobrazen níže [64, 65].

- BCOP – Bovine Corneal Opacity and Permeability, test na izolovaných hovězích rohovkách. Tato metoda je blíže popsána v metodice vybraných alternativních testů a v experimentální části této.
- HET-CAM test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya. Test je blíže popsán v metodice vybraných testů.
- Test na izolovaných kuřecího očích (ICE)
- Test na izolovaných králičích očích (IRE) [64, 65].

Výhodou těchto modelů jsou objektivní výsledky, použití živých tkání, simulace *in vivo* testu či rychlé provedení. Nevýhoda modelů spočívá v jejich specifikaci pouze na jednu testovanou věc, a to rohovku nebo spojivku. Neposkytnou komplexní informaci o toxické látce [64, 65].

1.5 Metodika vybraných alternativních zkoušek

V rámci laboratorní praxe ve Výzkumném ústavu organických syntéz a.s., Pardubice, bylo pracováno se 3 různými alternativními testy. Všechny tři testy byly zaměřené na stejnou oblast lokální toxikologie. Jednalo se o zjišťování oční toxicity látek za pomocí testů: BCOP – test byl prováděn na izolovaných hovězích rohovkách, EpiOcular^{TM} RCE – testování probíhalo na uměle vyrobeném tkáňovém modelu a HET-CAM – testu oční dráždivosti na prokrvené choriolantanoidní membráně kuřecího embrya [64, 65].

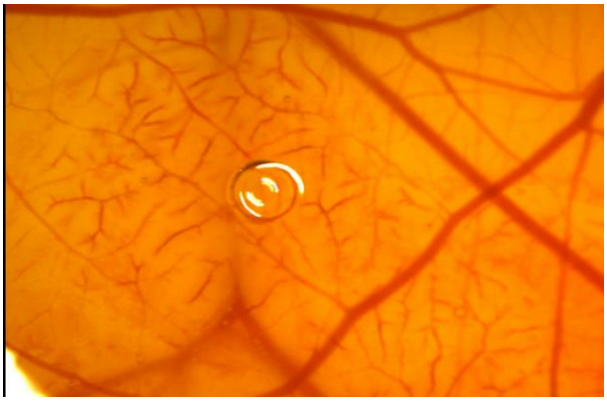
1.5.1 BCOP – Bovine Corneal Opacity and Permeability (test na izolovaných hovězích rohovkách), OECD TG. 437

Jedná se o testovací metodu na izolované hovězí rohovce, která dokáže po krátkou dobu od vyjmutí z poraženého býka zachovávat normální biochemické a fyziologické funkce. Vyhodnocení probíhá kvantitativně za pomoci změření změn opacity (množství prošlého světla rohovkou) a permeability (množství barviva fluoresceinu sodného prošlého přes rohovku). Naměřené údaje byly pomocí empiricky odvozeného vzorce převedeny na *In Vitro* Irritancy Score (IVIS). Tento vztah slouží pro stanovení míry toxicity sledovaných látek v testu [15].

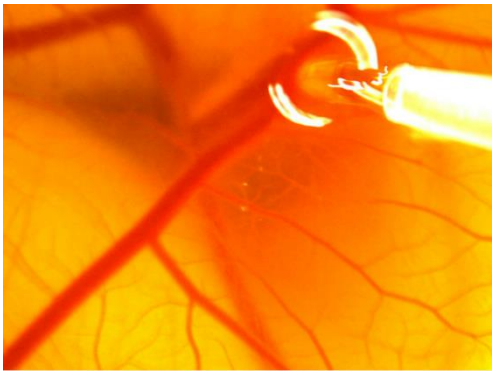
Tímto testem nelze zjistit reakci testovaných látek na spojivky. Pro získaní informací o působení zkoumaných látek na spojivku je třeba provést doplňující test (např. HET – CAM test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya). Dále se tento test nepoužívá pro lipofilní barviva, z důvodu barvení rohovky a znehodnocení testu. Vysoko viskózní látky se obtížně dostávají z rohovky, proto se pro tento test také nevyužívají [15].

1.5.2 HET-CAM test oční dráždivosti na prokrvené chorioalantoidní membráně kuřecího embrya

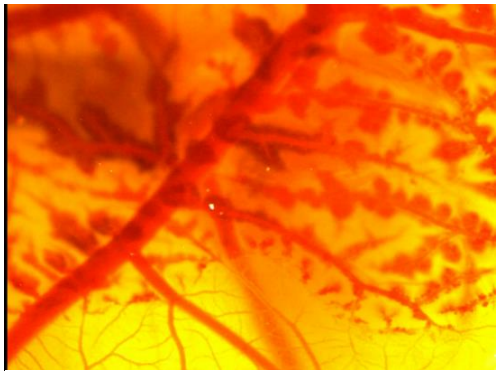
Toto testování využívá chorioalantoidní membránu fertilizovaného slepičího vajíčka jako vhodného organotypického modelu, pro alternaci spojivkové tkáně oka. Detekce škodlivých zkoumaných látek probíhá na cévách chorioalantoidní membrány. Zde se také identifikuje vzniklá hemoragie (Obr. 4) či koagulace, která je sledována pomocí stereoskopického mikroskopu. Na obrázku 5 jsou znázorněny cévy před působením látek, na obrázku 6 pak jsou dokumentovány změny po jejich aplikaci [51, 64, 65].



Obrázek 4 Vzniklá hemoragie cév po aplikaci látky



Obrázek 5 Cévy před aplikací látky

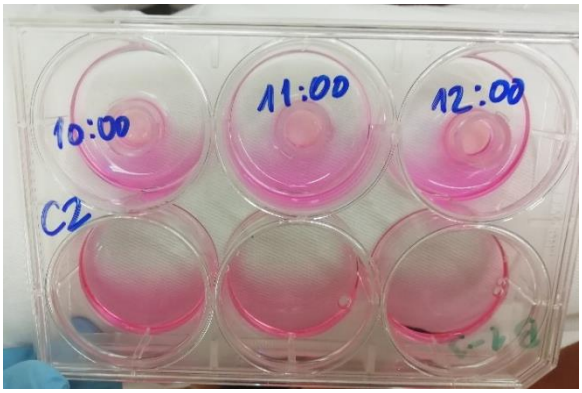


Obrázek 6 Vzniklá koagulace cév po aplikaci látky

Experiment je prováděn devátý den inkubace slepičího vejce, kdy ještě není zcela vyvinuta nervová tkáň kuřecího embrya. V těchto testech se upřednostňují látky nerozpuštěné a neředěné. Omezujícím faktorem je hmotnost zkoumaných látek, která nesmí být větší než 0,3 g [51, 64, 65].

1.5.3 EpiOcular™ RCE tkáňový model, OECD TG. 492

Testovaní cizorodých látek probíhá u této metody na povrchu trojrozměrného modelu rohovkového epitelu (Obr. 7). Výsledek experimentu je hodnocen pomocí životaschopnosti buněk, která je indikována metabolizací žlutého barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid). To se v přítomnosti živých buněk redukuje na formazan, který má modrou barvu. Tato změna se sleduje spektrofotometricky [67].



Obrázek 7 Aplikace látek na tkáňový 3D model

Tuto metodu není vhodné používat pro nestabilní látky (např. těkavé). Dalším problémem jsou možné reakce mezi testovanou látkou a MTT. Testovacími látkami mohou být jak kapaliny, tak pevné látky [67].

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a roztoky

V experimentu bylo použito těchto chemických látek a roztoků: HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution – Hankův balancovaný solný roztok); EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium – kultivační médium); 0,9% roztok NaCl; 100% DMFA (dimethylformamid); 20% Imidazol v 0,9% roztoku NaCl; 5% fluorescein sodný a fenolová červeň.

2.2 Použité přístroje

- Opacita byla měřena pomocí opacitometru MC2 (Le spécialise du laboratoire, France).
- Permeabilita byla stanovována pomocí UV/VIS spektrofotometru (Spectrophotometer GENESYS ™ 10 UV/VIS Scanning).

2.3 Výběr rohovek a aplikace alternativní metody BCOP

Pro experimentální část práce, byla zvolena metoda sledování oční dráždivosti a leptavosti BCOP na izolovaných hovězích rohovkách. Důvodem, vybrání tohoto alternativního testu byla jeho spolehlivost a časté provádění na experimentálním pracovišti Výzkumného ústavu organických syntéz a.s.

V rámci experimentální části práce byly ověřovány dráždivé účinky dvou chemických látek na části oka – rohovce. Zkoumanými látkami byly 100% dimethylformamid a 20% imidazol v 0,9% roztoku chloridu sodného, které jsou používány jako pozitivní kontroly pro kapalné respektive pevné látky. Tyto látky jsou užívány pro potvrzení účinků daného testu.

Testovacím objektem byly oči zdravého skotu, který byl určen ke zpracování pro potřeby potravinářského průmyslu. Oční bulvy měly jednotný průměr a sílu rohovky. Věk hovězího dobytka byl mezi jedním až pěti lety.

Odběr očí byl prováděn na jatkách co nejdříve po usmrcení zvířete z důvodu minimalizace poškození oční rohovky. K omytí opatrně vyjmutých hovězích očí by neměl být použit detergent. Byla použita čistá voda.

Při převozu hovězích očí do laboratoře byla dodržena opatření k zamezení jejich kontaminace. Toho bylo docíleno pomocí chladícího media. Hovězí oči byly umístěny v roztoku HBBS (Hanks' Balanced Salt Solution – fyziologický roztok), který obsahoval antibiotika (penicilin – 100 IU/mL a streptomycin – 100 μg/mL) k zamezení bakteriální infekce. Vše bylo uloženo v termosce se suchým ledem.

Aby byla zachována rohovka skotu pro testování v neporušeném stavu je třeba zkrátit čas mezi odběrem a testováním na minimum. To znamená nutnost provádět zkoušky toxicity v den odběru hovězích očí.

Na provedení experimentu bylo zapotřebí vybrat devět rohovek splňujících vstupní podmínky neporušeného stavu.

Po přijetí do laboratoře byla vizuálně zkontrolována evidentní poškození očí. Důraz byl kladen na poškrábání, vzniklého neopatrným zacházením či na neovaskularizaci. Dále se dostaly jenom ty bez vnějšího poškození, které by bylo okem patrné. Vybrané rohovky byly vyříznuty z hovězího oka s 2-3 mm lemem bělima. Následně byly instalovány do speciálních držáků. Držák je složen z přední a zadní komory, kde obě tyto části byly naplněny předehřátým (32 ± 1 °C) kultivačním roztokem EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) – zadní komora byla plněna jako první. Poté byla provedena preinkubace při 32 ± 1 °C po dobu jedné hodiny, čímž se dosáhlo normální metabolické aktivity rohovek a po uplynutí inkubační doby bylo provedeno vnější přezkoumání a byla změřena základní opacita rohovek. Zjevně znehodnocené rohovky škrábanci, pigmentací atd. byly z experimentu vyřazeny. Vyloučené byly také ty rohovky, u kterých byla naměřena změna základní opacity o více než 7 jednotek.

Pro vlastní testování zkoušených kapalných látek bylo použito speciálních držáků, které se skládaly ze dvou komor (přední a zadní), jejichž vstupní a výstupní stěny byly díky skleněným sklíčkům propustné pro světelné záření. V horní části byly komory opatřeny uzavíratelnými plnícími otvory. Testované rohovky byly umístěny mezi tyto komory. Nakonec bylo vše vodotěsně spojeno.

Přední komora byla plněna testovanou látkou, zadní pak fyziologickým kultivačním roztokem. Konkrétně v této práci ve třech předních komorách byl umístěn roztok DMFA, další tři byly naplněny 20% imidazolem v 0,9% roztoku NaCl a zbývající byly využity jako negativní kontrola, na které byl aplikován 0,9% roztok NaCl.

Rohovky nainstalované v držácích byly vystaveny testovaným látkám po dobu čtyř hodin umístěných v inkubátoru o teplotě 32 ± 1°C.

Po skončení inkubace byly testované látky odstraněny z předních komor a následoval oplach rohovek médiem EMEM s barvivem fenolovou červení. Epitel rohovek byl opláchnut nejméně 3krát. Další oplachování záleželo na tom, zda měnil použitý indikátor svoji barvu (žlutá nebo purpurová). Nakonec byly rohovky opláchnuty kultivačním roztokem bez fenolové červeně. Následně bylo provedeno měření opacity po aplikaci látek.

Po skončení měření opacity byla provedena výměna kultivačního roztoku v přední komoře za fluorescein sodný. V zadní komoře byl ponechán roztok EMEM, který byl pouze obnoven. Poté byly držáky inkubovány při teplotě 32 ± 1°C ve svislé poloze po dobu 90 minut. Jakmile byla dokončena inkubace bylo zjištěno množství prošlého fluoresceinu sodného za pomoci měření absorbance při vlnové délce 490 nm.

3 Výsledky a diskuse

Výsledky testování oční dráždivosti 100% DMFA a 20% imidazolu jsou zobrazeny v přiložených tabulkách 1 až 8. Získané hodnoty byly zpracovávány dle metodiky pro dané testování [15]. Výsledná hodnota IVIS sloužila k posouzení oční dráždivosti chemických látek.

Testování dle normy vyžaduje odpovídající kvalitu vstupního materiálu – rohovek. Ty se jednak nejdříve posuzují vizuálně a dále na základě objektivního měření světelného záření prošlého skrz rohovky. V tabulce 1 jsou uvedeny získané poznatky. Z tabulky je zřejmé, že ze všech 20 rohovek byla viditelně poškozena pouze jedna (rohovka č. 17). Byla mechanicky poškrábaná. Na základě objektivního spektrálního měření byly určeny další čtyři nevyhovující rohovky číslo 7, 10, 15 a 18. Toto bylo rozhodnuto na základě skutečnosti, že přepočítaná hodnota I_{ref} byla vyšší než hodnota I_x [15], podle následujících vztahů:

$$(Iref)\ Lux = \frac{I_0}{1{,}1651}$$

Příklad výpočtu pro rohovku č. 1:

$$(Iref)\ Lux = \frac{1119}{1{,}1651} = 960\ Lux$$

Příklad porovnání hodnot u rohovky číslo 1:

$$(Iref)\ Lux\ < (I_x)\ Lux$$

$$960\ Lux\ < 1032\ Lux$$

Rohovka může být použita pro testování oční dráždivosti a leptavosti, jelikož je 1032 větší než 960 a splňuje tak podmínku danou metodikou.

Tabulka 1 Výsledky zjištění vhodnosti rohovek pro použití k testu oční dráždivosti

Číslo držáku	Vzhled před inkubací	Naměřené hodnoty iluminace (I_0) Lux	Přepočítaná hodnota (Iref) Lux	Základní iluminace (I_x) Lux	Hodnocení možnosti testování
1	bn	1119	960	1032	ano
2	bn	1098	942	1009	ano
3	bn	1089	935	1027	ano
4	bn	1094	939	993	ano
5	bn	1123	964	1007	ano
6	bn	1128	968	1033	ano
7	bn	1122	963	869	ne
8	bn	1127	967	1020	ano
9	bn	1095	940	1005	ano
10	bn	1045	897	885	ne
11	bn	1079	926	999	ano
12	bn	1065	914	982	ano
13	bn	1085	931	977	ano
14	bn	1055	906	979	ano
15	bn	1087	933	905	ne
16	bn	1097	942	985	ano
17	_	1	1	0	ne
18	bn	1097	942	857	ne
19	bn	1087	933	971	ano
20	bn	1119	960	1032	ano

Vysvětlivky: bn – bez nálezu; – rohovka byla poškozena; (I_0) – zářivý tok prošlý skrz kapalinu EMEM; (Iref) Lux – vypočítaná hodnota; I_x – zářivý tok prošlý skrz instalovanou rohovku v držáku; ** pokud je základní iluminace menší než (Iref) je rohovka z testu vyřazena.

Z 15 rohovek, které vyhovovaly potřebám testování bylo upotřebeno k vlastním experimentům pouze devět. Jejich rozdělení k jednotlivým testům přináší tabulka 2.

Tabulka 2 Přidělení rohovek k jednotlivým testovaným látkám

Číslo rohovky	**Testovaná látka**
1 **2** **3**	**0, 9% NaCl**
4 **5** **6**	**100% DMFA**
8 **9** **11**	**20% Imidazol v 0,9% roztoku NaCl**

Následující tabulka 3 dokumentuje pozorované změny na rohovkách po 4 hodinovém působení testovaných látek. Z tabulky je vidět, že u DMFA a 20% imidazolu v 0,9% roztoku NaCl došlo k viditelnému poškození rohovek, projevující se jejich zakalením. Tento stav byl na místě, jelikož se látky používají jako pozitivní kontrola. Při působení zředěného roztoku chloridu sodného k poškození nedošlo. Tato látka slouží jako negativní kontrola.

Tabulka 3 Vzhled rohovek po vystavení testovaným látkám

Aplikovaná látka	**Rohovka č.**	Vzhled po expozici
0,9% NaCl	**1**	Bez makroskopického poškození
	2	Bez makroskopického poškození
	3	Bez makroskopického poškození
100% DMFA	**4**	Poškození rohovky
	5	Poškození rohovky
	6	Poškození rohovky
20% Imidazol v 0,9% roztoku NaCl	**8**	Poškození rohovky
	9	Poškození rohovky
	11	Poškození rohovky

Po odstranění testovaných látek z přední komory držáku a jejich náhradě za fyziologický roztok EMEM, byla zjišťována propustnost světelného toku skrz membrány. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4. Sloužily následně pro výpočet opacity podle obecného vztahu z metodiky BCOP [15].

Příklad výpočtu počáteční opacity je následující:

$$\boldsymbol{Opacita}_{\boldsymbol{OP-KIT}} = \frac{\frac{\boldsymbol{I_0}}{\boldsymbol{I_X}} - \mathbf{0,9894}}{\mathbf{0,0251}}$$

I_0 – hodnota iluminace (z tab. 1) – držák s kapalinou, bez rohovky

I_X – změřená iluminace (z tab. 1) – držák s kapalinou, s rohovkou

Ukázka použitého výpočtu pro opacitu:

$$\boldsymbol{Opacita}_{\boldsymbol{OP-KIT}} = \frac{\frac{\mathbf{1119}}{\mathbf{1032}} - \mathbf{0,9894}}{\mathbf{0,0251}} = \mathbf{3,78}$$

Výsledné hodnoty opacity jsou zobrazeny v tabulce 4

Tabulka 4 Výsledky měření prostupu záření skrz exponované rohovky a výpočtu opacit

Aplikovaná látka	Rohovka č.	Počáteční iluminace	Hodnota základní opacity	Iluminace po aplikaci	Hodnota opacity po aplikaci
0,9% NaCl	1	1032	3,78	1020	4,29
	2	1009	3,94	1007	4,02
	3	1027	2,83	1020	3,12
100% DMFA	4	993	4,47	340	88,77
	5	1007	5,01	329	96,57
	6	1033	4,09	349	89,35
20% Imidazol v 0,9% NaCl	8	1020	4,60	412	69,56
	9	1005	3,99	427	62,75
	11	999	3,61	384	72,53

V tabulce jsou znázorněny hodnoty zářivého toku přepočtené na opacitu rohovky, a to jak pro inkubaci fyziologickým roztokem, tak po aplikaci testovaných látek.

Na základě vypočtených hodnot opacit základních a po aplikaci se vyhodnotil jejich rozdíl, který po zprůměrování pak sloužil pro určení výsledné hodnoty IVIS. Tyto dílčí údaje jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Hodnoty opacit

Aplikovaná látka	**Rohovka č.**	**Opacita po aplikaci**	**Základní opacita**	**Rozdíl opacity**	**Průměrný rozdíl opacity**	**Průměrná opacita (zpřesněna)**
0,9% NaCl	**1**	4,29	3,78	0,51	**0,29**	-
	2	4,02	3,94	0,09		
	3	3,12	2,83	0,29		
100% DMFA	**4**	88,77	4,47	84,30	**87,04**	(87,04 – 0,29) **86,75**
	5	96,57	5,01	91,56		
	6	89,35	4,01	85,26		
20% Imidazol v 0,9% NaCl	**8**	69,56	4,60	64,96	**64,21**	(64,21 – 0,29) **63,92**
	9	62,75	3,99	58,76		
	11	72,53	3,61	68,92		

Dalším sledovaným ukazatelem vedle opacity byla permeabilita, která je taktéž parametrem potřebným pro výpočet výsledných hodnot IVIS. Pro jednotlivé testované látky jsou tyto hodnoty v tabulce 6.

Tabulka 6 Hodnoty permeabilit

Aplikovaná látka	**Rohovka č.**	**Hodnoty permeability absorbance (490 nm)**	**Průměrná permeabilita**	**Průměrná permeabilita přepočtená**
0,9% NaCl	**1** **2** **3**	0,001 0,001 0,029	**0,01**	-
100% DMFA	**4** **5** **6**	0,711 0,476 0,729	**0,639**	(0,639-0,01) **0,628**
20% Imidazol v 0,9% NaCl	**8** **9** **11**	2,437 2,410 2,428	**2,425**	(2,425-0,01) **2,415**

Propustnost byla měřena pomocí roztoku fluoresceinu sodného prošlého do zadní komory za pomocí UV/VIS spektrofotometru. V tabulce 6 jsou zaneseny výsledky z měření každé sledované skupiny testovaných látek. Zjištěné hodnoty permeability se zprůměrovaly. Poté byla od hodnot testovaných látek odečtena permeabilita zředěného roztoku chloridu sodného, která byla provedena kvůli zpřesnění výsledků. Získané údaje jsou podkladem pro výpočet hodnot IVIS, pro které platí:

IVIS = průměrná hodnota opacity + (15 x průměrná hodnota permeability (490 nm)) [15]

Ukázka výpočtu IVIS pro roztok 0,9% NaCl je následující:

IVIS = 1,92 + 15 x 0,05 = 2,67

Vypočítané hodnoty pro jednotlivé testované látky jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7 Stanovené hodnoty IVIS pro jednotlivá testovaní látky

Aplikovaná látka	**IVIS**	
	Výpočet	**Výsledek**
0,9% NaCl	0,29 + 15 x 0,01	**0,44**
100% DMFA	86,75 + 15 x 0,628	**96,17**
20% Imidazol v 0,9% NaCl	63,92 + 15 x 2,415	**100,145**

Celý výpočet zobrazený v tabulce 7 byl proveden dle platných pravidel a podle aktuální normy [metodika]. Ze získaných výsledků bylo možné stanovit míru nebezpečnosti (toxicity) testované látky dle jejího zařazení do kategorie dle následující tabulky 8.

Tabulka 8 Rozhodující kritérium pro rozřazení účinku látek

IVIS	**Kategorie (UN GHS*)**
≤ 3	Kategorie 0
>3 ≤ 55	Bez přesného zařazení
> 55	Kategorie 1

* UN GHS - The United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (Globálně harmonizovaný systém OSN pro klasifikaci a označování chemických látek)

Na základě uvedeného systému jsou definovány jednotlivé kategorie následovně [15]:

- UN GHS Kategorie 0: Chemické látky, které nesplňují požadavky pro klasifikaci pro: UN GHS Kategorie 1 nebo 2

- UN GHS Kategorie 1: „Vážné poškození očí“

- UN GHS Kategorie 2: „Podráždění očí“[15].

Závěrem experimentální práce lze konstatovat, že roztok 0,9% NaCl, splnil daný předpoklad a žádné poškození nenastalo. Bylo to potvrzeno výpočtem hodnoty IVIS, která byla 2,67. Je-li tato hodnota menší nežli 3, nespadá látka do nebezpečných látek dráždících oční rohovku. Roztok DMFA, o kterém je známo, že rohovku leptá měl číselnou hodnotu IVIS 100,145. Tento zjištěný údaj odpovídá dle UN GHS – zařazení do Kategorie 1 – kdy látka způsobuje – „Vážné poškození očí“. Poslední testovanou látkou byl 20% Imidazol v 0,9% roztoku NaCl, který má stejné předpoklady k leptání rohovky jako předešlá látka. Vypočítaný údaj IVIS 96,17 potvrdil daný předpoklad. Bylo tak potvrzeno, že je pro oči toxický. Také spadá podle UN GHS – do Kategorie 1 – „Vážné poškození očí“.

Dosažené výsledky potvrzují, že jak dimethylforamid, tak 20 %-ní roztok imidazolu v 0,9 %-ním NaCl působí vážné poškození očí a jsou tedy oprávněně používány k pozitivní kontrole při testování oční dráždivosti jinými látkami.

4 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na alternativní metody v prokazování toxických účinků chemických látek na oko, které je citlivým smyslovým orgánem. V teoretické části bakalářské práce byl popsán model oka, se speciálním zaměřením na místa, která mohou být poškozena. Byly popsány negativní důsledky styku rohovky, spojivky a duhovky s cizorodou látkou. Rohovka byla popsána samostatně znovu, a to z důvodu jejího použití při testování oční dráždivosti v experimentální části bakalářské práce. Dále se práce věnuje popisu vývoje toxikologie spolu s důvody vzniku alternativních testů, které omezují užívání zvířat při experimentech. Této eliminaci dopomohla také koncepce 3R, jejíž smysl spočívá v omezování, nahrazování a zlepšování životních podmínek pokusných zvířat. Dále byly toxikologické zkoušky rozděleny podle doby expozice, použitého modelu či cesty vstupu toxických látek do organismu. Posledním bodem teoretické části je prezentace vybraných testů oční dráždivosti, které se provádějí na Výzkumném ústavu organických syntéz a.s., kde byla prováděna experimentální část bakalářské práce.

V experimentální části byla testována oční dráždivost dimethylformamidu a 20 %-ního roztoku imidazolu pomocí metody BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) na hovězích rohovkách. Jako negativní kontrola – látka, která nepoškozuje rohovku byl použit 0,9% roztok NaCl. Výsledek testu podložený hodnotami IVIS, kterými byly 100,145 pro DMFA a 96,17 pro 20% Imidazol potvrdil, že obě látky spadají podle UN GHS do „Kategorie 1“ kdy dochází k vážnému poškození očí. Tím byl potvrzen daný předpoklad, že obě zkoušené látky mohou být dále používány jako pozitivní kontrola při testování oční dráždivosti a leptavosti.

5 Použitá literatura

1. BALLS, Michael; WORTH, Andrew P.; COMBES, Robert D. The validation of alternative test methods. In: *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*. Academic Press, 2019. p. 307-314.
2. BAST, Aalt; HANEKAMP, Jaap C. *Toxicology: what everyone should know*. Academic Press, 2017. p. 3-9.
3. OTŘÍSAL, P. and FLORUS, S., Současnost a perspektivy fyzické a kolektivní ochrany proti účinkům toxických látek. Chemické listy, 108(12), 2014.pp.1168-1171.
4. AULMANN W., PECHACEK N., Reach (and CLP). Its role in regulatory toxicology. In Regulatory Toxicology (Reichl F.-X., Schwenk M., Eds.), 2014. pp. 779–795. Springer, Berlin, Heidelberg.
5. Gary W. Miller, Improving Reproducibility in Toxicology, *Toxicological Sciences*, Volume 139, Issue 1, May 2014, Pages 1–3, https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu050
6. Gary W. Miller, Data Sharing in Toxicology: Beyond Show and Tell, *Toxicological Sciences*, Volume 143, Issue 1, January 2015, Pages 3–5, https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu237
7. DAMALAS, Christos; KOUTROUBAS, Spyridon. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. 2016. p. 3-6.
8. Toxicita (látky). *EBOZP, Encyklopedie EBOZP* [online]. [cit. 2019-07-11]. Dostupné z: http://ebozp.vubp.cz/wiki/index.php/Toxicita_(l%C3%A1tky)
9. NOWELL, Lisa H., et al. Pesticide toxicity index—a tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. *Science of the total environment*, 2014, 476: 144-157.
10. STURLA, Shana J., et al. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. *Chemical research in toxicology*, 2014, 27.3: 314-329.
11. VETCHÝ, DAVID, et al. Modely in vitro–in vivo ve vývoji léčiv. *Chem. Listy*, 2014, 108: 32-39.
12. JUDSON, Richard, et al. In vitro and modelling approaches to risk assessment from the US Environmental Protection Agency ToxCast programme. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2014, 115.1: 69-76.
13. LI, Ming; DE GRAAF, Inge AM; GROOTHUIS, Geny MM. Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2016, 12.2: 175-190.

14. SUTER-DICK, Laura, et al. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem cells and development*, 2015, 24.11: 1284-1296

15. 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, 2017 [cit. 2019-07-03]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. DOI: 10.1787/9789264203846-en. ISBN 9789264203846.

16. BHASKER, S., KISLAY, R., RUPINDER, K.K. and JAGAT, K.R., 2015. Evaluation of nanoformulated therapeutics in an ex-vivo bovine corneal irritation model. *Toxicology in Vitro*, *29*(5), pp.917-925.

17. NOWAK-SLIWINSKA, P., SEGURA, T. and IRUELA-ARISPE, M.L., The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, *17*(4), 2014.pp.779-804.

18. JENNINGS, Paul. The future of in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29.6: 1217-1221.

19. STAHLMANN, Ralf; HORVATH, Aniko. Risks, risk assessment and risk competence in toxicology. *GMS German Medical Science*, 2015, 13.

20. PETERS, Frank T., et al. Method development in forensic toxicology. *Current pharmaceutical design*, 2017, 23.36: 5455-5467.

21. KUBINCOVÁ, PETRA; NOVÁK, J. I. Ř. Í.; SOVADINOVÁ, I. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*, 2016, 110.2: 118-125.

22. Stine, K., Brown, T. (2015). Principles of Toxicology. Boca Raton: CRC Press, Pages 166–180, https://doi.org/10.1201/b18343

23. MORRIS, John B.; SHUSTERMAN, Dennis J. (ed.). *Toxicology of the nose and upper airways*. CRC Press, 2016, p. 1-5.

24. COCHRANE, Stella A., et al. Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology*, 2015, 333: 179-194.

25. GERAETS, Liesbeth, et al. Human risk assessment of dermal and inhalation exposures to chemicals assessed by route-to-route extrapolation: the necessity of kinetic data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 70.1: 54-64.

26. HENDRICKSON, Olga D., et al. Toxicity of nanosilver in intragastric studies: biodistribution and metabolic effects. *Toxicology letters*, 2016, 241: 184-192.

27. BENNETT, Joan; INAMDAR, Arati. Are some fungal volatile organic compounds (VOCs) mycotoxins?. *Toxins*, 2015, 7.9: 3785-3804.

28. KELLER, Nancy P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 1.

29. KOPPEL, Nitzan; REKDAL, Vayu Maini; BALSKUS, Emily P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*, 2017, 356.6344: eaag2770.

30. CHANDRA, Sundeep A., et al. Dermal toxicity studies: factors impacting study interpretation and outcome. *Toxicologic pathology*, 2015, 43.4: 474-481.

31. DICKERSON, David M.; APFELBAUM, Jeffrey L. Local anesthetic systemic toxicity. *Aesthetic surgery journal*, 2014, 34.7: 1111-1119.

32. RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard; HUME, Charles Westley. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen, 1959.

33. ČESKO. Zákon č. 246 ze dne 15. dubna 1992 na ochranu zvířat proti týrání. V: Sbírka zákonů České republiky. 1992, částka 1284, s.1-110. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-246

34. BREDENOORD, Annelien L.; CLEVERS, Hans; KNOBLICH, Juergen A. Human tissues in a dish: the research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 2017, 355.6322: eaaf9414.

35. GRUIZ, K., MEGGYES, T. and FENYVESI, É. eds., *Engineering tools for environmental risk Management: 2. Environmental toxicology*. CRC Press, 2015. 135-140

36. ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A., CASTELLANO, V. and MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., 2014. The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *10*(1), pp.67-79.

37. BADYAL, D.K. and DESAI, C.,Animal use in pharmacology education and research: The changing scenario. *Indian journal of pharmacology*, *46*(3),2014, p.257.

38. DOKE, S.K. and DHAWALE, S.C., Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *23*(3), 2015. pp.223-229.

39. STOKES, W.S.,Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: The way forward. *Human & experimental toxicology*, *34*(12)2015, pp.1297-1303.

40. TÖRNQVIST, Elin, et al. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PloS one*, 2014, 9.7: e101638.

41. POLANSKI, J. "Chemoinformatics: From Chemical Art to Chemistry in Silico." 2019. 601-618.

42. HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. s 84 - 96 ISBN 80-7080-548-x.

43. Campbell, J.P., Zhang, M., Hwang, T.S., Bailey, S.T., Wilson, D.J., Jia, Y. and Huang, D., Detailed vascular anatomy of the human retina by projection-resolved optical coherence tomography angiography. *Scientific reports*, *7*, 2017. p.42201.

44. Eye Diagram without text.gif. In: *Wikiskripta* [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Optick%C3%BD_syst%C3%A9m_oka#/media/File:Eye_Diagram_without_text.gif

45. FROST, L.S., MITCHELL, C.H. and BOESZE-BATTAGLIA, K., Autophagy in the eye: implications for ocular cell health. *Experimental eye research*, *124*, 2014. pp.56-66.

46. KELS, B.D., GRZYBOWSKI, A. and GRANT-KELS, J.M., Human ocular anatomy. *Clinics in dermatology*, *33*(2), 2015.pp.140-146.

47. Lidské oko: Anatomie oka. *OčníVady.cz* [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: http://ocnivady.cz/anatomie-oka

48. SCHEY, K.L., WANG, Z., WENKE, J.L. and QI, Y., Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1840*(5), 2014.pp.1513-1523.

49. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Rohovka#/media/Soubor:Rez_lid_rohovkou.gif

50. Spojivka schema-800x800.gif. Schematický řez okem [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Spojivka#/media/Soubor:Spojivka_schema-800x800.gif

51. KEJLOVÁ, Kristina. *Studium účinků záření a chemických faktorů na buněčné a tkáňové systémy.* Praha, 2010. 130 s. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

52. Poranění oka. OTTLENS [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: http://www.ottlens.com/poraneni-oka

53. ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon). In: Sbírka zákonů. 2011, 122/2011, Zákon 350/2011 Sb. Dostupné také z: https://www.zakonyprolidi.cz/nabidka/cs/2011-350/zneni-20120101#p38-1_p38-4

54. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. In: *Sbírka zákonů*. 2008, L 142/1, NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) 440/2008. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32008R0440

55. ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání. In: *Sbírka zákonů*. 1992, 50/1992, Zákon 246/1992 Sb. Dostupné také z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-246

56. Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) – jak EU reguluje chemické látky. EUR-Lex [online]. [cit. 2019-07-03]. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=LEGISSUM%3Al21282

57. Porozumět nařízení REACH. European Chemicals Agency: Právní předpisy [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach/understanding-reach

58. Zkoušky na zvířatech podle nařízení REACH. European Chemicals Agency: Právní předpisy [online]. [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/animal-testing-under-reach

59. 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, 1944, 82.3: 377-390.

60. OECD (2017), Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264185333-en.

61. Lotz, C., Schmid, F.F., Rossi, A., Kurdyn, S., Kampik, D., De Wever, B., Walles, H. and Groeber, F.K.,Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. ALTEX-Alternatives to animal experimentation, 33(1), 2016. pp.55-67.

62. Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M. and Templier, M., 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, 91(2), 2017. pp.521-547.

63. Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U. and Tailhardat, M., 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, 88(3), 2014. pp.701-723.

64. Jose, J., Deepthi, S. and Sandeep, D.S., Methods for Testing Ocular Toxicity: Current Status. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *11*(4), 2018. pp.1499-1504.

65. Lee, M., Hwang, J.H. and Lim, K.M., 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*, *33*(3), 2017.p.191.

66. Jírová, D., Kejlová, K., Janoušek, S., Bendová, H., Malý, M., Kolářová, H. and Dvořáková, M., 2014. Eye irritation hazard of chemicals and formulations assessed by methods in vitro. Neuroendocrinology Letters, 35(2), pp.133-140.

67. OECD (2019), *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*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris,https://doi.org/10.1787/9789264242548-en.