

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Alternativní metody testování oční dráždivosti v průmyslové
toxikologii

Ing. Petra Plodíková

Disertační práce

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Alternative methods of eye irritation testing in industrial toxicology
Ing. Petra Plodíková

Doctoral Dissertation

2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 1. 8. 2020

Petra Plodíková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce prof. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc., za vedení disertační práce a pomoc během studia. Dále děkuji kolegům z Výzkumného ústavu organických syntéz: RNDr. Rostislavu Čihákovi, CSc., Ing. Zdeňce Rösslerové, Ing. Lence Liškové a RNDr. Evě Täublové za cenné rady a pomoc při experimentální práci.

Velký dík patří mým drahým dětem, které mě motivovaly a podporovaly po celou dobu studia.

ANOTACE

Práce je věnována studiu citlivosti a využitelnosti různých biologických modelů, které jsou používány pro testování oční leptavosti a dráždivosti. Pro tento účel byly vybrány tři různé *in vitro* metody, které se používají pro odhalení potenciálu látek způsobit poškození nebo podráždění oka. *In vitro* metody mají v porovnání s *in vivo* klasickým modelem řadu omezení. Vhodnou kombinací těchto metod lze většinou nahradit standardní *in vivo* testování na králících. Experimentálně bylo provedeno ověření různých kombinací alternativních metod a porovnány dosažené výsledky se závěry *in vivo* testů. Pro tuto práci byly využity historické výsledky zkoušek na králících a nebyl proveden žádný reálný test na laboratorních zvířatech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oční dráždivost, BCOP, HET-CAM, EpiOcular, Dreize test, alternativní testy, biologické modely.

ANNOTATION

The work is devoted to the study of applicability and sensitivity of various biological models that are used for testing eye corrosion and irritability. For this purpose, three different *in vitro* methods have been selected that are used to reveal the potential of substances to cause eye damage or irritation. *In vitro* methods have some limitations compared to the *in vivo* classical model. A suitable combination of these methods can usually replace standard *in vivo* testing in rabbits. The various combinations of alternative methods were verified experimentally, and the results obtained were compared with the conclusions of an *in vivo* test. Historical test results in rabbits were used for this work and no test on laboratory animals was performed.

KEYWORDS

Eye irritation, BCOP, HET-CAM, EpiOcular, Dreize test, alternative tests, biological models.

OBSAH

SEZNAM TABULEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	10
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Anatomie oka	14
2.2 Mechanismy podráždění oka.....	15
2.3 Testování oční leptavosti/dráždivosti	16
2.3.1 <i>In vivo</i> test oční dráždivosti.....	16
2.3.2 Alternativní biologické modely	17
2.3.2.1 Buněčné linie – 2D modely	17
2.3.2.2 Trojrozměrné tkáňové modely.....	19
2.3.2.3 Izolované oči	21
2.3.2.4 Oplozená drůbeží vejce	23
2.4 Testovací strategie využití alternativních modelů.....	25
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1 Metodiky testování oční dráždivosti.....	29
4.1.1 <i>In vivo</i> zkouška oční leptavosti/dráždivosti.....	29
4.1.2 Zkouška BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)	30
4.1.3 Zkouška RhCE (Reconstructed human Cornea-like Epithelium).....	35
4.1.4 Zkouška HET-CAM (Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane).....	39
4.2 Zkoušené látky/ výběr vzorků	43
4.2.1 Modifikace metody BCOP – optimalizace postupu oplachu testované látky z povrchu rohovek.....	43
4.2.2 Ověření citlivosti <i>in vitro</i> metod testování oční dráždivosti.....	44
5 Výsledky a diskuse	47
5.1 Modifikace metody BCOP – optimalizace postupu oplachu testované látky z povrchu rohovek.....	47
5.1.1 Výsledky	47
5.1.2 Diskuse.....	49
5.2 Ověření citlivosti <i>in vitro</i> metod testování oční dráždivosti	51
5.2.1 Zkouška HET-CAM	51

5.2.1.1	Výsledky	51
5.2.1.2	Diskuse	52
5.2.2	Zkouška BCOP	54
5.2.2.1	Výsledky	54
5.2.2.2	Diskuse	56
5.2.3	Zkouška RhCE	57
5.2.3.1	Výsledky	57
5.2.3.2	Diskuse	58
5.3	Porovnání výsledků <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> zkoušek	58
6	ZÁVĚR	62
7	POUŽITÁ LITERATURA	64
8	PŘÍLOHY	71
8.1	Seznam publikovaných prací	71
8.2	Publikační výstup vztahující se k disertační práci	72
8.3	Údaje pro knihovnickou databázi	72

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikační stupnice in vivo zkoušek oční dráždivosti	30
Tabulka 2: Klasifikační stupnice testu BCOP	35
Tabulka 3: Komponenty EpiOcular™ kitu OCL-200.....	36
Tabulka 4: Skórovací systém pro hodnocení dráždivosti metodou HET-CAM.....	42
Tabulka 5: Klasifikace potenciálu chemických látek dle hodnoty IS (průměr ze 3 opakování) 42	
Tabulka 6: Charakteristika látek použitých při optimalizaci testu BCOP	44
Tabulka 7: Přehled látek použitých pro ověření citlivosti in vitro zkušebních metod.....	45
Tabulka 8: Dostupné výsledky in vivo testů oční dráždivosti.....	46
Tabulka 9: Modifikace omývací fáze testu BCOP - Průměrné hodnoty opacity a permeability 48	
Tabulka 10: Modifikace omývací fáze testu BCOP – Průměrné hodnoty IVIS.....	49
Tabulka 11: Přehled výsledků zkoušky HET-CAM.....	52
Tabulka 12: Přehled výsledků zkoušky BCOP	55
Tabulka 13: Přehled výsledků zkoušky RhCE.....	58
Tabulka 14: Souhrn výsledků in vivo a in vitro zkoušek.....	60

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Anatomie oční koule (Převzato z [10])	14
Obrázek 2. Schéma Fluorescein Leakage testu (Upraveno z [28]).....	18
Obrázek 3. Histologický profil lidské rohovky a jejího 3D modelu (Upraveno z [36])	19
Obrázek 4. Schéma modelu EpiOcular™ (Upraveno z [36])	20
Obrázek 5. Léze sledované na chorioalantoidní membráně (Upraveno z [96])	25
Obrázek 6. Testovací strategie oční dráždivosti dle Nařízení REACH (Převzato z [101]).....	27
Obrázek 7. Schéma držáku očních rohovek v testu BCOP (Upraveno z [15]).....	31
Obrázek 8: Redukce MTT na formazan (Upraveno z [105]).....	36
Obrázek 9. Aplikace kapalně látky na odkrytou chorioalantoidní membránu	41

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D	dvojdimenzionální, dvojrozměrný
3D	trojdimenzionální, trojrozměrný
3R	Reduction, Refinement, Replacement
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability
CAM	chorioalantoidní membrána
DMEM	Dulbecovo modifikované esenciální médium
DMFA	dimethyl formamid
ECHA	Evropská chemická agentura
ECVAM	European Centre for Validation of Alternative Methods
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FČ	fenolová červeň
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HET-CAM	Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	Isolated Chicken Eye test
IS	iritační skóre
IU	International Unit
IVIS	In Vitro Irritancy Score
MTT	3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
MSDS	Material Safety Data Sheets
NK	negativní kontrola
OD	optická hustota, absorbance daného optického elementu při dané vlnové délce λ na jednotku vzdálenosti
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PK	pozitivní kontrola
RCE	rabbit corneal epithelium
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

RhCE	Reconstructed human Cornea-like Epithelium
SDS	sodium dodecilsulfát
SIRC	linie buněk králičí rohovky
SLP	Správná laboratorní praxe
SOP	Standardní operační postup
STE	Short-time exposure
TG	Test Guideline
TL	Testovaná látka
TSA	test substance applicator
VUOS	Výzkumný ústav organických syntéz a.s.

1 ÚVOD

Kontakt chemické látky s lidským okem může vyvolat negativní reakce, které se projevují různě intenzivním podrážděním, zánětem, poškozením rohovky, zhoršením vidění až oslepnutím. S rozvojem chemické výroby od druhé poloviny 19. století, narůstal počet případů trvalého poškození zraku jako důsledku nehod při manipulaci s řadou chemických látek. Tento fakt vedl k zvýšené potřebě zjišťovat základní toxikologické vlastnosti používaných látek¹. Testování oční dráždivosti patřilo a patří mezi základní kroky při zjišťování negativních účinků látek na zdraví člověka. Jako první biologické modely pro cílené zkoušení oční dráždivosti se používala zvířata, která byla v souladu s tehdejší úrovní znalostí považována za odpovídající modely².

Cílené používání laboratorních zvířat ke zjišťování toxických účinků začalo již v 18. století³. Prvním vědecky publikovaným postupem pro testování oční dráždivosti byl Draizův test oční dráždivosti, který byl publikován v roce 1944⁴. Tento základní *in vivo* test používal jako biologický model albinotického králíka, přesně definoval množství aplikované látky, délku expozice a metodiku popisu sledovaných reakcí oka po expozici. V šedesátých letech minulého století se začala intenzivně prosazovat snaha omezit používání zvířat k testům a zároveň minimalizovat jejich stres během testování. V této době byly mimo jiné publikovány principy 3R (Reduction, Refinement, Replacement), které shrnují přístupy k omezení používání laboratorních zvířat⁵. Tyto principy jsou stále základem alternativních metod testování, které zcela vylučují použití laboratorních zvířat, nebo alespoň snižují jejich počty a utrpení během testů⁶. Pro oční dráždivost byla vědecky vyvinuta řada postupů, které využívají buněčné, tkáňové nebo orgánové systémy. Některé z těchto metod byly mezinárodně validovány a jejich doporučené používání bylo následně zahrnuto do příslušných legislativních dokumentů, které se týkají ochrany zdraví člověka.

Tato práce je zaměřena na využití alternativních modelů v reálných laboratorních podmínkách jako náhrad *in vivo* zkoušky. V teoretické části jsou nejprve popsány používané biologické modely, jejich praktická použitelnost a citlivost. Na základě literární rešerše jsou diskutovány výhody a nevýhody těchto alternativ, a to nejen v porovnání s *in vivo* modelem, ale také po stránce ekonomické.

Do experimentální práce byly vybrány metody HET-CAM, BCOP a RhCE využívající různé biologické modely. V rámci metodické přípravy pro hlavní plánovaný experiment bylo provedeno laboratorní ověření navržené modifikace testu BCOP. Pro tuto validaci bylo použito 20 barevných a/nebo vysoce viskózních látek, pro které není původní OECD metodika

doporučená. Úpravou metodiky a její následnou validací bylo dosaženo rozšíření použitelnosti této důležité metody pro širší spektrum látek.

Cílem druhé části experimentální práce bylo ověření citlivosti vybraných třech alternativních zkoušek a porovnání jejich výsledků s *in vivo* testem. Zvláštní pozornost byla věnována metodě HET-CAM, která je ojedinělá svou možností detekovat účinky testovaných látek na oční spojivku, protože všechny doposud validované alternativní metody využívají zvířecí rohovku nebo její epiteliální modely.

Byly vybrány různé chemické látky a směsi s experimentálně prokázaným *in vivo* účinkem. Cíleně byly vyhledány látky, u nichž byl zaznamenán různý stupeň podráždění spojivky. Do experimentů byly zahrnuty i látky, které *in vivo* vyvolaly slabou tkáňovou reakci, která nebyla dostatečná pro výsledné zařazení látky do kategorie „dráždivé pro oko“. U všech těchto látek byly k dispozici výsledky *in vivo* zkoušek včetně detailních klinických dat popisujících reakci oka králíka po celou dobu studie. Vybraný soubor vzorků byl testován metodou BCOP, metodou HET-CAM a metodou RhCE (model EpiOcular™) nebo byly použity výsledky studií již provedených, u kterých byly k dispozici primární záznamy. Jedná se o studie provedené v rámci registrace chemických látek dle nařízení REACH⁷ a také publikované studie provedené při validaci modifikace zkoušky BCOP⁸. Všechny zkoušky byly provedeny metodickými postupy dle OECD nebo ECVAM. Pro účely tohoto experimentu nebyl proveden žádný *in vivo* test a pro porovnání provedených *in vitro* testů s *in vivo* výsledky byla použita data předchozích studií na laboratorních zvířatech.

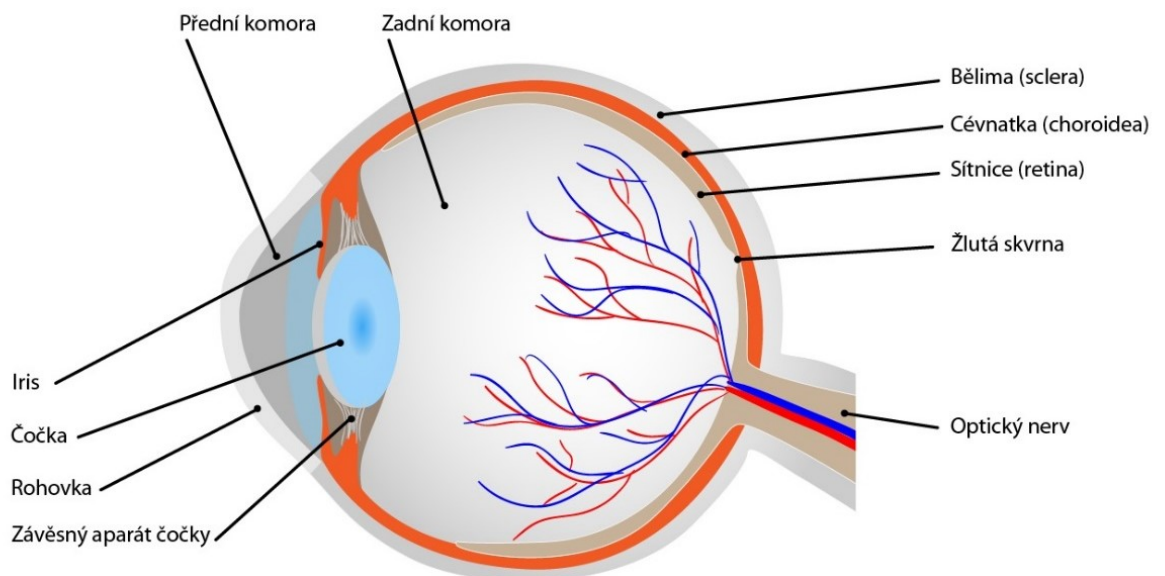
Získané výsledky alternativních zkoušek byly porovnány s *in vivo* experimenty. Klíčovým faktorem bylo porovnání citlivosti příslušného modelu, ale také korelace s pozorovanou reakcí jednotlivých tkání v *in vivo* testu.

Dalším cílem práce bylo navrhnout vhodnou kombinaci alternativních zkoušek, která by svou citlivostí co nejpřesněji odpovídala původnímu *in vivo* testu na králících.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anatomie oka

Zrak je nejdůležitější smysl, kterým vnímáme až 80 % veškerého okolního dění. Díky zraku dovedeme rozlišovat jednotlivé předměty, vzdálenosti mezi nimi, a můžeme se tedy orientovat v prostoru. Sluneční paprsky prochází okem skrz různá optická prostředí: rohovku, přední komoru, čočku a sklivce. Všechny tyto části oka, přes které paprsek světla prochází, jsou průhledné, aby co nejméně zabraňovaly rozptylu dopadajícího světla. Rohovka (cornea) a čočka (lens) pomáhají paprsek světla spojit a zaostřit na zadní stěnu oka – sítnici (retina). Dopadající světlo pak způsobuje chemické přeměny ve světločivných buňkách (tyčinky a čípky), které vysílají nervové impulsy zrakovým nervem (nervus opticus) do mozku. Světlo vstoupí přes rohovku, do oblasti vyplněné komorovou vodou (humor aquosus), a dopadá na čočku skrz panenku (pupila, zornice). Ta se pomocí svalů (duhovka, iris) roztahuje a zužuje, čímž koriguje množství procházejícího světla. Pomocí svalů je také regulována čočka, která zaostřuje paprsky, aby se sbíhaly přesně na sítnici, kde vytvářejí převrácený obraz. Celá zbývající oblast oka je vyplněna sklivcem (corpus vitreum), který udržuje v oku stálý tlak a tím i tvar^{9,10}. Anatomie oční koule je znázorněna na *Obrázku 1*.



Obrázek 1. Anatomie oční koule (Převzato z [10])

Rohovka navazující na bělimu tvoří vnější obal oka, který současně chrání vnitřní části před poškozením. Spojivka (conjunctiva) má strukturu sliznice, v jejíž epitelové vrstvě jsou krevní cévy, lymfatické kanálky i pomocné slzné žlázy¹¹. Vnější povrch rohovky je nejvíce vystavován nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Omývají ho slzy, které obsahují několik složek a mají funkci ochrannou, vyživují a současně optimalizují optickou funkci oka¹².

2.2 Mechanismy podráždění oka

Umístění očí a jejich funkce způsobuje, že některé části oka přicházejí do kontaktu s prostředím více než jiné. Z toxikologického hlediska jsou z tohoto důvodu důležité rohovka, spojivka a duhovka. Rohovka je tvořena z velké části rohovkovým stroma, jehož stavba umožňuje snadný průchod světla. Vysoký obsah vody a makromolekul reaguje při porušení své rovnováhy zakalením, otokem nebo porušením celistvosti. Přední epitel rohovky vytváří první biologickou bariéru oka, a proto má vyvinutou relativně vysokou regenerační schopnost. Při slabším podráždění dojde k překrytí poškozené oblasti novými buňkami nebo jsou přeskupeny stávající buňky. V těchto případech dojde k plnému vyhojení tkáně bez porušení funkce oka. Při poškození hlubších vrstev (endotelová membrána) není tkáň schopna toto poškození zregenerovat a dochází k trvalému poškození zraku nebo slepotě^{12,13}.

Za rohovkou se nachází duhovka, která reguluje průchod světla do hlubších částí oka. Tato tkáň je dobře prokrvená. Při jejím podráždění dochází k dilataci či poškození vlásečnic a následné otoku, který vede k zhoršené regulaci průchodu světla a může způsobit trvalé a vážné poškození zraku.

Spojivka je druhou velmi citlivou částí oka, která na kontakt s dráždivými látkami reaguje citlivěji než rohovka. Tato tkáň pokrývá především vnitřní stranu víček a je bohatě prokrvená. Obsahuje vyústění žláz, které zajišťují zvlhčování oční koule. Při podráždění dochází k rychlé dilataci vlásečnic nebo jejich narušení, které je následováno zánětlivými změnami. Tyto tkáňové reakce jsou většinou vratné a nevedou k trvalému poškození funkce oka¹³.

2.3 Testování oční leptavosti/dráždivosti

2.3.1 *In vivo* test oční dráždivosti

Prvním mezinárodním standardizovaným postupem pro testování oční leptavosti a dráždivosti byl Draizův test, který byl publikován v roce 1944 a byl vyvinut jako reakce na četné případy poškození zraku v důsledku používání nebezpečných kosmetických přípravků³. Draizův test byl následně akceptován Organizací pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) a v roce 1981 byl publikován v prvním souboru doporučených metod pro testování toxicity chemických látek (OECD Test Guidelines for the Testing of Chemicals) jako Test Guideline No.405 (současné znění této metody viz cit¹⁴).

Tato metoda se stala základem pro testování oční dráždivosti pro všechny typy chemických látek, jako jsou průmyslové chemikálie, léčiva, zdravotnické prostředky, biocidní účinné látky atd. Testovaná látka je aplikována do spojivkového vaku jednoho oka (druhé oko slouží jako kontrola pro hodnocení oční reakce). V různých časových intervalech od expozice, jsou numericky hodnoceny stupně poškození spojivky, rohovky a duhovky a následně je vypočteno celkové skóre podráždění. Původní schéma testování vyvinuté Draizem bylo postupně modifikováno s cílem ochrany zvířat a jejich pohody (welfare). Od roku 2012 je aplikace prováděna pod mírnou sedací¹⁵. Výhodou tohoto testu, oproti všem publikovaným alternativním metodám, je komplexnost a systémovost odezvy živého organismu a možnost vyhodnotit reverzibilitu změn na rohovce, duhovce i spojivce. Zvířata jsou pozorována relativně dlouhou dobu po expozici, a proto je možno sledovat vyhojení jednotlivých tkání, protrahovaný efekt nebo nevratnost poškození. Výhodou je také možnost posouzení systémové toxicity spojené s expozicí očí určitým látkám¹⁵. Tyto ukazatele nelze u alternativních biologických modelů většinou hodnotit. Jako nevýhoda tohoto *in vivo* testu je mimo etické důvody uváděna především subjektivnost hodnocení odezvy, anatomická odlišnost králičího oka ve srovnání s okem člověka, nedostatečná znalost mechanismu účinku a vysoká variabilita výsledků^{16,17}. Metodou předepsaná aplikovaná dávka je také příliš vysoká oproti reálné možnosti expozice u lidí^{3,18}. U alternativních testů se jako sporná jeví původně proklamovaná ekonomická výhodnost, protože některé používané biologické *in vitro* modely (např. komerčně vyráběné 3D tkáňové modely) jsou relativně drahé a výsledná cena za test je vyšší než původní Draizův test. Nicméně především etické hledisko vedlo k mezinárodní validaci vybraných zkoušek a následně jejich začlenění do příslušných legislativ pro chemické látky, léčiva aj. V současné době je základní strategií maximální využití dostupných informací, a to s cílem zabránit provádění *in vivo* zkoušek a následně využít vhodných vědecky ověřených a

validovaných alternativních postupů, dávajících relevantní informace na stejné úrovni jako testy na zvířatech. V oblasti kosmetiky došlo k úplnému zákazu testování těchto produktů a jejich komponent na zvířatech¹⁹.

2.3.2 Alternativní biologické modely

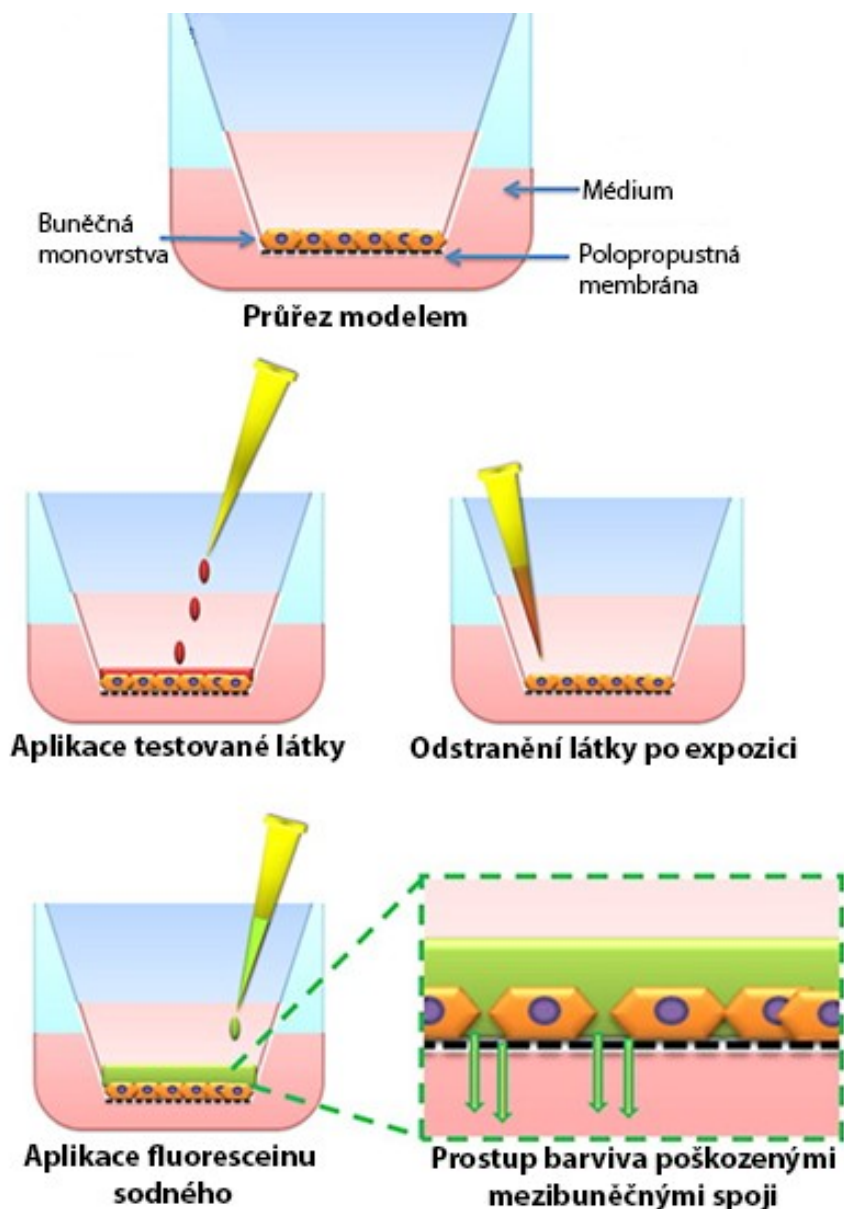
Alternativní metody v oblasti oční leptavosti a dráždivosti jsou vyvíjeny relativně dlouhou dobu a využívají různé testovací systémy. Nejčastěji se rozdělují na buněčné, organotypické nebo tkáňové modely.

2.3.2.1 Buněčné linie – 2D modely

Nejjednodušším typem biologických modelů, které jsou využívány v rámci alternativních metod oční dráždivosti, jsou vybrané buněčné linie napodobující epitel vnější vrstvy rohovky. Poškození rohovky je považováno za nejzávažnější ukazatel oční leptavosti a dráždivosti²⁰. Metody založené na tomto modelu, jsou vyhodnocovány klasickým principem sledování cytotoxicity. Porušení integrity buněčné membrány, jako důsledku kontaktu s chemickou látkou, je sledováno pomocí neutrální červeně (Neutral Red Release Test a Neutral Red Uptake Test). Ve zkoušce Neutral Red Release buňky absorbují vitální barvivo ještě před kontaktem s chemickou látkou²¹. Pokud při expozici dojde k poškození buněčné membrány, intracelulární obsah včetně barviva se uvolní. Množství barviva je pak měřeno spektrometricky. Naopak zkouška Neutral Red Uptake sleduje příjem vitálního barviva po expozici chemickou látkou, kdy pouze životaschopné buňky toto barvivo absorbují²². Množství inkorporovaného barviva v buňkách se stanovuje po narušení jejich membrán fluorimetrickou metodou²³. V obou případech existuje závislost mezi množstvím barviva a množstvím živých buněk. U těchto typů metod stále probíhá optimalizace postupu s cílem zlepšení reprodukovatelnosti a citlivosti. Oblast použití je zatím omezená a tyto metody nejsou zahrnuty mezi OECD testovací postupy.

Dalším přístupem je sledování narušení vazeb mezi buňkami buněčné kultury jako reakce na kontakt s toxickou/dráždivou látkou. Tento efekt je detekován měřením prostupu fluoresceinu přes buněčnou vrstvu (Fluorescein Leakage Test)²². Dosud jedinou OECD doporučenou metodou pro tento typ biologického modelu je Fluorescein Leakage Test pro identifikaci leptavých a silně dráždivých látek (OECD TG. 460) z roku 2017²⁴. Princip testu je znázorněn na *Obrázku 2*. Epitelové buňky utvářející monovrstvu na mikroporézní membráně jsou exponovány zkoušenou látkou. Po ukončení expozice je na buněčnou vrstvu

nanesen fluorescein sodný, kdy jeho průnik přes tuto vrstvu indikuje poškození mezibuněčných spojů^{25,26}.



Obrázek 2. Schéma Fluorescein Leakage testu (Upraveno z [28])

Nevýhodou těchto modelů je omezená použitelnost pro chemické látky se specifickými vlastnostmi (těkavé, nerozpustné, nestabilní ve vodném roztoku), které neumožňují rovnoměrný kontakt buněčné kultury s testovanou látkou a vyžadují další optimalizaci testovacího postupu^{27,28}. Obtížná je také extrapolace výsledků na animální model. Naopak výhodou je rychlost zkoušky²⁹, nízká cena a samozřejmě etické hledisko.

Méně známý je STE test (short-time exposure), který jako biologický model používá buněčnou linii z rohovek králíka (SIRC). Vyhodnocení je založeno na klasickém hodnocení životnosti buněk (cytotoxicitě) pomocí MTT barviva. Tento test je považován za vhodný pro identifikaci silně dráždivých a nedráždivých látek. Jeho predikční schopnost u látek slabě dráždivých je nízká^{30, 31, 32}. Tento test nebyl zařazen mezi legislativou doporučené testovací postupy, není při testování nebezpečnosti chemických látek doposud používán, proto nelze relevantně posoudit jeho výhody a nevýhody při porovnání s klasickým testem na králících.

2.3.2.2 Trojrozměrné tkáňové modely

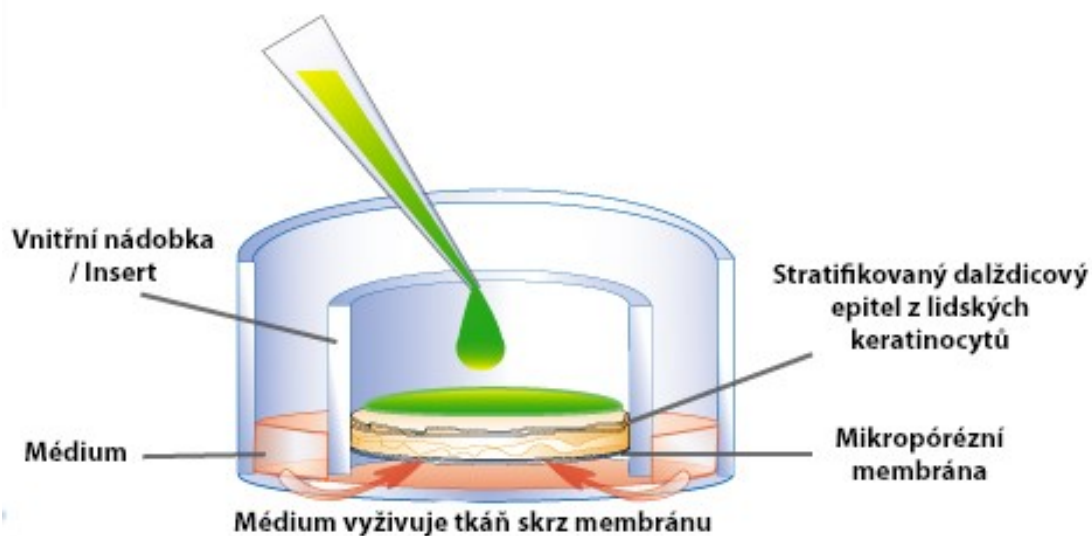
Složitějšími typy alternativních biologických modelů pro testování oční dráždivosti jsou tkáňové 3D modely. V oblasti výzkumu a vývoje *in vitro* očních modelů byli velmi aktivní výrobci kosmetických přípravků, kteří reagovali na společenský a následně také legislativní tlak na omezení používání zvířat v kosmetickém průmyslu³³. Několik komerčních firem (MatTek, USA; SkinEthic, Francie) se specializovalo na vývoj těchto modelů, a to nejen tkání oční rohovky, ale také epitelu kůže, tkáně slizniční, plicní a jiné, které jsou široce využívány při vývoji nových farmaceutických látek³⁴. Jejich 3D tkáňové modely oční rohovky byly základem pro další skupinu alternativních metod. Cílem vývoje těchto tkání bylo vytvořit model lidské rohovky strukturálně odpovídající epiteliálnímu povrchu rohovky. Rekonstruovaný model EpiOcularTM je složen z lidských epidermálních keratinocytů, které se postupně diferencují a vytváří stratifikovaný dlaždicový epitel strukturou velmi podobný epitelu lidské rohovky³⁵. Histologická podobnost modelu EpiOcularTM je patrná z *Obrázku 3*. Podobnou strukturu mají i jiné 3D buněčné modely lidské rohovky.



Obrázek 3. Histologický profil lidské rohovky a jejího 3D modelu (Upraveno z [36])

Z *Obrázku 4* je patrné schéma většiny těchto modelů. Vnitřní insert (nádobka) obsahuje rekonstruovanou tkáň, která přes spodní membránu komunikuje s živným médiem. Testovaná látka se nanese na epitel a nechá se exponovat. Délka expozice je závislá na typu modelu a

konzistenci látky. Po expozici se testovaná látka odstraní a tkáň se přenesse do nového média. Kontakt modelové tkáně s testovanou látkou se může projevit snížením živostnosti buněk. Tento efekt je kvantitativně dobře stanovitelný pomocí barviva MTT, které je standardně používáno u jiných metod stanovení cytotoxicity. Vitální žluté barvivo MTT je zdravými buňkami mitochondriálně přeměněno na fialový formazan. Intenzita zbarvení měřená spektrofotometricky je nepřímo úměrná toxicitě. Schopností těchto biologických modelů je uvolňování protizánětlivých mediátorů jako reakce na testovanou toxickou látku. Další možností stanovení toxicity je měření změny propustnosti tkáně po aplikaci látky. Vědecké studie považují tyto modely za dostatečně citlivé i pro testování látek s mírným dráždivým potenciálem²⁰. Několik těchto metod bylo validováno na úrovni ECVAM a následně zařazeno jako OECD testovací postup č. 492, který umožňuje použití řady komerčních tkáňových modelů (LabCyte CORNEA-MODEL24, MCTT HCETM, EpiOcularTM OCL-200, SkinEthicTM HCE/S, LabCyte CORNEAMODEL24 a MCTT HCETM RhCE)^{32,37}.



Obrázek 4. Schéma modelu EpiOcularTM (Upraveno z [36])

Epiteliální 3D *in vitro* modely jsou oproti jiným modelům velmi křehké, což vyžaduje šetrné zacházení, aby nedošlo k vysušení a poškození tkání. Odpojení buněk z 3D struktury v kultuře může vést k nesprávné interpretaci získaných výsledků³⁸. Dalším omezením je modelace pouze epiteliální vrstvy, proto je nelze použít ke stanovení možných účinků látek pronikajících do stromatu a endotelu. U těchto modelů nelze sledovat reverzibilitu podráždění³⁹ a lze je použít pouze pro modelaci reakce rohovky^{40,41,42}. Testy založené

na buněčných modelech postrádají simulaci hormonálních, imunitních a nervových vlivů. Jejich výhodou je jednoduchost a dobrá reprodukovatelnost výsledků, ale bez zohlednění interakcí v rámci tak specializovaného orgánu jako je oko⁴³ mají jako samostatné testy pouze omezené použití. Tyto modely mají dobrou predikční schopnost v případě slabých a středních iritantů⁴⁴.

Snaha zvýšit predikční schopnosti 3D modelů vedla k vývoji tkání kombinující více typů buněk a tím strukturálně více podobných *in vivo* modelu. Příkladem je hemi-cornea model (komerčně prodáván pod názvem SkinEthicTM), který se skládá z vrstvy lidských epitelálních buněk rohovky utvářejících tenčí vrchní část. Testovaná látka je v přímém kontaktu s touto vrstvou. Výrazně silnější spodní vrstva modelu je tvořena kulturou lidských keratinocytů a vytváří rohovkové stroma^{32,45}. Při mezilaboratorním ověření citlivosti tohoto modelu byla zjištěna predikční schopnost 70–80 % a to především u látek silně dráždivé oko v *in vivo* testech^{32,46}. Tento model je doporučen metodikou OECD č.492.

Při vývoji 3D modelů pro testování oční dráždivosti bylo využito i jiných buněk než lidských. RCE model (Rabbit Corneal Epithelium model) je složen ze stratifikované kultury epitelálních buněk rohovky králíka. Buňky jsou kultivovány v kolagenním gelu ve speciálních buněčných insertech^{47, 48}. Po expozici testovanou látkou je dráždivý efekt stanoven běžným postupem sledování životaschopnosti buněk pomocí barviva MTT. U tohoto modelu je uváděna citlivost 92,3 % při porovnání s výsledky *in vivo* zkoušky⁴⁷. Velmi dobrým ukazatelem vhodnosti tohoto modelu je histologická podobnost rohovky králíka a RCE modelu.

2.3.2.3 Izolované oči

Jinou možností, jak omezit použití laboratorních zvířat při testování toxicity chemických látek, se ukázalo využití očí jatečných zvířat, jako modelu velmi blízkého králíčímu oku^{49,50}. Tento odpadní materiál byl základem vývoje celé skupiny alternativních metod, které se řadí mezi *ex vivo* metody. *Ex vivo* metody používají izolované orgány, které si uchovávají některé biologické funkce a vlastnosti živých organismů až několik hodin od utracení zvířete^{3,43}. V oblasti oční dráždivosti se jako alternativní biologické modely pro rohovku používají celé králíčí a kuřecí oči nebo izolované hovězí a prasečí rohovky. Tyto biologické modely jsou umístěny do specializovaných držáků, které umožňují zachovat jejich biologické vlastnosti po celou dobu testu. Principem všech těchto zkoušek je sledování změn opacity (zákalu) a

permeability (propustnosti) rohovky po aplikaci testované látky. Jedná se o modely pouze pro rohovku bez možnosti sledovat reverzibilitu lézí a systémového účinku po oční expozici¹⁵. Metody využívající celé kuřecí oko (ICE) a izolovanou hovězí rohovku (BCOP) byly na základě doporučení Vědeckého výboru ECVAM zařazeny mezi schválené OECD testovací postupy (OECD TG 438 a 437)^{51,52}.

Tyto metody jsou vhodné pro testování širokého spektra chemických látek bez ohledu na jejich rozpustnost. Metoda BCOP využívající hovězí rohovku je schopná s vysokou přesností identifikovat látky silně dráždivé. Mírně dráždivé látky obvykle poškozují pouze povrchový epitel. Silně dráždivé látky pronikají do hlubších vrstev. Mohou proniknout rohovkou a poškodit endotel⁵³. Při použití standardního testovacího postupu je proto identifikace látek mírně dráždivých obtížnější a méně přesná. Použití histologického vyšetření exponovaných rohovek může pomoci při přesnějším vyhodnocení⁵¹. Nízká míra přesnosti pro oblast látek mírně dráždivých souvisí s vysokou mírou falešně pozitivních výsledků při testování alkoholů a ketonů. Při testování pevných zkušebních materiálů může docházet k mechanickému poškození povrchu rohovky, což také výrazně ovlivňuje výsledky⁵⁴.

Při použití prasečí rohovky není nutno ve srovnání s hovězí rohovkou řešit prevenci před encefalopatickým onemocněním (lidově nemocí šílených krav)⁵⁵, což je nespornou výhodou. Také anatomicky více připomíná lidskou rohovku, a to především strukturou a tloušťkou. Z tohoto důvodu jsou prasečí rohovky často používány v oftalmologickém výzkumu⁵⁶. V některých publikacích je tento model považován za vhodný pro hodnocení dráždivosti očí u kapalných a ve vodě rozpustných látek⁵⁵. Snahou je prodloužit dobu expozice a především post-expoziční fáze a umožnit tak sledování reverzibility změn⁵⁷. Tento postup však zůstává v oblasti výzkumu. Metoda využívající tento model nebyla doposud přijata regulačními orgány, které zřejmě upřednostňují test BCOP. Modely využívající izolované oči nebo oční rohovky jsou hranicí mezi *in vivo* a *in vitro* systémy a jejich výhodou je vyšší etická přijatelnost⁵⁸ a nižší náklady oproti *in vivo* i většině *in vitro* modelů. Nevýhodou je opět anatomická rozdílnost od lidské rohovky, ale také mezidruhové odlišnosti jednotlivých modelů^{59,60}. V těchto testech současně nelze vyhodnotit všechny ostatní toxikologické parametry oční dráždivosti, jako jsou zánětlivá reakce, reverzibilita změn⁶¹ a systémové účinky látek, například letalitu některých pesticidů⁵¹. Další nevýhodou se ukazuje relativně krátká doba pro hodnocení reakce rohovky (4 h), což neumožňuje testování v prodloužených časových schématech. Tyto nedostatky jsou společné pro všechny *ex vivo* metody využívající izolované orgány.

Použití celých očí jako modelu pro testování oční dráždivosti je často uváděno v souvislosti s preklinickým zkoušením farmaceutických látek. K tomuto účelu se nejčastěji používají oči králíci. Výhodami obou těchto modelů jsou nízké náklady, podobnost/shoda modelu, jednoduchost provedení nebo vhodnost pro široké spektrum látek. Pokud je v rámci tohoto typu testů provedeno histologické vyšetření aplikovaného modelu, lze zvýšit jeho vypovídající hodnotu o další toxikologicky důležité informace⁶². Problematická je subjektivnost hodnocení opacity a permeability. Izolované oči jsou modelem pouze pro lidskou rohovku, proto mají menší predikci k látkám poškozujícím spojivkovou tkáň⁶³.

2.3.2.4 Oplozená drůbeží vejce

Výše uvedené skupiny alternativních biologických modelů jsou modely pro oční rohovku. Další neméně důležitou součástí oka pro posouzení míry podráždění je oční spojivka. Na rozdíl od rohovky je oční spojivka a její cévní struktura jako funkční celek komplikovanější, a proto bylo obtížnější najít příslušný biologický model. Zatím jediným vědecky ověřeným modelem je chorioalantoidní membrána (CAM) oplozených ptačích vajec, která v určité fázi vývoje zárodku strukturou připomíná cévní řečiště spojivky savců⁶⁴. CAM reaguje na kontakt s dráždivými látkami srovnatelně s lidskou spojivkou³. Míra poškození se stanovuje na základě rychlosti nástupu pozorovaných lézí, jejichž typické příklady jsou na *Obrázku 5*. Po aplikaci testované látky může dojít k překrvení (hyperemii), kdy se kapiláry roztahují a vyplňují krví. Porušením celistvosti cév dochází k úniku krve z cévního systému (hemoragii). Některé chemické látky způsobují denaturaci intra nebo extra-vaskulárního proteinu (koagulace). Na základě rychlosti nástupu jednotlivých změn je vypočteno iritační skóre a vyhodnocen potenciál oční dráždivosti⁶⁵.

Tato zkouška patří mezi zkoušky doporučované ECVAM, ale doposud nebyla mezinárodně validována a není zařazena mezi doporučované metody OECD. Hlavním nedostatkem je subjektivita vyhodnocení reakce membrány. Řešením by bylo kvalitativní stanovení rychlosti nástupu jednotlivých lézí a jejich intenzity. Jednou z možností je barvení trypanovou modří^{66,67,68}.

U testu HET-CAM většina srovnávacích studií prokázala významnou shodu mezi touto alternativou a Draize testem. Platí to především pro mírně dráždivé a nedráždivé chemické látky, ale i pro povrchově aktivní látky (tenzidy)^{69,70,71}. Dobrá predikční schopnost pro látky mírně dráždivé může být využita při testování kosmetických látek⁷². Ačkoliv je zkouška

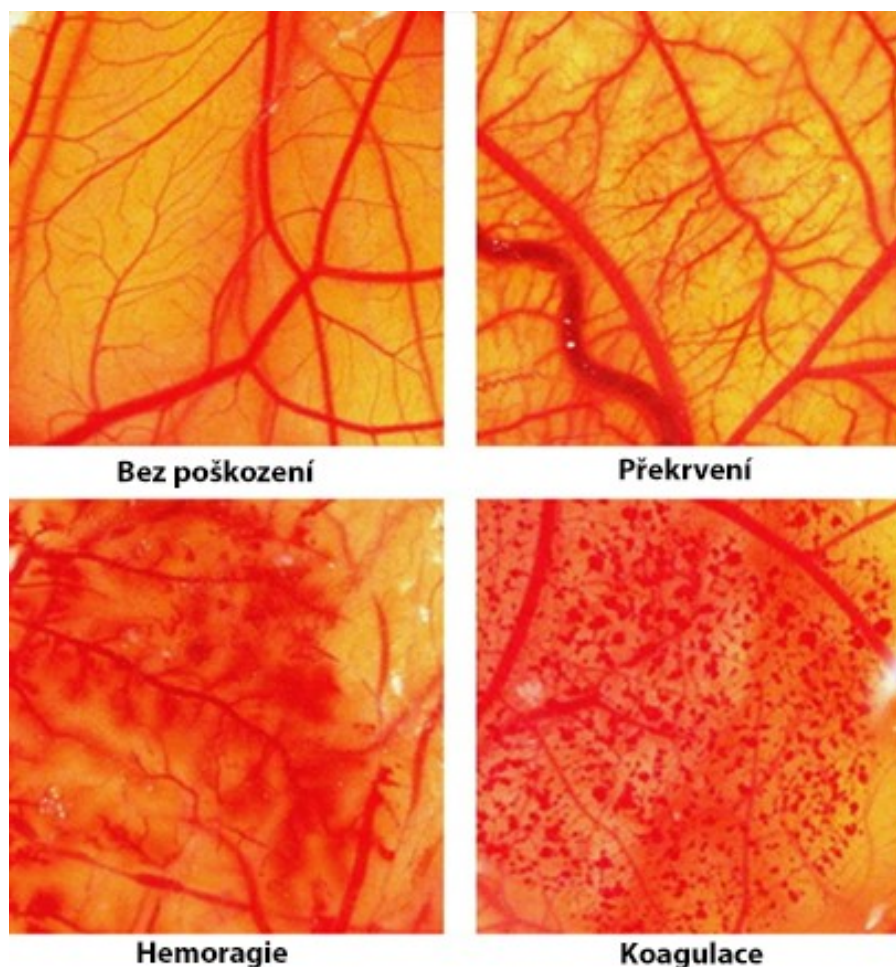
HET-CAM v zásadě použitelná na všechny typy chemikálií bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, testování pevných a nerozpustných nebo lepidelných materiálů může komplikovat reprodukovatelnost výsledků zkoušek. U pigmentů a barviv může docházet k zabarvení CAM a následně tak zhoršit vyhodnocení reakce^{70,73}. Pozitivní korelace výsledků *in vivo* vs *in vitro* byla pozorována u alkoholů a esterů⁷⁴. Vhodnost metody byla ověřena také na nízkoprocentních roztocích běžných laboratorních organických rozpouštědel⁷⁵.

HET-CAM test poskytuje kvalitativní informace o možných účincích testovaných látek na spojivku, ale také je možno sledovat koagulaci bílkovin a výsledek využít pro odhad poškození rohovky⁶⁷, což by mohlo být jeho výraznou výhodou. Rozdílná stavba spojivkového modelu chorioalantoidní membrány oproti rohovkovým modelům vyžaduje i jiné techniky vyhodnocení odezvy systému na kontakt s chemickou látkou⁴³. Obtížné je především hodnocení cévních reakcí a dalších změn na membráně⁶². Nevýhodou se ukazuje náročnost vlastního provedení testu zahrnující řadu parametrů zhoršujících reprodukovatelnost výsledků při mezilaboratorním porovnání. Mezi ně patří subjektivní pozorování změn v membránové morfologii, průběh inkubace, původ vajec, způsob otevírání skořápky, použití pozitivních a negativních kontrol⁶⁸. Cílem některých publikovaných modifikací je snížit tuto variabilitu výsledků a zajistit objektivitu při vyhodnocení testu HET-CAM. Pro aplikaci testovaných látek bylo navrženo použití speciálního aplikátoru (TSA), který by umožnil přesnou aplikaci na omezené ohraničené ploše a snadné odstranění z chorioalantoidní membrány bez nutnosti omývání aplikované plochy^{76,77}.

Zajímavou modifikací s vysokou vypovídající hodnotou je test CAMVA (chorioallantoic membrane vascular assay), který jako biologický model používá také chorioalantoidní membránu, ale u vajec 14 dní po oplození. V této fázi vývoje je cévní systém vyvinutější a predikční schopnost mírně vyšší než u klasického testu HET-CAM. Z etického hlediska je však velmi sporné, zda tento test lze považovat za *in vitro* alternativu, protože v této fázi vývoje kuřecího zárodku je již nervová soustava částečně vyvinutá. Tento test nenašel širší uplatnění a při testování oční dráždivosti se prakticky nepoužívá^{62,78}. Oproti metodě BCOP má vyšší predikční schopnost u látek nedráždivých nebo slabě dráždivých, jako jsou například kosmetické prostředky⁷⁹.

Využití chorioalantoidní membrány (CAM) je mnohem širší, než je testování oční dráždivosti. Vysoce vaskularizovaná membrána je používána v medicíně, bioinženýrství⁸⁰ a dalších oblastech výzkumu. Poprvé bylo popsáno její použití v roce 1911 při modelaci růstu implantovaného tumoru⁸¹. V oblasti vizualizace neoplastických změn se stále využívá^{82,83}. V současnosti nachází uplatnění při studiu farmakokinetických vlastností látek⁸⁴, jejich

biodistribuce⁸⁵, ale také v tkáňovém inženýrství, orgánové transplantaci^{86,87,88} nebo výzkumu angiogeneze^{89,90}. CAM obsahuje bohatou a rychle rostoucí síť krevních cév, která je využívána při vývoji nových laserových⁹¹, fotodynamických^{92,93} nebo radioterapeutických technik^{94,95}.



Obrázek 5. Léze sledované na chorioalantoidní membráně (Upraveno z [96])

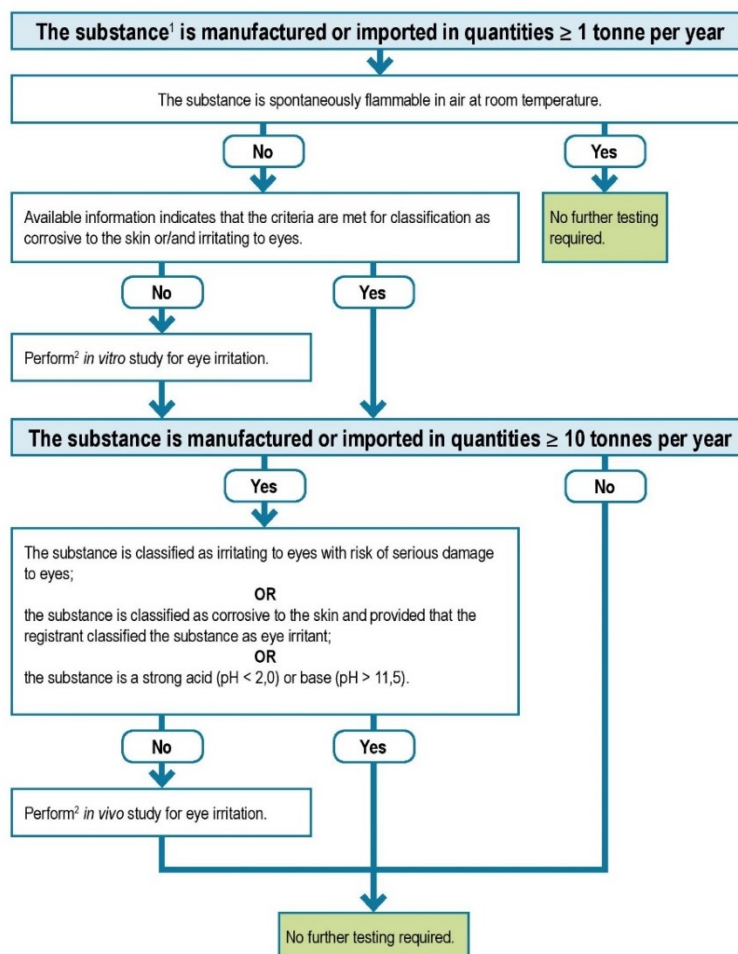
2.4 Testovací strategie využití alternativních modelů

Všechny alternativní biologické modely jsou zaměřeny na jeden specifický typ poškození. Samostatně nejsou schopny postihnout celé spektrum poškození, ke kterému při kontaktu lidského oka s dráždivou nebo leptavou látkou reálně dochází. V současné době jsou vývoj a modifikace alternativních metod směřovány k vytvoření odpovídající sadě (baterii) predikčních modelů pokrývajících co nejširší spektrum účinků^{97,98}. Pouze v tomto případě mohou alternativní metody zcela nahradit *in vivo* test a být zapracovány do příslušných legislativních předpisů hodnotící rizika chemických látek^{3,99}.

Současná chemická legislativa (REACH)⁷ požaduje zvážení nutnosti testování nebezpečnosti chemikálií za využití *in vivo* zkoušek. Žadatel o registraci chemických látek je povinen nejprve shromáždit a posoudit všechny dostupné informace např. z literatury. Dalším krokem je použití výstupů výpočtových metod (*in silico* metody) nebo využití strukturální podobnosti látek. Pokud nejsou získaná data dostatečná, je zahájeno testování. Přednostně se musí použít metody *in vitro* a *ex vivo*, pokud jsou tyto metody validované a požadované Nařízením komise (ES) č.440/2008¹⁰⁰. Pro každou sledovanou toxikologickou vlastnost je doporučena strategie postupných zkoušek s cílem vytvořit vhodné a vědecky správné údaje pro posouzení a klasifikaci škodlivosti látek. Příkladem strategie využívající všechny postupné kroky předcházející *in vivo* zkoušce je strategie testování oční dráždivosti dle Nařízení REACH, které je na *Obrázku 6*. V první fázi jsou postupně identifikovány látky hořlavé, látky leptavé kůži a oči, které nevyžadují další testování. V další fázi je požadováno provedení *in vitro* testů. Po zhodnocení výsledků těchto zkoušek a dalších požadovaných informací může být proveden *in vivo* test.

Testovací strategie jsou průběžně doplňovány o nově validované a doporučené metody. Zkoušky na zvířatech se provedou pouze v případě, že není dostatek informací pro posouzení toxicity daného účinku nebo pokud není k dispozici validovaná alternativní metoda (např. u reprodukční toxicity).

Integrated testing strategy for eye irritation under REACH



1. The substances concerned are:

- a. non-phase-in substances manufactured or imported in quantities of 1 to 10 tonnes;
- b. phase-in substances manufactured or imported in quantities of 1 to 10 tonnes and meeting the criteria in annex III;
- c. phase-in substances not meeting the criteria in annex III and manufactured or imported in quantities of 10 tonnes or more.

2. A registrant may adapt the standard testing regime in accordance with the general rules set out in annex XI section 1 (Testing does not appear scientifically necessary) and 2 (Testing is technically not possible). Under dossier evaluation the Agency may assess these adaptations to the standard testing regime.



Prévention du risque chimique, France, 2007

REACH Registration, Evaluation,
Authorisation of Chemicals

Obrázek 6. Testovací strategie oční dráždivosti dle Nařízení REACH (Převzato z [101])

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo ověření citlivosti tří různých alternativních metod využívající různé biologické modely při jejich využití jako náhrady metody *in vivo* pro testování oční dráždivosti. Výběr metod zahrnoval dvě alternativní zkoušky používající modely pro oční rohovku a jednu zkoušku založenou na modelu lidské spojivky. Experimenty s alternativními metodami byly provedeny v Testovacím zařízení SLP Výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. v Rybitví, kde všechny metodiky jsou standardně zavedeny do certifikovaného systému Správné laboratorní praxe. Pro vyhodnocení výsledků alternativních metod byla použita dostupná detailní data *in vivo* zkoušek. Experimentální fázi lze rozdělit na dva konkrétní cíle:

- Modifikovat stávající metodu BCOP pro testování barevných a viskózních látek. Pro tento typ látek navrhnout a validovat rozšíření oplachové části testu, které sníží riziko falešně pozitivních výsledků způsobených ulpíváním testované látky na rohovce nebo jejích obarvením.
- Ověřit citlivost tří různých alternativních zkoušek testování oční dráždivosti a navrhnout jejich vhodnou kombinaci, která by měla co nejvyšší srovnatelnost s *in vivo* testem na králících.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodiky testování oční dráždivosti

4.1.1 *In vivo* zkouška oční leptavosti/dráždivosti

In vivo metodika zkoušení oční leptavosti a dráždivosti prošla řadou aktualizací, které měly za cíl omezit negativní vliv na laboratorní králíky, kteří jsou modelovým zvířetem pro tento typ testu. V rámci experimentální části této práce byly využity výsledky zkoušek hodnocení nebezpečnosti chemických látek a zkoušek provedených za účelem registrace dle nařízení REACH. Většina z nich je dostupná na stránkách Evropské chemické agentury¹⁰². Zkoušky byly provedeny dle mezinárodních metodik platných v době provedení experimentu.

Provedení zkoušky

Testovacím modelem byli albinotičtí králíci bez ohledu na pohlaví. Po aklimatizaci byla zvířata zvážena a zahájena zkouška. Chemická látka se v předepsané dávce aplikovala do spojivkového vaku jednoho oka pokusného zvířete. Druhé oko tohoto zvířete sloužilo jako kontrola bez aplikace chemické látky. V časových intervalech 1, 24, 48 a 72 hodin po expozici se léze na jednotlivých částech oka (spojivka, rohovka, duhovka) a další známky podráždění (slzení, otok, systémová toxicita) pozorovaly a zaznamenávaly. Nejprve se aplikace provedla pouze jednomu zvířeti. Pokud nebyla pozorována žádná extrémní reakce oka, která by vyžadovala ukončení expozice z důvodu utrpení zvířete, byla aplikace provedena u dalších dvou zvířat. V každém testu byli použiti maximálně tři králíci. Oční reakce byla sledována až po dobu 21 dnů. Důležitým ukazatelem byla reverzibilita lézí. Pozorovaným změnám bylo přiřazováno číselné hodnocení, a to s ohledem na stupeň reakce nebo poškození. Pro hodnocení byl použit skórovací systém předepsaný metodikami OECD a EU. Součtem všech přiřazených hodnot v jednotlivých sledovaných časových intervalech byl získán Index dráždivosti pro každé zvíře. Na základě výsledného průměrného indexu dráždivosti byl vyhodnocen dráždivý potenciál testované látky. Pro účely této práce byl použit klasifikační systém platný v době provedení *in vivo* zkoušek (*Tabulka 1*), kdy se klasifikace provádí dle nejvyššího průměrného indexu zjištěného v průběhu testu.

Tabulka 1: Klasifikační stupnice *in vivo* zkoušek oční dráždivosti

Klasifikace	Akutní index oční dráždivosti
nedráždí	0 – 4,9
mírně dráždí	5 – 14,9
dráždí	15 – 29,9
silně dráždí	30 – 59,9
velmi silně dráždí	60 – 79,9
extrémně dráždí	80 – 110

4.1.2 Zkouška BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)

Zkouška byla publikována jako testovací metoda OECD v roce 2009 a následně revidována v roce 2017¹⁰³. Tato testovací metoda je použitelná pro široké spektrum chemických látek a směsí, protože předepisuje samostatný optimální postup pro aplikaci a následnou expozici pevných látek a obdobný samostatný postup pro látky kapalné. Princip měření míry poškození je pro oba typy látek stejný. Postup použitý v experimentální fázi je založen na platných mezinárodních metodikách OECD⁵² a EU¹⁰³.

Provedení zkoušky

Biologickým organotypickým modelem byla izolovaná hovězí rohovka, která si krátkodobě udržuje základní fyziologické a biochemické funkce rohovky skotu. Oči byly získány z mladých jatečných zvířat, vhodných pro vstup do potravinového řetězce lidí.

Nepoškozené izolované rohovky po prvotní selekci na tloušťku, poškození a nízkou úroveň primárního zákalu byly umístěny do speciálních držáků, kde se nacházely v předepsaném médiu a vytvářely model hovězího oka. Zkoušené látky se aplikovaly na epiteliální povrch rohovky. Principem zkoušky je změna zákalu a kompaktnosti rohovky po expozici zkoušenou látkou. Zákal se měřil kvantitativně jako množství průchodu světla rohovkou pomocí opacimetru¹⁰⁴. Propustnost se měřila kvantitativně (spektrofotometricky) jako množství barviva fluoresceinu sodného, který prošel celou tloušťkou rohovky a byl analyzován v prostoru za rohovkou, tedy na opačné straně, než byl aplikován. Toxicita látek se projevila sníženou propustností světla (zvýšeným zákaelem) a zvýšenou propustností barviva

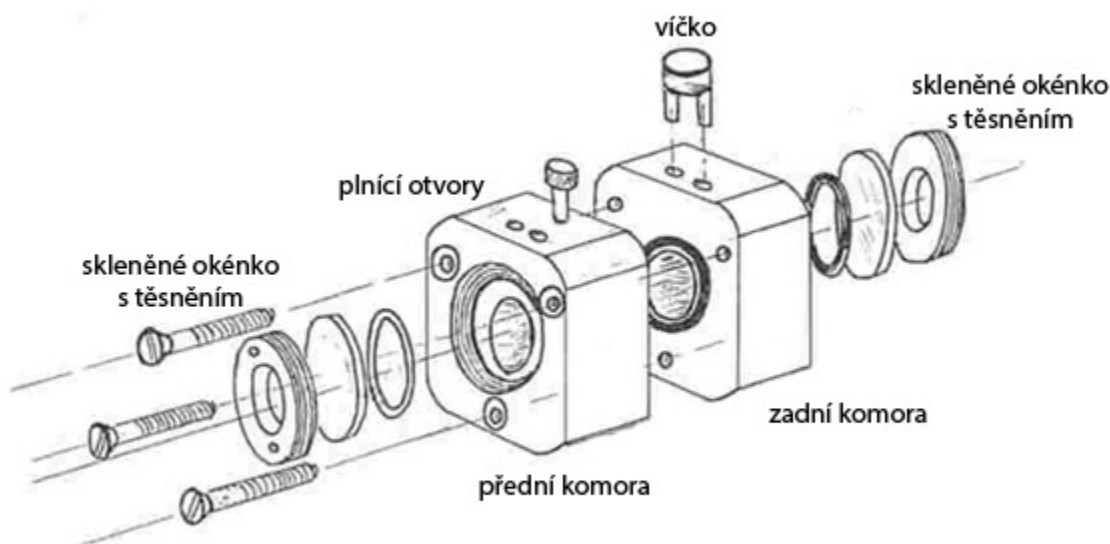
fluoresceinu. Celkové hodnocení bylo stanoveno na základě vypočteného parametru IVIS (In Vitro Irritancy Score), který zahrnuje oba sledované ukazatele¹⁰³.

Biologický model

Oči byly odebrány na jatkách. Doporučený věk skotu je 12 až 60 měsíců, protože tyto oční bulvy by měly splňovat požadavky na průměr a sílu rohovky. Bulvy byly opatrně vyjmuty co nejdříve po usmrcení zvířete tak, aby bylo minimalizováno poškození očního bulbu (k omytí hlavy na porážkovém místě nebyl použit detergent či jiný potenciální iritant).

Odebrané oči byly přepraveny v roztoku HBSS s přísadkou antibiotik (penicilin 100 IU/ml a streptomycin 100 µg/ml) a na suchém ledu (minimalizace rizika kontaminace). Zkouška byla vždy provedena v den odběru očí.

Rohovky bez defektů (poškrábání, zákal, pigmentace...) byly odříznuty s 2-3 mm lemlem bělimy. Izolované rohovky se upevnily do speciálních držáků, které se skládaly z přední (epitelové) a zadní (endotelové) komory (Obrázek 7). Obě komory byly naplněny nadbytkem predehřátého ($32\pm 1^\circ\text{C}$) roztoku EMEM – zadní komora se plnila jako první. Po naplnění byly rohovky hodinu inkubovány ve vodní lázni ($32\pm 1^\circ\text{C}$) - preinkubace.



Obrázek 7. Schéma drážku očních rohovek v testu BCOP (Upraveno z [15])

Po proběhlé preinkubaci bylo vyměněno médium v obou komorách a změřena základní opacita každé rohovky. Rohovky, jejichž hodnota opacity byla >7 se vyřadily z testu.

Vyhovující rohovky byly rozřazeny postupně do skupin: negativní kontrola, pozitivní kontrola a testované látky.

Expozice testovanou látkou

Dle charakteru testované látky byl proveden metodikou předepsaný způsob aplikace:

Tekutiny se testovaly neředěné, s délkou expozice 10 minut ($32\pm 1^\circ\text{C}$).

Polotuhé látky, pasty a vosky se testovaly neředěné jako kapaliny, s délkou expozice 10 minut ($32\pm 1^\circ\text{C}$).

Pevné látky nesmáčivé byly aplikovány neředěné, rohovky byly exponovány 4 hodiny ($32\pm 1^\circ\text{C}$).

Pevné látky smáčivé nebyly vybrány do žádné skupiny testovaných látek. Metodikou předepsaný postup s ředěním vzorků nebyl použit.

V závislosti na viskozitě látek byly pro aplikaci použity dva odlišné postupy. Metoda uzavřené komory byla použita pro neviskózní a mírně viskózní kapaliny. Při tomto způsobu aplikace byla testovaná látka ($750\ \mu\text{l}$) přidána na epiteliální stranu rohovky (do přední komory) skrz dávkovací otvory, které byly během inkubace zavřeny. Bylo nezbytné provést rovnoměrné pokrytí rohovky testovanou substancí a tím zajistit stejnou dobu expozice pro každou rohovku. Metoda aplikace s otevřenou komorou byla použita pro poloviskózní a viskózní kapaliny a pro pevné látky. Při použití metody otevřené komory bylo před aplikací látky odstraněno sklíčko z přední komory. Kontrolní nebo testovaná látka ($750\ \mu\text{l}$ nebo dostatečné množství k překrytí povrchu rohovky) byla aplikována na epiteliální povrch rohovky. Po nadávkování bylo skleněné okénko vráceno.

Po expozici byla testovaná látka, negativní nebo pozitivní kontrola odstraněna z přední komory a epitel omyt nejméně 3x médiem EMEM s fenolovou červí. V oplachování bylo vždy pokračováno, dokud FČ měnila barvu (žlutá nebo nachová) nebo pokud byla viditelná testovaná látka na povrchu rohovky.

Jakmile bylo médium bez aplikované látky, bylo provedeno konečné omytí médiem EMEM bez FČ. Přední komora byla znovu naplněna médiem EMEM bez FČ. Medium se současně vyměnilo i v zadní komoře. Pro látky, které byly exponovány 10 minut (kapaliny, smáčedla) po vyplachování následovala ještě 2hodinová inkubace při $32\pm 1^\circ\text{C}$. Na konci post-expoziční inkubace bylo vyměněno médium v obou komorách a byla změřena opacity každé rohovky. Pro látky, které byly exponovány po dobu 4 hodin, neprobíhala žádná další inkubace.

Modifikace omývacího postupu

Podle testovací metody OECD⁵² je odstranění testované látky z povrchu rohovky po ukončení expozice testovanou látkou klíčovým faktorem. Vysoce viskózní pasty a mastné látky často vykazují tendenci ulpívat na povrch rohovky a obtížně se odstraňují pomocí standardního postupu⁴³. Prodloužený kontakt vysoce lipofilních sloučenin s rohovkovou tkání může následně vést ke zvýšené penetraci. Barevné látky mohou zase způsobit trvalé zabarvení rohovky. Všechny tyto jevy mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. K eliminaci tohoto omezení byla na počátku experimentální práce validována modifikace omývacího procesu, která zahrnovala nejen šetrné mechanické odstranění aplikované látky, ale také zařazení lipofilních látek do omývacího cyklu. Proces byl ověřen na souboru 20 látek. Detailní popis experimentů a dosažených výsledků je uveden v kapitole 5.1. Tento krok byl validován⁸ a následně na pracovišti VUOS zařazen do interní metodiky v systému SLP. V současné době je již standardně používán pro komerční testování oční dráždivosti.

Měření opacity

Opacita byla měřena opacitometrem MC2 (Le spécialiste du laboratoire, Francie) jako bezrozměrné číslo. Měření bylo vždy provedeno na začátku experimentu (při přípravě očí) a potom na konci experimentu (po ukončení 2hodinové post-expoziční inkubace nebo po ukončení 4hodinové expozice). Před každým měřením opacity bylo vyměněno medium v obou komorách.

Měření permeability

Po změření opacity bylo z přední komory důkladně odsáto médium EMEM a byl přidán 1 ml roztoku fluoresceinu sodného (5 mg/ml), tj. na epitelální stranu rohovky, zatímco zadní komora byla stále naplněna čerstvým médiem EMEM. Držák byl inkubován v horizontální poloze 90 ± 5 minut při $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Po inkubaci byl odebrán roztok ze zadní komory a byla změřena absorbance pomocí UV/VIS spektrofotometru Genesys (Thermo Scientific, USA) při 490 nm (OD_{490}). V testech byla použita kyveta o tloušťce 1 cm, proto byla naměřená hodnota absorbance rovna hodnotě optické hustoty. Touto hodnotou byla kvantitativně vyjádřena průchodnost dané rohovky pro fluorescein. Takto byla získána individuální hodnota permeability pro každou rohovku.

Vyhodnocení

Přístroj MC2 měřil opacitu, tj. zákal jako bezrozměrné číslo.

- Hodnoty opacity byly nejdříve upraveny podle zákalu pozadí, tj. od hodnoty opacity po aplikaci byla u každé rohovky odečtena hodnota opacity získaná před aplikací. Tím byla získána individuální upravená opacita $O_{(ind)}$:

$$O_{\text{po aplikaci}} - O_{\text{pozadí opacity}^*} = O_{(ind) \text{ NK/PK/TL}}$$

- Následně byla pro každou skupinu rohovek (NK/PK/TL) vypočítána průměrná opacita (\bar{O}):

$$\bar{O}_{\text{NK/PK/TL}} = \sum O_{(ind) \text{ NK/PK/TL}} : 3 \text{ (počet rohovek)}$$

- Pak se průměrné hodnoty pro testovanou a pozitivní látku korigovaly odečtením průměrné hodnoty pro negativní kontrolu:

$$O_{(cor) \text{ PK/TL}} = \bar{O}_{\text{PK/TL}} - \bar{O}_{\text{NK}}$$

Takto bylo získáno bezrozměrné číslo $O_{(cor)}$ používané při výpočtu hodnoty IVIS

U permeability se z individuálních hodnot vypočítaly průměrné hodnoty pro tkáň ovlivněné testovanou látkou nebo pozitivní kontrolní látkou:

$$\bar{P}_{\text{TL}} \text{ a } \bar{P}_{\text{PK}}$$

- Průměrná permeabilita byla pak upravena odečtením průměrné permeability negativní kontroly (rozpuštědla):

$$\bar{P}_{\text{PK/TL}} - \bar{P}_{\text{NK}} = P_{(cor) \text{ PK/TL}}$$

$P_{(cor)}$ je upravená permeabilita (vyjádřená v jednotkách OD_{490}) - bezrozměrné číslo použité při výpočtu hodnoty IVIS:

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

Konečné výsledky byly vyjádřeny jako *in vitro* irritancy score (IVIS), pomocí něhož byl přiřazen dráždivý potenciál dané látky. Pro toto zařazení byla použita standardní klasifikace dle GHS (*Tabulka 2*). Látky s hodnotou iritačního skóre menší nebo rovno hodnotě 3 jsou považovány za nedráždivé bez nutnosti provést další *in vitro* nebo *in vivo* testování. Naopak látky s hodnotou IVIS vyšší než 55 musí být klasifikovány jako vážně poškozující oko (Kategorie 1). Látky s parametrem IVIS mezi hodnotami 3 až 55 nelze na základě testu BCOP klasifikovat a je nutné provést další *in vitro* nebo *in vivo* testy.

Tabulka 2: Klasifikační stupnice testu BCOP

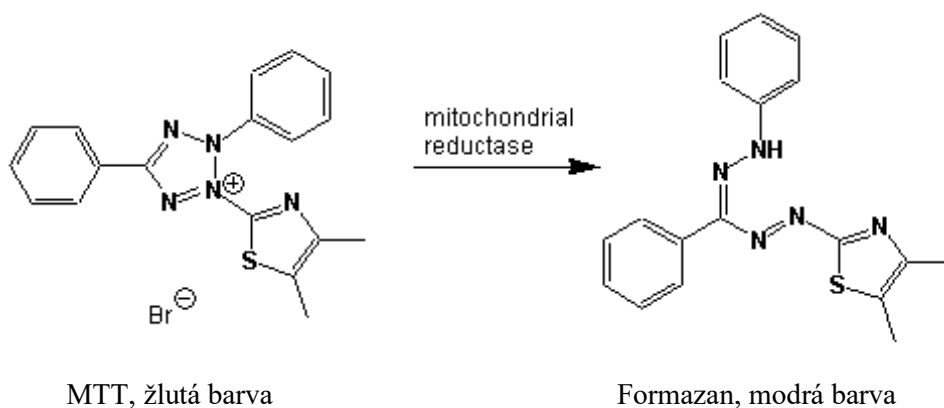
IVIS	klasifikace dle GHS
≤ 3	nedráždivá
$> 3; \leq 55$	nelze vyhodnotit
> 55	silně dráždivá až leptavá

4.1.3 Zkouška RhCE (Reconstructed human Cornea-like Epithelium)

Tato zkouška byla vydána jako testovací metoda OECD v roce 2017, kdy byly doporučeny první dva tkáňové modely. V roce 2019 byla aktualizována a mimo jiné byl rozšířen seznam doporučených tkáňových 3D modelů. Pro experimentální část této práce byl použit testovací postup dle aktuálně platné metody OECD. Poškození rohovkového epitelu chemickými látkami bylo testováno na modelu EpiOcular™ (MatTek, USA), který se používá pro zařazení testovaných chemických látek do skupin dráždivé/nedráždivé.

Provedení zkoušky

Testovaný materiál byl nanesen na povrch trojrozměrného modelu rohovkového epitelu. Po uplynutí doby expozice, omytí v pufru a post-inkubaci v médiu, se tkáň barvila roztokem MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazolium bromid). Pokud byly buňky živé, pak bylo MTT redukováno v mitochondriích na modrý formazanový produkt (*Obrázek 8*), jehož absorbance byla zjišťována pomocí spektrofotometru (při vlnové délce 570 nm). Relativní životaschopnost buněk tkáň tak odpovídala míře absorbance vztažené k negativní kontrole.



Obrázek 8: Redukce MTT na formazan (Upraveno z [105])

Biologický model

Experimentálně byl použit tkáňový model z lidských epidermálních keratinocytů, které tvoří stratifikovaný dlaždicový epitel simulující epitel rohovky. Tkáně byly kultivovány ve speciálních plastových insertech a tvořili vícevrstevnou epiteliální strukturu (5-8 vrstev). Tento model je metabolicky aktivní a vyznačuje se schopností uvolňovat cytokiny jako reakci na zánětlivé procesy, což je důležité při sledování oční iritace a zánětu¹⁰⁶. Experimenty byly prováděny dle Standardního pracovního postupu, který byl verifikován v podmínkách laboratoře¹⁰⁷.

Biologický model je dostupný pod názvem EpiOcular™ kit OCL-200. Je dodáván jako testovací souprava se všemi potřebnými komponentami (*Tabulka 3*).

Tabulka 3: Komponenty EpiOcular™ kitu OCL-200

komponenta	účel
zapečetěná deska s 24 jamkami	obsahuje 24 inzertů s tkáněmi na agaróze
24jamkové desky – 2 kusy	pro test s MTT
6jamkové desky – 4 kusy	pro expozici látkám a post-inkubaci tkání
12jamkové desky – 2 kusy	pro expozici látkám a post-inkubaci tkání
láhev serum-free assay médium	DMEM médium pro testování
zkumavka s pozitivní kontrolou	Methylacetát

Expozice testovanou látkou

Vlastnímu experimentu předcházela preinkubace tkání v nových destičkách a novém médiu, během níž se buňky aklimatizovaly na dané prostředí a eliminoval se stres z přepravy a podchlazení. Celý průběh experimentu probíhal ve sterilních podmínkách.

Všechny testované látky byly aplikovány neředěné. Kapaliny o objemu 50 μ l se dávkovaly pipetou přímo na tkáňové terčíky. Důležité bylo rozprostření vzorku po celém povrchu modelů. Částečně pevné látky (gely, vysoce viskózní kapaliny) o stejném objemu se aplikovaly výtlačnou pipetou na celý povrch terčků. Zkoušenou látku bylo možno rozprostřít i mechanicky. Pevný testovaný materiál o hmotnosti 50 mg se naněs na tkáň pomocí malé ostré lžičky. V případě nutnosti byla struktura vzorku upravena rozdrčením nebo rozetřením v třecí misce. Testovaná látka byla rozprostřena rovnoměrně po celé ploše tkáně.

Délka expozice byla 30 minut pro kapaliny a 90 minut pro pevné látky. Po expozici byla každá tkáň vyjmuta a 3x opláchnuta PBS tak, aby se testovaná látka co nejvíce odstranila. Po omytí se osušily a přenesly do nové 12jamkové desky s médiem, kde se namáčely 12 minut.

Následně se tkáně přenesly do 6jamkové desky s předehřátým médiem, kde probíhala postinkubace další 2 hodiny u kapalných testovaných vzorků nebo 18 hodin u pevných testovaných vzorků. Po této postinkubaci byly tkáně osušeny a přeneseny do roztoku MTT, kde došlo k jejich obarvení.

Pro posouzení validity průběhu testu byla vždy do skupiny testovaných látek vložena metodikou doporučená pozitivní kontrola (methylacetát), tedy látka s prokázaným a definovaným pozitivním dráždivým efektem. Pozitivní i negativní kontrola se vždy testovala souběžně s testovanými látkami, způsob aplikace, délka expozice i vyhodnocení byly vždy stejné.

Barvení pomocí MTT

Pro posouzení životaschopnosti tkání byly inserty přeneseny do 24jamkové desky s barvicím roztokem MTT (300 μ l na jamku), kde byly barveny 3 hodiny. Barvení probíhalo za sterilních podmínek a při stálé teplotě 37 °C.

Pro stanovení intenzity obarvení bylo nutno barvivo z tkání extrahovat pomocí isopropanolu. Tkáně byly opatrně osušeny a přeneseny do stejně velké desky s isopropanolem. Destička byla překryta folií a víčkem, poté byla buď umístěna do lednice přes noc, nebo byla ihned extrahována po dobu 2-3 hodin při pokojové teplotě na třepače.

Z každé tkáně byl slit isopropanol a z extraktu bylo odebráno 2x200 μ l do 2 jamek na 96jamkové desce (1 jamka/200 μ l). Stejný postup byl u tkání exponovaných NK a PK. Bylo

nutné vždy přidat také slepý vzorek (blank), kterým byl čistý isopropanol. Absorbance extraktů na 96jamkové desce byla měřena při 570 nm na spektrofotometru Epoch (BioTek, USA).

Vyhodnocení

- Byla vypočítána průměrná hodnota blanku (ODBlk).
- Průměrná hodnota blanku byla odečtena od každé hodnoty OD v experimentu (hodnoty korigované na blank).
- Byla vypočítána průměrná hodnota dvou aliquotů pro každou tkáň (průměrná OD pro jednotlivou tkáň).
- Byla vypočítána průměrná hodnota odpovídajících tkání pro každou kontrolu a každou testovanou látku (průměrná hodnota pro testovanou látku/kontrolu).
- Korigovaná hodnota OD negativní kontroly odpovídala 100% životaschopnosti.
- Byla vypočítána procentuální životaschopnost odpovídajících tkání pro kontroly a testovanou látku vzhledem k negativní kontrole (100 %).
- Byl vypočítán rozdíl životaschopností mezi stejně ovlivněnými tkáněmi. Jestliže je >20 % (2 tkáně) testovaná látka nemohla být hodnocena.
- Testovaná látka byla klasifikována podle predikčního modelu. Pokud byla průměrná životaschopnost tkáně vztažená k negativní kontrole ≤ 60 %, pak látka vyžadovala klasifikaci dle GHS kategorie 2 – dráždivé pro oko.

Korekční testy

Některé testované chemikálie mohly interferovat s MTT (díky své barvě) nebo MTT redukovat, takže výsledkem by byla modrá barva, která nebyla způsobena činností mitochondriální dehydrogenázy. Ačkoliv byla v testu látka vždy opláchnuta a médium pod tkáněmi bylo před kontaktem s MTT vyměněno, zbytkové množství testované chemikálie se mohlo uvolnit. Potom by barvivo mohlo přímo redukovat MTT, což by bylo interpretováno jako „životaschopnost tkáně“. Kontrolu redukční schopnosti nebo schopnosti interference bylo nutné provést před samotným zahájením každé testovací procedury. Před testováním barevných látek bylo nutno provést korekční testy se zvláštní kontrolou (Colorant Control), která by toto zkreslení odhalila a korigovala. Žádný ze zkoušených vzorků neinterferoval s barvivem MTT.

Kontrola validity testu

V testech byla každá látka testována nejméně na 2 tkáních. Aby byly výsledky testu akceptovatelné, musel být rozdíl mezi tkáněmi menší než 20 %. Jako negativní kontrola byla použita sterilní destilovaná voda. Test splňoval akceptační kritérium, pokud byly průměrné hodnoty v rozmezí $0,8 < OD < 2,5$. Jako pozitivní kontrola byl použit 99 % methylacetát (CAS 79-20-9), který byl dodán výrobcem tkání MatTek. Průměrná životaschopnost tkáně u této kontroly měla být ≤ 50 %. Výsledky všech negativních a pozitivní kontrol splňovaly předepsaná kritéria.

4.1.4 Zkouška HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane)

HET-CAM je alternativní „*in vitro*“ metoda, která využívá chorioalantoidní membránu slepičích vajec. Chorioalantoidní membrána fertilizovaného slepičího vejce byla shledána jako vhodný organotypický model, na kterém lze detekovat škodlivý efekt testované látky. Tato vaječná membrána alternuje spojivkovou tkáň oka. Metoda nebyla doposud zařazena mezi OECD testovací postupy. Použitá metodika vycházela z ICCVAM protokolu pro screening oční dráždivosti¹⁰⁸.

Postup zkoušky

Testovaná látka byla aplikována přímo na CAM. Ihned po aplikaci byly pomocí stereomikroskopu sledovány viditelné změny na cévách membrány. Po stanovenou dobu 5 min byla sledována přítomnost hemoragií (krvácení z cév), vaskulární léze a koagulace vaskulárních proteinů. Výpočet iritačního skóre (IS) vycházel z numerických hodnot přiřazených nástupu jednotlivých lézí v pevně stanovených časových intervalech. Vzhledem k účelu experimentů nebyla hodnocena intenzita poškození, ale pouze pozitivita nebo negativita. Jako pozitiva byly hodnoceny všechny úrovně podráždění, tedy IS vyšší nebo rovno 1.

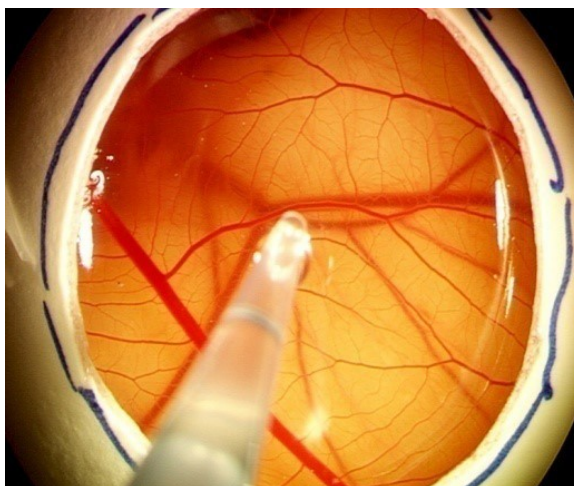
Expozice testovanou látkou

Pro testování byla použita pouze prokazatelně oplozená vejce od slepic plemene Leghorn o hmotnosti 50 až 60 g. Po přepravě do laboratoře byla vejce inkubována za předepsaných teplotních a vlhkostních podmínek a při pravidelném otáčení v líhni do devátého dne inkubace, kdy byl proveden vlastní test. V tomto intervalu ještě není zcela vyvinuta nervová tkáň ani receptory bolesti kuřecího embrya.

Osmý den inkubace byla vejce opět prosvícena lampou, na skořápku byla obyčejnou tužkou vyznačena hranice vzduchové bubliny a poté byla opět uložena do líhně. Devátý den inkubace byla vejce vyjmuta a rozdělena do skupin: negativní kontrola, pozitivní kontrola a testované látky. V každé skupině byla použita vždy nejméně 3 vejce. Vejce byla označena obyčejnou tužkou na boku číslem a popisem.

Devátý den inkubace byl u všech vajec skalpelem vytvořen otvor do skořápky a nůžkami byla odstrižena skořápka mírně nad předem vyznačenou hranici vzduchové bubliny tak, aby nedošlo k poranění vnitřní papírové membrány. Membrána byla následně smočena fyziologickým roztokem a vejce byla vrácena do líhně na dobu 30 min. Během této doby byl pohyb líhně již vypnut a vejce nebyla otáčena. Po 30minutové inkubaci v líhni, byl fyziologický roztok odstraněn (vylit) a pinzetou byla velice opatrně odejmuta papírová membrána. Tím došlo k odhalení chorioalantoidní membrány, na kterou byla následně dávkována testovaná látka, negativní a pozitivní kontrola.

Kapaliny a pasty byly dávkovány v množství 0,3 ml pomocí pipety. Rozdrcené pevné látky byly dávkovány v objemu 0,3 ml (pomocí pipety). Pokud však objem 0,3 ml přesáhl hmotnost 0,3 g, bylo aplikováno pouze 0,3 g (pomocí kopistu – špachtlička). V metodice je upřednostňováno zkoušet látky nerozpuštěné a neředěné, ale v odůvodněných případech lze testovanou látku ředit fyziologickým roztokem, olivovým olejem nebo jiným vhodným rozpouštědlem. Žádnou z testovaných látek nebylo nutno ředit nebo rozpouštět. Vždy bylo množství látky dostatečné k pokrytí 50 % plochy membrány. Po aplikaci testované látky byl povrch membrány sledován pomocí stereomikroskopu. Pro přesnější vyhodnocení bylo vhodné průběh reakce membrány zaznamenávat, a proto byl v experimentech používán stereomikroskop Leica S8APO s kamerou Leica MC 170HD. Všechny změny viditelné na cévách chorioalantoidní membrány byly vyhodnoceny.



Obrázek 9. Aplikace kapalné látky na odkrytou chorioalantoidní membránu

Kontrola validity testu

Kontrola spolehlivosti (validity zkoušky) byla provedena souběžným testováním pozitivní a negativní kontrolní látky. Pozitivní látka musí vyvolat poškození (hemoragie, lyze a koagulace) cév chorioalantoidní membrány slepičího vejce při minimálním mikroskopickém zvětšení stereomikroskopu (10x – 80x). Negativní látka nesmí způsobit žádné poškození cév chorioalantoidní membrány slepičího vejce při maximálním mikroskopickém zvětšení. Do každého experimentu byla zařazena doporučená a ověřená látka pro pozitivní kontrolu (1% NaOH) a pro negativní kontrolu (0,9% NaCl). Reakce CAM na kontakt s těmito látkami potvrdila validitu provedených zkoušek.

Vyhodnocení

Při hodnocení byl používán stereoskopický mikroskop. Na cévách membrány byla po stanovenou dobu sledována přítomnost a rychlost nástupu těchto změn:

- 1) hemoragie (krvácení z cév)
- 2) vaskulární léze (nastříknutí krevních cév)
- 3) koagulace (denaturace vaskulárních proteinů)

Doba pozorování chorioalantoidní membrány slepičího vejce nepřesáhla 300 s. Byl zaznamenáván čas poškození (v sekundách) při 80násobném zvětšení a charakter poškození. Vyhodnocení dráždivosti bylo prováděno dle postupu uvedeného v protokolu ICCVAM¹⁰⁸ stanovující iritační skóre (IS) na základě rychlosti nástupu každého ze tří sledovaných koncových bodů HET-CAM zkoušky ve fixních časových intervalech 0,5, 2 a 5 minut⁵⁸.

Na základě typu a rychlosti nástupu lézí byly přiděleny číselné hodnoty (*Tabulka 4*). Vyšší číselná hodnota byla přiřazována toxikologicky závažnějším lézím (koagulace), které ukazovaly na větší poškození cévní struktury CAM.

Tabulka 4: Skórovací systém pro hodnocení dráždivosti metodou HET-CAM

Efekt	Skóre		
	0,5 min	2 min	5 min
Vaskulární léze	5	3	1
Hemoragie	7	5	6
Koagulace	9	7	5

Přidělené číselné hodnoty byly sčítány a výsledkem byla numerická hodnota (Iritační skóre) označující potenciál podráždění zkoušené látky na stupnici s maximální hodnotou 21. Pro celkové posouzení dráždivého potenciálu zkoušené látky bylo ze všech exponovaných vajec vypočteno průměrné IS. *Tabulka 5* ukazuje hodnocení nebezpečnosti látek dle dosažené průměrné hodnoty IS²⁷. V případě, že nebylo pozorováno žádné cévní poškození chorioalantoidní membrány (v čase 300 sekund), byla testovaná látka považována za negativní, tj. nezpůsobující podráždění spojivkové tkáně oka.

Tabulka 5: Klasifikace potenciálu chemických látek dle hodnoty IS (průměr ze 3 opakování)

Potenciál látky	Hodnota IS
Nedráždivá	<1
Mírně dráždivá	1 - <5
Středně dráždivá	5 - <9
Leptavá/silně dráždivá	9 - 21

4.2 Zkoušené látky/ výběr vzorků

4.2.1 Modifikace metody BCOP – optimalizace postupu oplachu testované látky z povrchu rohovek

Dle metodiky OECD č. 437 je použitelnost zkoušky BCOP omezená pro látky barevné a vysoce viskózní. Vysoce viskózní pasty a mastné látky často vykazují silnou tendenci ulpívat na povrchu rohovek a je velmi obtížné je omýt standardním postupem za použití roztoku EMEM s nebo bez FČ. Dlouhodobý kontakt lipofilních látek může způsobit zvýšenou penetraci. Barevné látky mohou obarvit povrchovou vrstvu rohovky. V těchto případech se může projevit falešná pozitivita zkoušky.

Pro optimalizaci postupu oplachu byly navrženy dva nové kroky s cílem zvýšit účinnost odstraňování vysoce viskózních a barevných látek. První úprava spočívala v zařazení lipofilního oplachu (olivový olej) mezi standardní oplachy roztokem EMEM. Druhým krokem bylo přidání mechanického odstranění ulpívající testované látky z povrchu rohovky pomocí vatového tamponu. Důležité bylo experimentálně ověřit, zda tyto modifikace nemají vliv na validitu testu BCOP a současně, zda skutečně sníží falešnou pozitivitu výsledků testů s těmito látkami.

Byla vybrána skupina 20 viskózních látek s různou barevností. Klíčovým parametrem byla hustota a konzistence. U chemických a farmaceutických látek byl znám dráždivý potenciál z *in vivo* zkoušky. U kosmetických produktů logicky nebyl tento údaj dostupný, ale výhodou těchto vzorků byla pastovitá konzistence a obsažené barvivo. Z laboratorní praxe je známo, že právě tyto látky nelze standardní metodou BCOP testovat. V *Tabulce 6* je přehled použitých látek, jejich hustota, barva a odhad dráždivosti pro oko. Do experimentu byly zařazeny také látky komerčně testované na pracovišti VUOS a jejich přesnou identitu nelze publikovat. Pro vyhodnocení vlivu modifikace metody nebylo přesné složení těchto látek podstatné.

Pro vyhodnocení vlivu obou navržených modifikací byl proveden doplňující kontrolní experiment s 30 rohovkami. Bez expozice chemickou látkou bylo 10 rohovek omyto standardním postupem, 10 rohovek postupem s vloženým oplachem olivovým olejem a u 10 rohovek byl proveden mechanický kontakt odpovídající otření látky z povrchu a následné omytí kombinací EMEM média a olivovým olejem.

Další ověření vlivu mechanického kontaktu s povrchem rohovky bylo provedeno na třech pozitivních látkách (1% NaOH, 20% Imidazol a DMFA). Všechny látky byly testovány třemi variantami testu BCOP, tj. se standardním oplachem, s vloženým oplachem olivovým olejem a s mechanickým otřením povrchu rohovky.

Tabulka 6: Charakteristika látek použitých při optimalizaci testu BCOP

	Název látky/ kód		Hustota g/ml	Barva	Předpokládaná dráždivost
1	176/12	Chemická látka	0,82	černá	Ano*
2	177/12	Chemická látka	1,09	červená	Ne*
3	Vazelína	Chemická látka	0,87	bílá	Ne*
4	Hliníkové mazivo	Chemická látka	1,00	šedá	Ne**
5	Olejová barva	Chemická látka	1,00	červená	Ne**
6	Plastické mazivo	Chemická látka	0,72	bílá	Ne**
7	12/09	Farmaceutická látka	0,80	bezbarvá	Ano*
8	Imazol krém	Farmaceutická látka	0,71	bílá	Ano**
9	101/08	Farmaceutická látka	0,73	bílá	Možná**
10	Ichtoxyl mast	Farmaceutická látka	0,80	tmavě hnědá	Možná**
11	Dermazulen mast	Farmaceutická látka	0,68	bezbarvá	Možná**
12	Triancinolon E mast	Farmaceutická látka	0,73	bezbarvá	Ne **
13	Veterinární mast	Farmaceutická látka	0,80	bílá	Ne **
14	245/11	Farmaceutická látka	0,85	bílá	Ne*
15	Wella lak na vlasy	Kosmetický produkt	0,90	růžová	nejsou informace
16	Lak na vlasy	Kosmetický produkt	0,90	bezbarvá	nejsou informace
17	Kakaové tělové máslo	Kosmetický produkt	0,81	bílá	nejsou informace
18	Make up	Kosmetický produkt	0,98	hnědá	nejsou informace
19	Peeling krém	Kosmetický produkt	0,84	bezbarvá	nejsou informace
20	Deodorant	Kosmetický produkt	0,62	bílá	nejsou informace

Pozn.: * - *in vivo data VUOS*; ** - *příbalový leták nebo MSDS*

4.2.2 Ověření citlivosti *in vitro* metod testování oční dráždivosti

Cílem hlavní experimentální části bylo ověření citlivosti tří alternativních metod testování oční dráždivosti využívající různé biologické modely pro lidskou rohovku a spojivku. Pro laboratorní experimenty byly vybrány různé chemické látky a směsi se známým *in vivo* účinkem na oko. Pro výběr látek byla klíčovým ukazatelem dostupnost detailních výsledků zkoušky oční dráždivosti na králících, a to včetně klinického pozorování očních lézí. Skupina zahrnovala látky dráždivé nebo poškozující různé části oka i látky nedráždivé. Cíleně byly vybrány látky, u nichž byl zaznamenán různý stupeň podráždění nebo poškození spojivky, i když celkový výsledek testu byl negativní. U některých látek byly k dispozici výsledky *in vivo* zkoušky včetně detailních klinických dat popisujících nejen reakci oka králíka po celou dobu studie, ale také jeho celkový zdravotní stav. Soubor látek obsahuje pevné látky i kapaliny. Na základě výsledků první experimentální části, kdy byla modifikována metoda BCOP pro vysoce viskózní a barevné látky, byl pro druhou experimentální fázi použit i tento typ látek. Všechny vzorky byly postupně testovány metodami HET-CAM, BCOP a RhCE.

Pro hodnocení *in vivo* reakce byly použity údaje o látkách registrovaných dle Nařízení REACH¹⁵, které jsou volně dostupné na stránkách ECHA. Dále byly použity výsledky studií, u kterých byly k dispozici primární záznamy. Jedná se o studie provedené v rámci hodnocení nebezpečnosti chemických látek a registrace chemických látek. Pro účely této doktorské práce nebyl proveden žádný *in vivo* test a pouze byla použita data již provedených zkoušek. Přehled použitých látek a výsledky *in vivo* testů jsou uvedeny v *Tabulce 7*.

Tabulka 7: Přehled látek použitých pro ověření citlivosti *in vitro* zkušebních metod

č.	Chemická látka/ název	CAS	skupenství/barva	zdroj
1	3-Methyl-1,1-difenylnmočovina	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	kapalina/ žlutá	ECHA
5	substituovaný amin	--	pevná látka/ fialová	VUOS
6	1,3-Diethyl-1,3-difenylnmočovina	85-98-3	pevná látka/ bílá	ECHA
7	octan amonný	631-61-8	pevná látka/ bílá	ECHA
8	dusičnan barnatý	10022-31-8	pevná látka/ bílá	ECHA
9	síran hořečnatý	7487-88-9	pevná látka/ bílá	ECHA
10	fungicidní směs (10% oxichlorid měďnatý)	--	pevná látka/ zelená	VUOS
11	Chloramin-T	149358-73-6 (127-65-1)	pevná látka/ bílá	ECHA
12	Dust, steelmaking	65996-72-7	pevná látka/ hnědošedá	ECHA
13	Direct Black 19	6428-31-5	pevná látka/ černá	ECHA
14	xylensulfát sodný	1300-72-7	pevná látka/ nažloutlá	ECHA
15	karbamát	--	pevná látka/ bílá	VUOS
16	humitan sodný	68131-04-4	kapalina/ tmavě hnědá	ECHA
17	benzyl benzoát	120-51-4	kapalina/ bezbarvá	ECHA
18	3,4-Ethylendioxythiopene	126213-50-1	kapalina/ bezbarvá	ECHA
19	Dimethylformamid	68-12-2	kapalina/ bezbarvá	ECHA
20	bělící hlinka	--	pevná látka/černozelená	VUOS
21	cyklický uhlovodík	--	pevná látka/ bílá	VUOS
22	karbamát	--	pevná látka/ bílá	VUOS
23	halogenovaný hydrazin	--	pevná látka/ bílá	VUOS
24	směs aminů	--	kapalina/ žlutá	VUOS
25	imidazol	--	pevná látka/ šedobílá	VUOS
26	benzothiazol	--	pevná látka/ hnědá	VUOS
27	derivát chinoxalinu	--	pevná látka/šedobílá	VUOS
28	naftochinon	--	pevná látka/ žlutozelená	VUOS
29	karbazol	--	pevná látka/ zelenožlutá	VUOS
30	adamantan	--	kapalina/ bezbarvá	VUOS

Pozn. VUOS – látky komerčně testované ve VUOS, detaily nelze publikovat

ECHA – informace volně dostupné na stránkách ECA¹⁰²

U látek s volně dostupnými výsledky *in vivo* testů (registrované dle nařízení REACH) je uvedena přesná identifikace včetně CAS čísla. U vzorů testovaných v rámci hodnocení

nebezpečnosti chemických látek, které nejsou volně dostupné na stránkách ECHA, je majitelem výsledků zadavatel studií. Z toho důvodu je uvedena pouze chemická skupina, do které se látka řadí.

V *Tabulce 8* je přehled výsledků *in vivo* zkoušek na králících. Pro porovnání s alternativními modely jsou uvedeny sledované změny oční rohovky, spojivky a další léze, které byly způsobeny aplikací zkoušené látky. Soubor vzorků obsahuje látky s různě silným dráždivým potenciálem i látky nedráždivé.

Tabulka 8: Dostupné výsledky *in vivo* testů oční dráždivosti

č.	závěr <i>in vivo</i> zkoušky	poškození/podráždění rohovky	poškození/podráždění spojivky	jiné léze
1	nedráždí	--	--	--
2	dráždí	střední	střední	duhovka: mírné podráždění, mžurka: střední podráždění
3	nedráždí	--	mírné až střední	mžurka – mírně
4	velmi silně dráždí	výrazné	výrazné	otok, slzení
5	mírně dráždí	mírné	mírné	otok, slzení
6	nedráždí	--	mírné	slzení mírné
7	nedráždí	--	mírné	--
8	dráždí	--	střední	duhovka: mírné až střední podráždění
9	nedráždí	mírné	mírné	duhovka: mírné podráždění
10	silně dráždí	výrazné	výrazné	duhovka: mírné podráždění
11	silně dráždí	výrazné	výrazné	--
12	nedráždí	mírné	střední	slzení
13	nedráždí	--	mírné	mžurka: mírné podráždění
14	dráždí	--	střední	mžurka: mírné až střední podráždění
15	mírně dráždí	mírné až střední	střední	otok víček, výtok
16	nedráždí	--	mírný	--
17	nedráždí	--	mírný	--
18	nedráždí	--	mírný	--
19	dráždí	mírné	výrazné	--
20	mírně dráždí	mírné	střední	--
21	dráždí	mírné	mírné až střední	--
22	dráždí	střední	střední až výrazné	--
23	nedráždí	--	mírné	úhyn, systémová toxicita
24	nedráždí	--	mírné	--
25	nedráždí	--	mírné až střední	duhovka: mírné podráždění
26	mírně dráždí	--	mírné až střední	--
27	dráždí	mírné až střední	střední	--
28	nedráždí	--	mírné	mžurka: mírné podráždění
29	mírně dráždí	--	mírné až střední	--
30	mírně dráždí	--	mírné až střední	--

5 Výsledky a diskuse

5.1 Modifikace metody BCOP – optimalizace postupu oplachu testované látky z povrchu rohovek

5.1.1 Výsledky

Vysoce viskózní a barevné látky vybrané pro modifikaci testu BCOP (*Tabulka 6*) byly nejprve otestovány testem BCOP, dle OECD testovacího postupu, tedy se standardním trojitým oplachem médiem EMEM. Dalším krokem ověření navržené modifikace bylo použití testu BCOP s modifikovaným oplachem. Mezi standardní EMEM médium byl vložen oplach olivovým olejem. Cílem bylo zvýšení účinnosti omývacího procesu u látek rozpustných v nepolárních rozpouštědlech, a to především látek barevných. Ve třetím kroku experimentu byla stejná skupina látek otestována další variantou testu BCOP, kdy bylo před oplachovou částí provedeno mechanické odstranění reziduí látky z povrchu rohovky pomocí vatového tamponu. Po tomto kroku následoval opět proces rozšířeného oplachu kombinací média EMEM a olivovým olejem. Tato modifikace byla navržena pro vysoce viskózní látky.

Průměry naměřených hodnot opacity a permeability a odpovídající vypočtená skóre IVIS jsou shrnuty v *Tabulkách 9 a 10*. Každý experiment (oplach dle standardní metody BCOP, modifikace s nepolárním oplachem a modifikace s mechanickým odstraněním látky z rohovky) byl proveden na skupině pěti rohovek, které byly nezávisle vyhodnoceny. Celkem tedy bylo pro každou látku použito 15 rohovek. Výsledky všech tří variant byly porovnány nejen mezi sebou, ale také s předpokládaným iritačním potenciálem testovaných látek. V rámci verifikace byl ověřen vliv obou kroků na intaktní rohovky a tím vyloučena možnost falešně pozitivního efektu obou modifikací.

Při provedení standardního oplachu (3x EMEM) byla u 11 vzorků (55 %) pozorována rezidua testovaných látek na povrchu rohovek. Ve dvou případech zůstala rohovka obarvená vzorkem. Použitím oplachu nepolárním rozpouštědlem došlo ke zvýšení účinnosti omývacího procesu. Rezidua testovaných látek byla pozorována u 7 vzorků (35 %) a obarvení rohovek bylo zaznamenáno pouze u jednoho vzorku. Při zařazení mechanického odstranění látky z povrchu rohovky byla rezidua aplikovaného vzorku zjištěna pouze u vzorku č.1 (5 %).

Tabulka 9: Modifikace omývací fáze testu BCOP - Průměrné hodnoty opacita a permeability

č.	omytí EMEM			omytí EMEM+olej			mechanické odstranění + omytí EMEM +olej		
	OP	PER	rezidua	OP	PER	rezidua	OP	PER	rezidua
1	55,2	0,039	+ B	66,2	0,057	+ B	36,6	0,052	+
2	53,4	0,012	+ B	5,4	0,009	N	6	0,01	N
3	101	0,021	+	82,4	0,012	+	13	0,011	N
4	38	0,017	+	9,8	0,026	N	2,2	0,014	N
5	9,6	0,067	N	37	0,012	N	10,4	0,023	N
6	3	0,023	N	10,6	0,023	N	12	0,054	N
7	209,4	0,089	+	214	0,071	+	79,4	0,023	N
8	204,6	0,013	+	229,2	0,02	+	71,2	0,054	N
9	18,4	0,185	N	43,2	0,039	N	29,6	0,032	N
10	11,6	0,084	N	23,6	0,029	N	6,4	0,013	N
11	9,8	0,043	N	6	0,037	N	7,6	0,065	N
12	202,4	0,016	+	20,4	0,064	N	5	0,041	N
13	8,8	0,047	N	15,4	0,032	N	10,2	0,014	N
14	141,2	0,026	+	8,4	0,014	N	9,6	0,032	N
15	168	0,026	+	160,8	0,012	+	21	0,019	N
16	15	0,013	N	50,8	0,027	N	11	0,054	N
17	227,2	0,023	+	232,4	0,015	+	23,2	0,009	N
18	16	0,018	N	15,4	0,022	N	7	0,009	N
19	113,4	0,026	+	115,8	0,093	+	80,4	0,045	N
20	19,4	0,776	N	19,4	0,850	N	13,4	0,611	N

Pozn. OP – průměrná opacita; PER – průměrná permeabilita; + – přítomnost testované látky na rohovce po ukončení omývací fáze; B – přetrvávající obarvení rohovky po ukončení omývací fáze; N – bez reziduí látky na rohovce

Při provedení standardního testu BCOP byl dráždivý potenciál (hodnota IVIS vyšší než 55) naměřen u devíti vzorků tj. 45 % látek. U všech těchto vzorů byla zaznamenána přítomnost zkoušené látky na povrchu rohovky i po trojitém omytí roztokem EMEM. Použití první modifikace s omytím pomocí olivového oleje vedlo k výraznému snížení vypočtených hodnot IVIS u dvou vzorků (č.12 a 14). U těchto látek došlo k úplnému odstranění látky z povrchu rohovky. U ostatních sedmi vzorků (č.1, 3, 7, 8, 15, 17 a 19) kde byla hodnota IVIS vyšší než 55 nedošlo k podstatnému snížení hodnoty iritačního skóre. U dalších čtyřech vzorků došlo ke snížení vypočtené IVIS (č. 2, 4, 11, 18). Nejvýraznější pokles indexu dráždivosti byl pozorován u vzorků, kde modifikace způsobila odstranění zkoušené látky z rohovky. Naopak použití olivového oleje vedlo ke zvýšení hodnoty IVIS u šesti vzorků (č. 5, 6, 9, 10, 13 a 16), i když u žádného z nich nezpůsobilo zvýšení nad limitující hodnotu 55. U vzorku č. 20 byla hodnota IVIS bez výrazné změny.

Druhá modifikace oplachové části testu byla založena na kombinaci mechanického odstranění zbytků testované látky z povrchu rohovky a následném oplachování roztokem EMEM médiem a olivovým olejem. Ze sedmi vzorků, u kterých použitím první modifikace nedošlo ke snížení skóre IVIS (č. 1, 3, 7, 8, 15, 17, 19), způsobilo zařazení mechanického odstranění látky do omývací fáze pokles hodnoty IVIS pod limit u čtyřech z nich (1, 3, 15 a 17). U všech mimo č.1 došlo k úplnému odstranění vzorků z povrchu rohovek. U vzorků 7, 8 a 19 zůstala hodnota IVIS vyšší než 55, ale zařazení druhé modifikace do testu způsobilo výrazné snížení této hodnoty. Naopak zvýšení hodnoty IVIS u čtyřech vzorků (č. 5, 6, 9, 13). U všech těchto látek byla nově získaná hodnota skóre hluboko pod hodnotou 55.

Tabulka 10: Modifikace omývací fáze testu BCOP – Průměrné hodnoty IVIS

č.	omytí EMEM	omytí EMEM + olej	mechanické odstranění + omytí EMEM +olej
1	55,78*	67,06*	37,39
2	53,58	5,4	6,16
3	101,31*	82,59*	13,17
4	38,26	10,2	2,41
5	10,6	37,17	10,74
6	3,35	10,94	12,81
7	210,73*	215,07*	80,08*
8	204,79*	229,51*	72,16*
9	21,18	43,79	30,08
10	12,86	24,04	6,6
11	10,45	6,56	8,58
12	202,64*	21,35	5,61
13	9,51	15,87	10,42
14	141,6*	8,61	10,08
15	168,38*	160,99*	21,29
16	15,19	51,21	11,82
17	227,55*	232,63*	23,34
18	16,28	15,72	7,14
19	113,79*	117,2*	81,07*
20	31,04	31,15	22,57

Pozn. * dle GHS lze látku klasifikovat

5.1.2 Diskuse

Pro první experimentální část práce byly navrženy dvě změny omývacího procesu testu BCOP, který se standardně prováděl dle OECD testovací metody. Cílem modifikací bylo zvýšit účinnost odstranění barevných a viskózních testovaných látky z povrchu rohovky. Rezidua těchto látek zvyšovala měřené hodnoty opacity a tím způsobovala falešně pozitivní výsledky⁵². První modifikace založená na použití olivového oleje jako nepolárního omývacího média způsobila výrazný pokles hodnot IVIS u pětiny vzorků (č.2, 4, 12 a 14). Tento efekt souvisel

se snížením přítomnosti reziduí zkoušených látek na povrchu rohovky a s tím související zvýšení propustnosti světla. Naměřené hodnoty opacity byly výrazně nižší než při použití metodikou předepsaného postupu. U dvou vzorků byl pozorován opačný efekt (č. 5 a 16) kdy použití olivového oleje k odstranění testované látky z povrchu způsobilo zvýšení hodnoty IVIS. V těchto případech došlo pouze ke zvýšení naměřené hodnoty opacity, ale hodnoty permeability nebyly výrazně ovlivněny. Rozpuštění nepolárních látek v olivovém oleje mohlo způsobit jejich průnik do vrchních vrstev rohovky a tím snížit světelnou propustnost. Možným vysvětlením by mohl být účinek samotného olivového oleje, ale to nebylo v kontrolních testech bez chemikálií potvrzeno. Použití oleje do oplachovacího kroku nezpůsobilo navýšení hodnoty IVIS nad limitní hranici 55, tedy nedošlo k falešně pozitivní odpovědi.

U dvou vzorků (č. 12 a 19) byla pozorována zvýšená permeabilita při použití první modifikace. U vzorku č. 12 byl tento efekt vyvážen snížením hodnot opacity a tím i celkovým snížením skóre IVIS. Naopak u vzorku č. 19 byl zaznamenán mírný nárůst skóre dráždivosti. U ostatních vzorků nebyl zaznamenán vliv obou modifikací na hodnoty permeability.

Mechanické odstranění zbytků testovaných látek z povrchu rohovek před rozšířenou sekvencí oplachovacích kroků vedlo k výraznému zvýšení účinnosti odstraňování testovaných látek, jejichž rezidua byla příčinou neprůhlednosti rohovek a tím zvýšení výsledného IVIS skóre u čtyřech vzorků (č. 1, 3, 15 a 17). Také v těchto případech nebyla pozorována výrazná změna v propustnosti rohovek.

Pro ověření vlivu samotných modifikací na kompaktnost epitelu rohovky byly provedeny testy bez chemických látek a testy se třemi pozitivními kontrolními látkami. Ve všech případech neměla samotná aplikace mechanického kontaktu a zařazení olivového oleje do omývacího procesu významný vliv na měřené hodnoty opacity a permeability. Také provedené histopatologické vyšetření exponovaných rohovek prokázáno, že modifikace nezpůsobují narušení epitelu rohovky.

5.2 Ověření citlivosti *in vitro* metod testování oční dráždivosti

5.2.1 Zkouška HET-CAM

5.2.1.1 Výsledky

Skupina 30 vzorků (*Tabulka 7*), která byla vybrána pro ověření citlivosti *in vitro* metod pro testování oční dráždivosti, byla otestována metodikou HET-CAM popsanou v kapitole 4.1.4. Metodika je vhodná pro různé typy látek. Kapalné vzorky (č. 5, 16, 17, 18, 19, 24 a 30) byly aplikovány v objemu 0,3 ml pipetou. Barevné kapaliny byly nanášeny k okraji odhalené membrány tak, aby část zorného pole zůstala odkrytá a bylo možno hodnotit reakci. Pevné vzorky v množství 0,3g byly nanášeny na část membrány o ploše přibližně 50 %. Pro každou zkoušenou látku byla použita tři oplozená vejce. Vybrané látky byly otestovány v několika skupinách se souběžně zkoušenou negativní kontrolou (0,9% NaCl) a pozitivní kontrolou (1% NaOH) pro ověření validity testů. Přehled hodnot vypočteného iritačního skóre a přiřazené klasifikace pro všechny testované vzorky je uveden v *Tabulce 11*.

U vzorků č. 1, 7, 12 a 16 nebyla pozorována žádná reakce chorioalantoidní membrány. Velmi pomalý nástup dilatace cév (po době 135 sekund) byl zaznamenán u látky č. 6 a to pouze u jednoho ze tří testovaných vajec. Všechny tyto látky byly klasifikovány jako nedráždivé pro oko.

Nejrychleji a vždy jako první byly pozorovány vaskulární změny (u testu HET-CAM jsou to dilatace cév nebo jejich vasokonstrikce). Tyto léze jsou považovány za nejmírnější a jejich bodové hodnocení pro výpočet iritačního skóre je nejnižší. U několika vzorků (č. 8, 13, 17, 18, 20, 21, 24, 25 a 28) byla pozorována pouze tato reakce, kdy docházelo k postupně různě rychlé dilataci cév, bez nástupu hemoragie a koagulace. Vypočtené hodnoty IS byly relativně nízké (1,3 – 5).

Nejčastěji byla pozorována kombinace dvou lézí, a to dilatace cév postupně přecházející k porušení jejich celistvosti a krvácení. Časový odstup mezi nástupem obou lézí byl kolem 20 sekund. Tyto změny byly zaznamenány u třetiny testovaných látek (č. 2, 3, 5, 9, 10, 15, 23, 26, 29 a 30). Jejich výsledné iritační skóre bylo 6,7 – 11,3.

U vzorků č. 4, 11, 14, 19, 22 a 27 došlo nejen vaskulárním změnám a hemoragii, ale postupně byla zaznamenána koagulace bílkovin v okolí cév. Tyto změny jsou považovány za nejzávažnější. Výsledná iritační skóre u těchto látek byla vyšší než u ostatních vzorků a pohybovala se v rozmezí 11 – 21.

Tabulka 11: Přehled výsledků zkoušky HET-CAM

Vzorek č.	skóre dráždivosti	klasifikace oční dráždivosti	Vzorek č.	skóre dráždivosti	klasifikace oční dráždivosti
1	0	nedráždivý	16	0	nedráždivý
2	9,3	leptavý/silně dráždivý	17	2	mírně dráždivý
3	10,7	leptavý/silně dráždivý	18	5	středně dráždivý
4	21	leptavý/silně dráždivý	19	16	leptavý/silně dráždivý
5	10,7	leptavý/silně dráždivý	20	4,3	mírně dráždivý
6	0,3	nedráždivý	21	5	středně dráždivý
7	0	nedráždivý	22	17,7	leptavý/silně dráždivý
8	5	středně dráždivý	23	8,3	středně dráždivý
9	10,7	leptavý/silně dráždivý	24	3,7	mírně dráždivý
10	10	leptavý/silně dráždivý	25	5	středně dráždivý
11	19	leptavý/silně dráždivý	26	10,7	leptavý/silně dráždivý
12	0	nedráždivý	27	11	leptavý/silně dráždivý
13	1,3	mírně dráždivý	28	2	mírně dráždivý
14	11,3	leptavý/silně dráždivý	29	11,3	leptavý/silně dráždivý
15	6,7	středně dráždivý	30	10,7	leptavý/silně dráždivý

5.2.1.2 Diskuse

Z hlediska praktického provedení v standardních laboratorních podmínkách je test HET-CAM relativně jednoduchý. Příprava biologického modelu oplozených slepičích vajec vyžaduje zvládnutí techniky otevření skořápky nad vzduchovou bublinou, ale následné zvlhčení a odstranění papírové membrány i samotná aplikace testované látky není náročná. Klíčové je správné a co nejobjektivnější hodnocení reakce membrány. Schopnosti identifikovat nástup jednotlivých lézí v časovém průběhu experimentu vyžaduje zkušenost hodnotitele. Velmi užitečné se ukázalo použití záznamového zařízení propojeného se stereomikroskopem. Bylo tak možno retrospektivně detailně vyhodnotit a porovnat nejen membrány v rámci skupiny, ale i použít hodnocení druhou osobou při nejednoznačných nálezech.

Jedním z cílů této práce bylo porovnání výsledků jednotlivých alternativních metod s výsledky *in vivo* zkoušek. U látek, které byly na základě klasické zkoušky na králících klasifikovány jako velmi silně dráždivé (č. 4) a silně dráždivé (č. 10 a 11) došlo ke 100% shodě ve výsledcích klasického testu na králících a metody HET-CAM, protože z vypočteného iritačního skóre pro alternativní test bylo možno všechny klasifikovat jako leptavé /silně dráždivé.

U vzorků s *in vivo* klasifikací „dráždivý pro oko“ byl výsledek tohoto alternativního testu přísnější. U vzorků č. 2, 14, 19, 22 a 27 bylo vypočtené skóre dráždivosti vyšší než 11, proto byly klasifikovány také jako látky leptavé/silně dráždivé. U těchto vzorků byl tedy test

HET-CAM citlivější. Přesnější *in vitro* odpověď byla pozorována u dvou dráždivých látek (č. 8 a 21). IS bylo u obou látek stejné – 5 a látky byly na základě výsledků alternativní metody zařazeny mezi středně dráždivé. I v této skupině látek lze výsledek při porovnání s *in vivo* zařazením považovat za relativně shodný.

Velký rozdíl a variabilita výsledků byla nalezena ve skupině látek, které byly dle výsledků *in vivo* testů klasifikovány jako mírně dráždivé (č. 5, 15, 20, 26, 29 a 30). Shoda byla pouze u vzorku č. 20, kdy podle hodnoty IS (4,3) byla látka označena také jako mírně dráždivá. U ostatních vzorků byla metoda HET-CAM výrazně citlivější. Vzorek č. 15 s hodnotou IS 6,7 byl klasifikován jako středně dráždivý, i když hodnota iritačního skóre byla pouze mírně nad hranicí pro mírně dráždivé látky. Ostatní vzorky měly hodnotu IS 10,7 nebo 11,3 a byly zařazeny mezi látky leptavé/silně dráždivé. U těchto látek je zajímavé porovnání lézí pozorovaných při *in vivo* testech. Všechny vzorky vykazovaly výraznější poškození spojivek oproti rohovkám (č. 15) nebo byla poškozena pouze spojivka (č. 26, 29 a 30) tedy ta část oka, pro kterou je chorioalantoidní membrána modelem. Tento model by měl být pro tyto změny citlivější. Pouze u vzorku č. 5 byly na králících pozorovány mírné změny jak na spojivce, tak i na rohovce. Pokud zahrneme do celkového posouzení citlivosti metody HET-CAM pro skupinu látek mírně dráždivých v *in vivo* testech i detailní výsledky klinického pozorování, lze za jeden z důvodů zvýšené citlivosti alternativní metody považovat vyšší predikci pro látky dráždivé spojivku králíka.

Poslední hodnocenou skupinou jsou látky, které byly na základě klasického testu zařazeny mezi látky nedráždivé oko (č. 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 23, 24, 25 a 28). U těchto látek byla shoda ve výsledku 36 %. IS menší než 1 bylo vypočteno u látek č. 1, 6, 7, 12 a 16. Na základě výsledku HET-CAM testu byly jako mírně dráždivé klasifikovány čtyři vzorky (č. 13, 17, 24 a 28) a jako středně dráždivé tři vzorky (č. 18, 23 a 25). U všech těchto látek byly při *in vivo* expozici pozorovány změny na spojivce, které ale nevedly ke klasifikaci žádným stupněm dráždivosti. Tento výsledek odpovídá hypotéze o citlivosti modelu chorioalantoidní membrány pro látky poškozující spojivku, které je uvedena výše v textu. U vzorků č. 3 a 9 byl největší rozdíl ve výsledcích. Obě látky byly v testech *in vivo* nedráždivé, ale na základě metody HET-CAM by byly klasifikovány jako leptavé/silně dráždivé. V obou případech byly u králíků také pozorovány mírné změny na spojivce a u vzorku č. 9 i na rohovce.

Vyšší podíl falešně pozitivních výsledků testu HET-CAM u látek *in vivo* nedráždivých nebo mírně dráždivých pro oko odpovídá publikovaným výsledkům několika jiných studií. Ve skupině 134 různě dráždivých látek byla nejvyšší shoda pozorována u látek klasifikovaných jako silně dráždivé pro oko. Experiment sledoval vliv rozpustnosti látky

na predikční schopnost alternativního testu. Chorioalantoidní membrána se ukázala jako vhodný model pro nerozpustné látky a látky rozpustné v tucích¹⁰⁹.

Z hlediska praktického použití chorioalantoidní membrány pro identifikaci látek poškozující oko je důležitá co nejnížší falešná negativita výsledků. V těchto případech model není schopen odhalit toxický potenciál. V testované skupině vzorků nebyl tento případ zaznamenán. Všechny dráždivé látky bez ohledu na stupeň dráždivosti měly v testu HET-CAM při provedení dle metodiky popsané v kapitole 4.1.4 pozitivní výsledek. Při použití širšího spektra testovaných vzorků lze falešnou pozitivitu výsledků zaznamenat. Procento této chyby je však u silně dráždivých a leptavých látek nižší než u látek způsobující jen mírné podráždění oka¹⁰⁹. Chorioalantoidní membrána je modelem pro spojivku a také s tím může souviset nízká míra falešné negativity^{110,111}.

5.2.2 Zkouška BCOP

5.2.2.1 Výsledky

Pro testování kapalných vzorků (č. 5, 16-19, 24 a 30) byla použita standardní metodika „uzavřené komory“, kdy 750 µl testované látky bylo aplikováno pipetou dávkovacími otvory v přední komoře přímo na epitelální povrch rohovky. Délka expozice byla 10 minut a pro odstranění vzorků bylo použito pouze EMEM média s a bez fenolové červeně. Po 2hodinové post-inkubační fázi byla měřena hodnota opacity.

Cílem experimentů bylo porovnání výsledků metody BCOP a *in vivo* zkoušky na králících, při které je zvířatům testovaná látka aplikována neředěná. Z tohoto důvodu byla pro zkoušení všech pevných vzorků metodou BCOP použita metodika „otevřené komory“, kdy je pevná látka aplikována neředěná na epitelální povrch rohovky skrze přední otvor komory držáku. Délka expozice byla 4 hodiny. U většiny pevných vzorků (č.1-4, 6-9, 11, 12, 14, 15, 21-23, 25-29) následovalo omytí pomocí EMEM média jako u kapalin. Během expoziční doby došlo u vzorků č. 10, 13 a 20 k přilnutí na povrch rohovky nebo k jejímu mírnému obarvení. Z tohoto důvodu byla pro odstranění látky z rohovky použita modifikace omývací procedury, která byla navržena a ověřena v první části experimentálních prací. V každé skupině testovaných látek byla vždy vložena příslušná negativní (0,9% NaCl) a pozitivní kontrolní látka (100% dimethylformamid pro kapaliny a 20% imidazol pro pevné látky).

Zakalení (opacita) byla měřena u všech testovaných vzorků, negativní kontroly a pozitivní kontrolní látky opacitometrem MC2. Nejvyšší hodnoty opacity (vyšší než 50) byly

naměřeny u vzorků č. 4, 5, 8, 10, 11 a 19. Naopak u látek č. 3, 7, 16, 17 a 26 byly naměřené hodnoty opacity před a po expozici zkoušenou látkou téměř shodné.

Propustnost membrány byla zjišťována u všech 30 vzorků stejným postupem s aplikací 1 ml roztoku fluoresceinu sodného na epitelální stranu rohovky. Pro měření absorbance bylo po 90minutové expozici odebráno médium ze zadní komory. Obsah byl analyzován přístrojem UV/VIS spektrofotometr Genesys při 490 nm. Zvýšené hodnoty permeability ukazující prostup fluresceinu skrz rohovku byly detekovány pouze u několika vzorků (č. 4, 10, 11 a 14). Tyto hodnoty ukazují na porušení celistvosti tkáně rohovky.

Vypočtené hodnoty iritačního skóre a přidělená klasifikace potenciálu vyvolat podráždění očí jsou souhrnně uvedeny v *Tabulce 12*. Jednoznačně negativní výsledek byl zjištěn u šesti vzorků, kdy hodnota IVIS se pohybovala v rozmezí 0,33 – 2,69. Na základě klasifikace dle GHS je možno tyto vzorky označit jako nedráždivé. Naopak klasifikace „silně dráždivý až leptavý pro oko“ byla přiřazena všem testovaným vzorkům, u který byla hodnota iritačního skóre vyšší než 55, což byly vzorky č 4, 10 a 11 s hodnotami IVIS 134,06; 129,2 a 76,84. U těchto vzorků byly naměřeny nejvyšší hodnoty opacity, testovaná látka tedy výrazně snížila průhlednost rohovky. Zakalení rohovek bylo viditelné již po ukončení expozice a jejich omytí.

V žádném z experimentů nedošlo k obarvení rohovek testovanými látkami ani nebyla patrná rezidua na povrchu epitelu, která by ukazovala na falešně pozitivní výsledek zkoušky.

Tabulka 12: Přehled výsledků zkoušky BCOP

Vzorek č.	IVIS	klasifikace oční dráždivosti	Vzorek č.	IVIS	klasifikace oční dráždivosti
1	2,69	nedráždivý	16	0,59	nedráždivý
2	3,77	nelze hodnotit	17	0,67	nedráždivý
3	1,33	nedráždivý	18	2	nedráždivý
4	134,06	silně dráždivý až leptavý	19	49	nelze hodnotit
5	33	nelze hodnotit	20	19,82	nelze hodnotit
6	2,36	nedráždivý	21	12,69	nelze hodnotit
7	0,33	nedráždivý	22	19,33	nelze hodnotit
8	42,94	nelze hodnotit	23	2,38	nedráždivý
9	4,34	nelze hodnotit	24	2,7	nedráždivý
10	129,2	silně dráždivý až leptavý	25	2,09	nedráždivý
11	76,84	silně dráždivý až leptavý	26	11,7	nedráždivý
12	0,33	nedráždivý	27	32,38	nelze hodnotit
13	2,34	nedráždivý	28	8,67	nedráždivý
14	39,48	nelze hodnotit	29	11,09	nelze hodnotit
15	36,33	nelze hodnotit	30	41,48	nelze hodnotit

5.2.2.2 Diskuse

V laboratorních podmínkách je metoda BCOP relativně jednoduchá. Náročnější je zvládnutí techniky vypreparování rohovky z hovězích očí a jejich umístění do speciálních držáků. Pro vytvoření požadovaného funkčního modelu oka je důležité dokonale utěsnit středovou část, aby nedocházelo kolem rohovky k průniku médií mezi přední a zadní komorou. Při dodržení této podmínky není následná expozice, omývání i měření průhlednosti a prostupnosti obtížná.

Při porovnání výsledků zkoušky s hovězími rohovkami s výsledky *in vivo* testů byla nalezena 100% shoda u látek velmi silně dráždivých oko (č.4) a silně dráždivých oko (č. 10 a 11). Pouze u těchto látek byla průměrná hodnota IVIS vyšší než 55 a látky byly na základě testu BCOP klasifikovány jako silně poškozující oko až leptavé.

Téměř 100% přesnost byla pozorována také u látek *in vivo* nedráždivých. Ze čtrnácti nedráždivých látek byl negativní výsledek v BCOP zkoušce zaznamenán u třinácti (č. 1, 3, 6, 7, 12, 13, 16-18, 23-25 a 28). U vzorku č. 9 byla hodnota IVIS pouze mírně nad limitem pro látky nedráždivé.

Zkouška BCOP není dostatečně citlivá pro látky s nižším potenciálem způsobit podráždění očí. Při hodnotách iritačního skóre nad 3 a pod 55 nelze výsledek použít pro odhad dráždivého potenciálu zkoušené látky. Legislativa pro chemické látky v těchto případech předepisuje pokračovat v testování za použití jiných alternativních metod nebo metodu *in vivo* na králících.

Z experimentu vyplývá, že test BCOP je dostatečně citlivý pro odhalení látek nedráždivých oko a látek silněji poškozujících oko. U těchto látek nebyl zaznamenán falešně negativní výsledek. Pro ostatní látky není dostatečně citlivý, což ukazují i vypočtené hodnoty IVIS. Iritační skóre u látek *in vivo* mírně dráždivých oko se pohybovalo v rozmezí 11,09 – 41,48. U dráždivých látek byla variabilita iritačního skóre větší (3,77 – 49). Dobrá predikční schopnost metody BCOP byla publikována ve studiích s velmi početnými skupinami vzorků. Shoda s *in vivo* výsledky testů u dráždivých chemických látek dosahovala 73-77 %^{112,113}.

5.2.3 Zkouška RhCE

5.2.3.1 Výsledky

V laboratorních podmínkách je provedení testu RhCE s modelem EpiOcular™ výrazně složitější než oba výše uvedené alternativní testy. Práce s buněčným modelem je náročná na udržení přesně definovaných podmínek, časového plánu zkoušky i techniku manipulace s křehkou 3D strukturou. Metodika obsahuje mnoho jednotlivých kroků odlišných pro kapalně a pevné vzorky. U látek je nutno sledovat, zda vzorek přímo neredukuje použité barvivo MTT nebo zda barevnost vzorku nemůže ovlivnit výsledné spektrofotometrické hodnocení životaschopnosti tkáně.

Chemické látky (*Tabulka 7*) byly ve zkoušce s použitím modelu EpiOcular™ testovány vždy ve dvou nezávislých experimentech. U všech vzorků byl použit postup s preinkubací tkání přes noc. Kapaliny (50 μ l) byly aplikovány pipetou přímo na tkáň. Pevné látky (50 mg) byly přenášeny lžičkou a opatrně rozprostírány na celý povrch modelu. Při aplikaci testovaných látek bylo u vzorku č. 17 nutno použít fixační síťku, která zajistila rovnoměrné pokrytí celých tkání. Délka expozice byla u kapalin a pevných vzorků rozdílná, tak jak je uvedeno v metodice v kapitole 4.1.3. Jako problematické se ukázalo testování některých pevných látek (č. 10, 12, 13, 20 a 26), které se při expozici přichytily na povrch modelu a nebylo možno je kompletně odstranit. Po postinkubační fázi bylo provedeno barvení MTT po dobu 3 hodin a následná extrakce isopropanolem. Absorbance extraktů na 96jamkové desce se měřila spektrofotometrem Epoch při 570 nm. Výsledky byly porovnány s hodnotami příslušné negativní kontrolní látky (sterilní deionizovaná voda) a bylo vypočteno průměrné procento životaschopnosti tkání po expozici testovanými látkami. Výsledné hodnoty i odpovídající hodnocení potenciálu dráždit oko jsou uvedeny v *Tabulce 13*. Ve vybrané skupině vzorků nebylo nutno provést žádnou korekci výsledků z důvodů barevnosti nebo schopnosti přímo redukovat barvivo MTT. Validita všech experimentů byla ověřena použitím pozitivní kontrolní látky (metylacetát) dodávané výrobcem modelu firmou MatTek.

Pouze u čtyřech vzorků (č. 1, 9, 16 a 17) byla životaschopnost tkání vyšší než 60% hodnoty kontrolních tkání. Tyto látky není nutno klasifikovat žádným stupněm dráždivosti pro oko. Ostatních 26 vzorků mělo životaschopnost tkání pod touto hodnotou a lze je na základě výsledků testu RhCE považovat za dráždivé. U poloviny vzorků byla životaschopnost nižší než 10% (č. 2-4, 7, 8, 11-14, 20, 24-28) a u ostatních látek byla v rozmezí 11,7 – 55,6.

Tabulka 13: Přehled výsledků zkoušky RhCE

Vzorek č.	procento životnosti	hodnocení oční dráždivosti	Vzorek č.	procento životnosti	hodnocení oční dráždivosti
1	91,1±11,67	nedráždivý	16	69,8±3,04	nedráždivý
2	0,9±0,99	dráždivý	17	90,5±4,6	nedráždivý
3	1,6±0,21	dráždivý	18	33,3±4,03	dráždivý
4	0,6±0,21	dráždivý	19	11,7±0,85	dráždivý
5	55,6±4,24	dráždivý	20	0,9±0,28	dráždivý
6	53,7±1,77	dráždivý	21	31,8±1,48	dráždivý
7	2±0,64	dráždivý	22	14,6±1,06	dráždivý
8	6,2±2,83	dráždivý	23	32,1±2,62	dráždivý
9	89,5±6,51	nedráždivý	24	0,8±0,49	dráždivý
10	30,2±7,42	dráždivý	25	2,1±0,64	dráždivý
11	0,8±0,57	dráždivý	26	0,6±0,71	dráždivý
12	1,1±0,57	dráždivý	27	2,2±0,71	dráždivý
13	1,5±0,57	dráždivý	28	8,2±0,78	dráždivý
14	2±0,92	dráždivý	29	32,2±4,38	dráždivý
15	43,4±2,47	dráždivý	30	22,6±0,07	dráždivý

5.2.3.2 Diskuse

Práce potvrdila, že metoda využívající rekonstruovanou lidskou rohovku je výrazně citlivější oproti jiným alternativním metodám i původnímu *in vivo* testu. U nedráždivých látek byla shoda zaznamenána pouze v 29 %. U deseti vzorků byl zaznamenán falešně pozitivní výsledek. Všechny *in vivo* látky dráždivé byly ve zkoušce RhCE pozitivní a na základě GHS by byly klasifikovány jako dráždivé pro oko. Na základě zjištěných hodnot životaschopnosti tkání není možno v současné době přiřadit testovaným chemickým látkám žádný kvalitativní stupeň dráždivosti nebo zařadit látky mezi leptavé pro oko.

5.3 Porovnání výsledků *in vivo* a *in vitro* zkoušek

Vývoj nových *in vitro* nebo *ex vivo* metod je zaměřen především na modely pro lidskou rohovku, která je nejvíce exponovanou tkání oka a přichází do přímého styku s okolním prostředím. Tyto alternativní zkoušky poskytují pouze dílčí informace vzhledem k typu použitého biologického modelu. Probíhající vývoj každé metody vedl k dobré reprodukovatelnosti výsledků, ale bez porovnání s velkým množstvím hodnot z *in vivo* zkoušek není možno přesně stanovit jejich predikční schopnost⁹⁷. Řešením se ukazuje použití kombinace dvou až tří alternativních *in vitro* nebo *ex vivo* zkoušek, která by mohla vést k úplnému nahrazení *in vivo* testování oční dráždivosti při zachování stejné nebo i vyšší vypovídající hodnotě testování⁷⁴. Vzhledem k tendenci podceňovat dráždivý potenciál látek

působících výrazněji na duhovku nebo spojivku¹⁴ měl by být tento specifický účinek zohledněn také při vývoji těchto strategií.

Výsledky testování oční dráždivosti pomocí alternativních metod na skupině 30 látek potvrzují předpokládaný rozdíl v citlivosti vybraných *in vitro* modelů. Porovnáním s klasickým testem na králích se jako nejbližší ukazuje test HET-CAM, který má vysokou predikční schopnost u látek silně dráždivých a relativně dobrou vypovídající hodnotu u látek mírně dráždivých a nedráždivých. Tento test však není doposud dostatečně validován, proto není zařazen mezi metody doporučené OECD. Test BCOP, který je založen na použití izolované hovězí rohovky jako biologického modelu, je velmi vhodný pro identifikaci silně dráždivých a nedráždivých látek. Z tohoto důvodu je OECD metodika zaměřena pouze na identifikaci těchto látek. Pro látky s mírným a středním potenciálem způsobit podráždění oka je nepřesný a dle strategie testování oční dráždivosti Nařízení REACH je druhým krokem po testu BCOP zkouška RhCE s 3D tkáňovým modelem rohovky. Na vybranou skupinu chemických látek (*Tabulka 7*) byl experimentálně použit model EpiOcular, který se ukázal jako extrémně citlivý. Podle výsledků této metody bylo klasifikováno 26 látek jako dráždivých a pouze 4 jako nedráždivé oko.

Porovnání citlivosti jednotlivých alternativních metod je problematické, protože jejich klasifikační stupnice jsou velmi rozdílné. Zkouška HET-CAM z dosaženého IS rozlišuje 4 stupně dráždivosti (*Tabulka 5*) a umožňuje klasifikaci látek i podle míry podráždění oka, které mohou testované látky způsobit. Alternativní test BCOP využívající hovězí rohovku klasifikuje pouze látky silně dráždivé až leptavé pro oko a látky nedráždivé. Velká skupina látek je zařazena do kategorie „nelze hodnotit“. Při použití této klasifikační stupnice je srovnání výsledků látek vyvolávající mírné až střední podráždění oka v *in vivo* podmínkách obtížné. Velmi přísnou klasifikaci má test RhCE, který látky rozděluje pouze na nedráždivé a dráždivé. Vzhledem k velké citlivosti tohoto testu jsou mezi látky klasifikované jako dráždivé zařazeny nejen látky s různým potenciálem dráždit oko, ale také část látek *in vivo* nedráždivých. Extrémní citlivost byla potvrzena i v experimentech této práce. Nejednotnost v hloubce rozlišení míry dráždivosti znesnadňuje porovnání výsledků jednotlivých alternativních metod mezi sebou. Pokud rozdělíme výsledky pouze na pozitivní (dráždivost bez ohledu na stupeň) a negativní (nedráždivé) lze částečně posoudit citlivost biologických modelů vůči *in vivo* testu na králících. Toto rozdělení je vyznačeno v *Tabulce 14* šedou barvou pozitivních polí. U testu HET-CAM je pak shoda 70 % a u testu RhCE je to 66,7 %. Zařazením sporných výsledků testu BCOP („nelze hodnotit“), mezi výsledky pozitivní, dojde k navýšení shody z 46,7 % na 93 %.

Pokud test BCOP použijeme jako první krok testovací strategie, dojde k identifikaci látek silně dráždivých a nedráždivých. Pro testování potenciálu dráždit oko ostatních látek je dle strategie testování REACH doporučeno použití druhé *in vitro* metody. Pro posouzení citlivosti metod RhCE a HET-CAM pro skupinu 13 látek, které nelze na základě testu BCOP hodnotit (č. 2, 5, 8, 9, 14, 15, 19-22, 27, 29 a 30), bylo provedeno porovnání výsledků této podskupiny s výsledky testu na králících. Shoda výsledků této podskupiny s *in vivo* výsledkem byla 100 % u RhCE a 92 % u HET-CAM. Ani v jednom případě nedošlo k falešně negativnímu zařazení dráždivé látky mezi nedráždivé. Tyto výsledky potvrzují, že i když obě metody poskytují informace o poškození jiného typu oční tkáně je jejich celková citlivost srovnatelná⁷². Z tohoto důvodu je také test RhCE zařazen do strategie postupného testování oční dráždivosti. Oproti metodě HET-CAM se jedná o metodu validovanou a zařazenou mezi OECD doporučované metody.

Tabulka 14: Souhrn výsledků *in vivo* a *in vitro* zkoušek

Vzorek č.	<i>in vivo</i>	HET-CAM	BCOP	EpiOcular™
1	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	nedráždivý
2	dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
3	nedráždí	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
4	velmi silně dráždí	leptavý/silně dráždivý	silně dráždivý	dráždivý
5	mírně dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
6	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	dráždivý
7	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	dráždivý
8	dráždí	středně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
9	nedráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	nedráždivý
10	silně dráždí	leptavý/silně dráždivý	silně dráždivý	dráždivý
11	silně dráždí	leptavý/silně dráždivý	silně dráždivý	dráždivý
12	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	dráždivý
13	nedráždí	mírně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
14	dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
15	mírně dráždí	středně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
16	nedráždí	nedráždivý	nedráždivý	nedráždivý
17	nedráždí	mírně dráždivý	nedráždivý	nedráždivý
18	nedráždí	středně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
19	dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
20	mírně dráždí	mírně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
21	dráždí	středně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
22	dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
23	nedráždí	středně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
24	nedráždí	mírně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
25	nedráždí	středně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
26	mírně dráždí	leptavý/silně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
27	dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
28	nedráždí	mírně dráždivý	nedráždivý	dráždivý
29	mírně dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý
30	mírně dráždí	leptavý/silně dráždivý	nelze hodnotit	dráždivý

Publikované výsledky studií porovnávající citlivost alternativních metod nejsou jednoznačné. Jejich predikční schopnost je závislá nejen na dráždivém potenciálu látek, ale také na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech jako je rozpustnost, polarita nebo těkavost. Strategie testování pomocí dvou *in vitro* metod by se mohla lišit dle typu testované látky. U rozpustných látek může být vhodné kombinovat testy na buněčných liniích (STE test) a BCOP. Naopak pro nerozpustné látky má vyšší predikční schopnost kombinace modelů EpiOcular™ a hovězí rohovky¹¹⁵. Tato kombinace se ukázala jako vhodnější i pro těkavé látky. Pro zkoušení alkoholů a ketonů není zařazení testu BCOP vhodné z důvodu vysokého počtu falešně pozitivních výsledků u tohoto typu chemických látek.

6 ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byla v rámci této disertační práce studována problematika použití alternativních biologických modelů pro testování oční dráždivosti. V první části experimentální práce byla navržena a odzkoušena modifikace testu BCOP, který jako testovací model používá hovězí rohovky. Tento alternativní test je považován za vhodnou alternativu testování oční leptavosti a dráždivosti, i když ho nelze použít na všechny typy chemických látek a směsí. Tato omezení jsou uvedena nejen v literatuře, ale především v metodice OECD č. 437. Experimentální práce byla zaměřena na řešení problému vysokého počtu falešně pozitivních výsledků při testování silně viskózních a barevných látek dle klasického postupu. Pro tyto látky byly navrženy a validovány dvě modifikace postupu oplachování s cílem zvýšení jeho účinnosti.

Viskózní látky mají tendenci ulpívat na povrchu rohovky a tím zmenšovat světelnou propustnost. Podobný efekt byl pozorován u látek barevných. Výsledná úprava systému omývání je založena na kombinaci jemného mechanického odstranění a rozšíření oplachování exponovaných rohovek o použití nepolárního olivového oleje. Modifikace se ukázala jako velmi účinná při odstraňování adhezivních vzorků a potenciálně by mohla rozšířit oblast aplikace testu BCOP. Použití úpravy omývacího procesu je jednoduché, levné a nevyžaduje žádné speciální vybavení a podstatně nezvyšuje časovou náročnost. V současné době je tato modifikace již zavedena do systému SLP a standardně používána při testování oční dráždivosti.

Druhá část experimentální práce byla zaměřena na porovnání citlivosti tří vybraných alternativních metod vůči klasickému *in vivo* testu na králících. Byly zvoleny zkoušky BCOP, RhCE a HET-CAM, které využívají zcela odlišné biologické modely. Zkouška RhCE založená na 3D modelu z lidských keratinocytů, který je strukturálně podobný povrchové části rohovky, se ukázala jako vysoce citlivá bez možnosti rozlišení stupně dráždivosti chemických látek. Test HET-CAM používá vysoce prokrvenou chorioalantoidní membránu oplozených slepičích vajec. U této metody se předpokládal vysoký potenciál v oblasti identifikace mírně dráždivých látek, což bylo experimentálně potvrzeno. Zkouška BCOP využívající izolované hovězí rohovky má v porovnání s *in vivo* testem na králících dobrou predikční schopnost pro silně dráždivé a leptavé látky a také pro látky nedráždivé. Látky s potenciálem způsobit mírně nebo střední podráždění oka nelze tímto testem identifikovat.

Pro chemické látky je používána dvojice alternativních testů BCOP a RhCE. Kombinace dvou modelů pro lidskou rohovku nemůže pokrývat všechny mechanismy účinků

a tím úplně nahradit testování oční dráždivosti na zvířatech. Zařazení metody HET-CAM do strategie testování oční dráždivosti s testem BCOP se tak jeví jako možná varianta ke stávající legislativou doporučené testovací strategii. Tato zkouška by byla schopna identifikovat látky s potenciálem způsobit mírné nebo střední podráždění oka a klasifikovat je. Jeho úspěšná validace a eventuální změna způsobu hodnocení lézí by mohla vést k legislativnímu zapracování tohoto testu do skupiny zkoušek pro klasifikaci oční dráždivosti a následnému zařazení do testovací strategie. Jako samostatný test má HET-CAM velký potenciál v oblasti mírně dráždivých látek jako jsou například kosmetické produkty.

Výsledky práce potvrdily, že pouze kombinace různě citlivých *in vitro* testů využívající různé biologické modely, může úplně nahradit klasický *in vivo* test oční dráždivosti na zvířatech.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Wilhelmus, K. R.; *Surv. Ophthalmol.* **2001**, *45*, 493-515.
- [2] Stephens M. L.; Mak N. S.; v knize *Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing* (Allen D., Walters M., ed.), str 1, RSC, Publishing, Cambridge 2013.
- [3] Wilson, S.L.; Aherne, M.; Hopkinson, A. *Toxicology* **2015**, *327*, 32-46.
- [4] Draize, J.H.; Woodward, G.; Clavery, H.O. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, *82*, 377-390.
- [5] Russell, W.M.S. *ALTA* **1995**, *23*, 298-304.
- [6] Sonali, K.D.; Shashikant, C.D. *Saudi Pharm. J.* **2015**, *23*, 223-229.
- [7] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH).
- [8] Plodíková, P.; Pouzar, M.; Rösslerová, Z.; Prokopcová, J. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 1385-91.
- [9] <http://www.ocnivady.cz/anatomie-lidskeho-oka> (5. 2. 2020).
- [10] <http://fbll.cz/skripta/xiii-smysly/1-zrakovy-system/> (5. 2. 2020).
- [11] *Head and Neck, Eye Conjunctiva Anatomy*; Shumway, C.L.; Motlagh, M.; Wade, M. [Updated 2019 Jun 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519502/>
- [12] Barar, J.; Asadi, M.; Mortazavi-Tabatabaet S.A.; Omid, Y. *J. Ophthalmic .Vis. Res.* 2009, *4*, 238-252.
- [13] Curren, R.D.; Harbell, J.W. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106(Suppl 2)*, 485-492.
- [14] OECD (2017): Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>
- [15] 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).
- [16] Earl, L.K.; Dickens, A.D.; Rowson, M.J. *Toxicol. in Vitro* **1997**, *11*, 295-304.

- [17] Adriaens, E. et al. *Arch. Toxicol.* **2010**, 88, 701–723.
- [18] Freeberg, F.; Nixon, G.; Reer P.; Weaver, J.; Bruce, R.; Griffith, J.; Sanders III, L. W. *Appl. Toxicol.* **1986**, 626, 7.
- [19] EC. (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official Journal of the European Communities, L66, 26-35.
- [20] Maurer, J.K.; Parker, R.D.; Jester, J.V. *Reg. Tox. Pharmacol.* **2002**, 36, 106-117.
- [21] Reader, S.J., Blackwell, V., O’Hara, R., Clothier, R.H., Griffin, G., Balls, M. *Toxicol. In Vitro* **1990**, 4, 264-266.
- [22] Babich, H.; Borenfreund, E. *ATLA* **1990**, 18, 129-144.
- [23] Adriaens, E. et al. *Arch. Toxicol.* **2010**, 88, 701–723.
- [24] OECD (2017): Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>
- [25] Cottin, M.; Zanvit, A. *Toxicol In Vitro.* **1997**; 11, 399-405.
- [26] Huhtala, A.; et al: v knize: *Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices.* str.17, Ashammakhi N., 2008.
- [27] Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Ball, M. *Food. Chem. Toxicol.* **1986**, 24, 469-471.
- [28] Van Goethem, F.; Adriaens, E.; Alepee, N.; Straube, F.; De Wever, B.; Cappadoro, M.; Catoire, S.; Hansen, E.; Wolf, A.; Vanparrys, P. *Toxicol. In Vitro* **2006**, 20, 1-17.
- [29] *Cosmetic Formulation: Principles and Practice*; Benson, H.A.E.; Roberts, M.S.; Leite-Silva, V.R.; Walters, K.; CRC Press, Boca Raton, 2019.
- [30] Hayashi, K.; Mori, T.; Abo, T., et al. *J. Toxicol. Sci.* **2012**, 37, 269-280.
- [31] Takahashi, Y.; Hayashi, K.; Abo, T.; Koike, M.; Sakaguchi, H.; Nishiyama, N. *Toxicol. In Vitro*, **2011**, 25, 1425-1434.
- [32] Lee, M.; Hwang, J-H.; Lim, M.K. *Toxicol. Res.* **2017**, 33, 191-203.
- [33] Rienzi, G. The Johns Hopkins University Gazette 2006, 36/9. Online: <https://pages.jh.edu/~gazette/2006/30oct06/30caat.html>
- [34] <http://www.mattek.com> (20.12.2019).
- [35] Gopakumar, V.; Chatterjee, N.; Parameswaran, S.; Nirmala, S.; Krishnakumar, S. *Cytotherapy* **2016**, 18, 673–685.

- [36] <https://www.mattek.com/products/epiocular/> (6.3.2020)
- [37] OECD (2019): Guidelines for the Testing of Chemicals 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 Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>
- [38] Davila, J. C.; Rodriguez, R. J.; Melchert, R. B.; Acosta Jr., S. L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 63-96.
- [39] Mc Laughlin, C. R.; Tsai, R. J. F.; Latorre, M. A.; Griffith, M. *Front Biosci.* **2009**, *14*, 3326-3337. (2009).
- [40] Wilson, S. E.; Liu, J. J.; Mohan, R. R. *Prog. Retinal Eye Res.* **1999**, *18*, 293-309.
- [41] Wilson, S. L.; Yang, Y.; El Haj, A. J. *Tissue Eng. Part A* **2004**, *20*, 225-238.
- [42] Takahashi, Y.; Koike, M.; Honda, H.; Ito, Y.; Sakaguchi, H.; Suzuki, H.; Nishiyama, N. *Toxicol. In Vitro* **2008**, *22*, 760-770.
- [43] Barile, F. A. *Pharm. Toxicol. Methods* **1986**, *61*, 136-142.
- [44] Stern, M.; Klausner, M.; Alvarado, R.; Renskers, K.; Dickens, M. *Toxicol. In Vitro* **1998**, *12*, 455-461.
- [45] Meloni, M.; De Servi, B.; Marasco, D.; Del Prete, S. *Mol. Vision*, 2011, *17*, 113-126.
- [46] Engelke, M.; Zorn-Krupa, M.; Gabel, D.; Reisinger, K.; Rusche, B.; Mewes, K.R. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 458-468.
- [47] Matsuda, S.; Hisama, M.; Shibayama, H.; Itou, N.; Iwaki, M. *Yakugaku Zasshi.* **2009**, *129*, 1113-1120.
- [48] Matsuda, S.; Hisama, M.; Shibayama, H.; Itou, N.; Iwaki, M. *J. Oleo Sci.* **2009**, *58*, 437-442.
- [49] Prinsen, M. K.; *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 291-296.
- [50] Burton, A.B.G.; York, M.; Lawrence, R.S. *Food Cosmet. Toxicol.* **1981**, *19*, 471-475, 477-480.
- [51] OECD (2018): Guidelines for the Testing of Chemicals 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. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>

- [52] OECD (2017): Guidelines for the Testing of Chemicals 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. OECD Publishing, Paris.
<https://www.oecd-ilibrary.org/>
- [53] Jester, J. V.; Li, L.; Molai, A.; Maurer, J. K. *Toxicol. In Vitro* **2001**, *15*, 115-130.
- [54] Prinsen, M. K. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 78-81.
- [55] Van den Berghe C.; Guillet, M.; Compan, D. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19*, 823-830.
- [56] Lynch, A. P.; Ahearne, M. *Exp. Eye Res.* **2003**, *108*, 42-47.
- [57] Donahue, D.A.; Avalos, J.; Kaufman, L.E.; Simion, F.A.; Cerven, D.R. *Toxicol. In Vitro*, **2011**, *25*, 708-714.
- [58] Luepke N. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 287–291.
- [59] Reichl, S.; Bednarz, J.; Muller-Goymann, C. C. *Br. J. Ophthalmol.* **2004**, *88*, 560-565.
- [60] Reichl, S.; Muller-Goymann, C. C. *Int. J. Pharm.* **2003**, *250*, 191-201.
- [61] Guo, X.; Yang, X. F.; Yang, Y.; Hans, R.; Cai, J. H.; Xue, J. Y.; Tan, X. H.; Xie, X. P.; Xiong, X. K.; Huang, J. M. *Biomed. Environ. Sci.* **2012**, *25*, 359-366.
- [62] Curren, R. D.; Harbell, J. W. *Altern. Lab. Anim.* **2002**, *30*, 69-74.
- [63] Prinsen, M.K.; Hendriksen, C.F.M.; Krul, C.A.M.; Woutersen, R.A. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *85*, 132-149.
- [64] Luepke, N.; Kemper, F. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 495-496.
- [65] Speelman, H.; v knize *In Vitro Testing Protocols, Methods in Molecular Biology*, (O'Hare, S., Atterwill, C.K, ed.), Vol. 43, Humana Press., Totowa, NJ, 1995.
- [66] Lagarto, A.; Vega, R.; Guerra, I.; González, R. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 699-702.
- [67] NICEATM, 2006. In: D.o.H.a.H. Services (Ed.), *Current Status of in Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test– Chorioallantoic Membrane Test Method*. ICCVAM Publication, NIEHS Publication, North Carolina.
- [68] Vinardell, M.; Mitjans, M. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 46-59.

- [69] Rougier, A.; Cottin, M.; DeSilva, O.; Roguet, R.; Catroux, P.; Tougic, A.; Dossou, K. *Lens and Eye Toxic. Res.* **1992**, *9*, 229-245.
- [70] Spielmann, H.: v knize: *In vitro methods in pharmaceutical research* (Castell, Gomez-Lechon ed.), str. 265, Academic Press, London 1997.
- [71] Steiling, W. *INVITTOX Protocol*, 96, 1994.
- [72] McNamee, P.; Hibatallah, J.; Costabel-Farkas, M.; Goebel, C.; Araki, D.; Dufour, E.; Hewitt, N.J.; Jones, P.; Kirst, A.; Le Varlet, B.; Macfarlane, M.; Marrec-Fairley, M.; Rowland, J.; Schellauf, F.; Scheel, J. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *54*, 197-209.
- [73] Hagino, S.; Kinoshita, S.; Tani, N.; Nakamura, T.; Ono, N.; Konishi, K.; Imura, H.; Kojima, H.; Ohno, Y. *Toxicol. In Vitro*; **1999**, *13*, 99-113.
- [74] Balls, M. et al. *ATLA*, **1999**, *27*, 53-77.
- [75] Vinardell, M.P.; Mitjans, M. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1066-1070.
- [76] Gilleron, L.; Coecke, S.; Sysmans, M.; Hansen, E.; van Oproy, S.; Marzin, D.; van Cauteren, H.; Vanparys, P. *Toxicol. In Vitro*, **1997**, *11*, 641-644.
- [77] Gilleron, L.; Coecke, S.; Sysmans, M.; Hansen, E.; van Oproy, S.; Marzin, D.; van Cauteren, H.; Vanparys, P. *Toxicol. In Vitro* **1996**, *10*, 431-446.
- [78] Bagley, D.M.; Rizvi, P.Y.; Kong, B.M.; de Salva, S.J. *Evaluation of the Vascular Components of the Chorioallantoic Membrane Assay as a Model for Eye Irritation Potential: II*, Colgate-Palmolive Piscataway, USA, 1991.
- [79] Donahue, D.A.; Kaufman, L.E.; Avalos, J.; Simion, F.A.; Cerven, D.R. *Toxikol. In Vitro* **2011**, *25*, 563-572.
- [80] Valdez, T.I.; Kreuzer, D.; Moussy, F. J. *Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 273-82.
- [81] Rous, P.; Murphy, J.B. *J. Am. Med. Assoc.* **1911**, *56*, 741-741.
- [82] Deryugina, E.I.; Quigley, J.P. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 1119-1130.
- [83] Lokman, N.A.; Elder, A.S.F.; Ricciardelli, C.; Oehler, M.K. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9959-9970.
- [84] Yalcin, M.; Bharali, D.J.; Lansing, L.; Dyskin, E.; Mousa, S.S.; Hercbergs, A.; Davis, F.B.; Davis P.J.; Mousa, S.A. *Anticancer. Res.* **2009**, *29*, 3825-3831.
- [85] Lange, N.; Ballini, J.P.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci* **2001**, *42*, 38-46.
- [86] Ausprunk, D.H.; Knighton, D.R.; Folkman, J. *Am J. Pathol.* **1975**, *79*, 597-618.
- [87] Chiba, A.; Yui, C.; Hirano, S. *Arch. Histol. Cytol.* **2010**, *73*, 45-53.

- [88] Bertossi, M.; Virgintino, D.; Coltey, P.; Errede, M.; Mancini, L.; Roncali, L. *Angiogenesis* **1999**, *3*, 305-315.
- [89] Ribatti, D.; Vacca, A.; Roncali, L.; Dammacco, F. *Int. J. Dev. Biol.* **1996**, *40*, 1189-1197.
- [90] Nowak-Sliwinska, P.; Segura T.; Iruela-Arispe M.L. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 779-804.
- [91] Rees, C.J.; Allen, J.; Postma, G.N.; Belafsky P.C.; *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2010**, *119*, 50-53.
- [92] Debefve E.; Pegaz, B.; van den Bergh, H.; Wagnieres, G.; Lange, N.; Ballini, J.P. *Angiogenesis* **2008**, *11*, 235-243.
- [93] Weiss,A.; van Beijnum, J.R.; Bonvin, D.; Jichlinski, P.; Dyson, P.J.; Griffioen, A.W.; Nowak-Sliwinska, P. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 480-491.
- [94] Giannopoulou, E.; Katsoris, P.; Partymou, A.; Kardamakis, D.; Papadimitrou, E. *Anticancer. Res.* **2002**, *22*, 2821-2826.
- [95] Giannopoulou, E.; Katsoris, P.; Hatziapostolou, M.; Kardamakis, D.; Kotsaki, E.; Polytarchou, C.; Partymou, A.; Papaioannou, S.; Papadimitrou, E. *Int. J. Cancer.* **2001**, *94*, 690-698.
- [96] Rupenthal, I.D.; Green, C.R.; Alany, R.G. *Int. J. Pharmacol.* **2011**, *411*, 78-85.
- [97] Scott, L. et al. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1-9.
- [98] Anon. *Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Draize Eye Irritation Test*, DOC. XI/632/91 - V/E/1/131/91, CEC, Brusel. Commission of the European Communities (CEC), 1991.
- [99] Grindon, C.; Combes, R.; Cronin, M.T.D.; Roberts, D.W.; Garrod, J.F. *ATLA* **2008**, *36*, 81-92.
- [100] Nařízení komise (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.
- [101] https://www.prc.cnrs.fr/reach/cs/toxicological_data2.html (18.5.2020).
- [102] <https://echa.europa.eu/cs/information-on-chemicals/registered-substances> (8. 6. 2020)
- [103] Method B.47 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, Adopted 14th February 2017

- [104] Verstraelen, S.; Jacobs, A.; Wever, B.; Vanparys, P. *Toxicol. In Vitro*, **2013**, *27*, 1298-1311.
- [105] <https://www.clinisciences.com/it/read/cell-studies-1124/cell-growth-determination-kit-1881.html> (20.6.2020)
- [106] EpiOcular™ EIT SOP, Version 9. (2015). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/cm_img_doc/protocol/prot01569/annexes/EpiOcular_SOP_Version_9_May2015.pdf
- [107] Kubincová, P.; Täublová, E. SOP č. M/92/2. Interní dokument VUOS (2017).
- [108] ICCVAM – Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET – CAM) test Method. Published 2010. (<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>).
- [109] Schrage, A.; Gamer, A. O.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. *ATLA* **2010**, *38*, 39–52.
- [110] Gettings, S.D.; Dipasquale, L.C.; Bagley, D.M.; Casterton, P.L.; Chudkowski, M.; Curren, R.D.; Demetrulias, J. L.; Feder, P.I.; Galli, C.L.; Gay, R.; Glaza, S.M.; Hintze, K.L.; Janus, J.; Kurtz, P.J.; Lordo, R.A.; Marenus, K.D.; Moral, J.; Muscatiello, M.; Pape, W.J.W.; Renskers, K.J.; Roddy, M.T.; Rozen, G. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 943-976.
- [111] Gettings, S.D.; Lordo, R.A.; Hintze, K.L.; Bagley, D.M.; Casterton, P.L.; Chudkowski, M.; Curren, R.D.; Demetrulias, J.L.; Dipasquale, I.C.; Earl, L.K.; Feder, P.I.; Galli, C.L.; Glaza, S.M.; Gordon, V.C.; Janus, J.; Kurtz, P.J.; Marenus, K.D.; Moral, J.; Pape, W.J.W.; Renskers, K.J.; Rheins, L.A.; Roddy, M.T.; Rozen, M.G.; Tedeschi, J.P.; Zyracki, J. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 79-117.
- [112] Schrage, A.; Kolle, S.N.; Moreno, M.C.R.; Norman, K.; Raabe, H.; Curren, R.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R.; Gamer, A. O. *ATLA* **2011**, *39*, 37–53.
- [113] Gautheron, P.; Dukic, M.; Alix, D.; Sina, J.F. *Fundam. Appl. Toxikol.* **1992**, *18*, 442-449.
- [114] Casterton P. L.; Potts L. F.; Klein B. D. *Cutaneous Ocul. Toxicol.* **1996**, *15*, 147-163.
- [115] Hayashi, K.; Mori, T.; Abo, T. et al. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 1199-1208.

8 PŘÍLOHY

8.1 Seznam publikovaných prací

Impaktované časopisy

1. Plodíková, P., Pouzar, M., Rösslerová, Z., Prokopcová, J. Optimized rinsing procedures for enhancing removal of residues of highly viscous and colored substances in the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In Vitro* **29** (2015) 1385-1391. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.05.019. ISSN: 0887-2333.
2. Plodíková, P., Chýlková, J., Černík, O. Využití alternativních biologických modelů pro testování oční dráždivosti chemickými látkami. *Chem.Listy (přijato k otištění)*.

Přednášky

1. Plodíková, P. Jsou všechny alternativní metody skutečně alternativní?, Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie, Kouty nad Desnou (Česká republika), 11.-13. 5.2015, ISBN 987-80-7395-897-8
2. Plodíková, P. Vývoj strategií testování – příklady, Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2016, Kouty nad Desnou (Česká republika), 9.-12. 5. 2016, ISBN 978-80-7395-981-4.
3. Plodíková, P. Strategie testování senzibilizace – změny v legislativě, Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2017, Kouty nad Desnou (Česká republika), 3.- 5. 5. 2017, ISBN 978-80-7560-046-2.
4. Plodíková, P. Specifika toxikologických zkoušek v rámci testování biokompatibility zdravotnických prostředků, Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2019, Kouty nad Desnou (Česká republika), 28.-30. 5. 2019, ISBN 978-80-7560-216-9.

Postery

1. Plodíková P., M., Rösslerová, Z., Prokopcová, J. Optimized rinsing procedures for enhancing removal of residues of highly viscous and colored substances in the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay, *EUROTOX 2015*, Porto (Portugalsko), 13.-16. 9. 2015. Abstract ID 1183.
2. Kubincová, P., Plodíková, P. Senzibilizace in vitro: ARE-Nfr2 Luciferázová metoda, *Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2017*, Kouty nad Desnou (Česká republika), 3.- 5. 5. 2017.

3. Havránková, J., Plodíková, P. Sensibilizace in chemico: Stanovení přímé reaktivity peptidů (DPRA), *Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2017*, Kouty nad Desnou (Česká republika), 3.- 5. 5. 2017.

8.2 Publikační výstup vztahující se k disertační práci

Plodíková, P., Pouzar, M., Rösslerová, Z., Prokopcová, J. Optimized rinsing procedures for enhancing removal of residues of highly viscous and colored substances in the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In Vitro* **29** (2015) 1385-1391. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.05.019. ISSN: 0887-2333.

8.3 Údaje pro knihovnickou databázi

Název práce	Alternativní metody testování oční dráždivosti v průmyslové toxikologii
Autor práce	Ing. Petra Plodíková
Obor	Environmentální inženýrství
Rok obhajoby	2020
Vedoucí práce	prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.
Anotace	Práce je věnována studiu citlivosti a využitelnosti různých biologických modelů, které jsou používány pro testování oční leptavosti a dráždivosti. Pro tento účel byly vybrány tři různé in vitro metody, které se používají pro odhalení potenciálu látek způsobit poškození nebo podráždění oka. In vitro metody mají v porovnání s in vivo klasickým modelem řadu omezení. Vhodnou kombinací těchto metod lze většinou nahradit standardní in vivo testování na králících. Experimentálně bylo provedeno ověření různých kombinací alternativních metod a porovnány dosažené výsledky se závěry in vivo testů. Pro tuto práci byly využity historické výsledky zkoušek na králících a nebyl proveden žádný reálný test na laboratorních zvířatech.
Klíčová slova	oční dráždivost, BCOP, HET-CAM, EpiOcular, Dreize test, alternativní testy, biologické modely



Optimized rinsing procedures for enhancing removal of residues of highly viscous and colored substances in the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay



Petra Plodíková^a, Miloslav Pouzar^{a,*}, Zdeňka Rösslerová^b, Jana Prokopcová^b

^a Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, University of Pardubice, CZ-53002 Pardubice, Czech Republic

^b Research Institute for Organic Synthesis, Centre of Ecology, Toxicology and Analytics, CZ-53354 Rybitví, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2014

Revised 20 May 2015

Accepted 23 May 2015

Available online 28 May 2015

Keywords:

BCOP

Viscous samples

Oils

Waxes

Rinsing procedure

ABSTRACT

Two modifications of the rinsing procedure within the BCOP assay were proposed. Their ability to enhance the removal efficiency of highly viscous and colored samples was compared with an unmodified BCOP procedure (TG OECD 437). The first modification consisted of three-step washing of the applied chemicals from the cornea using Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), olive oil and EMEM, while the classical OECD TG 437 procedure prescribes only EMEM. Within the second modification, mechanical removal of the tested sample from the cornea surface prior to the two step washing procedure was performed. The *in vitro* irritation score (IVIS) exceeded the value of 55 for 9 out of 20 samples when a non-modified rinsing procedure was used. The first modification with the olive oil resulted in a decrease in IVIS for numerous samples, while an IVIS score drop below the threshold value of 55 was only observed for two of them. Mechanical removal of sample residua resulted in a further decline in the measured IVIS. Only the three samples treated by means of this procedure revealed an IVIS above 55. The decreases in IVIS observed during both modifications were mainly related to the reduced opacity, whereas the permeability mostly remained unaffected.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Evaluation of ocular irritancy is an integral part of safety assessment of a wide range of industrial chemicals and consumer products. The *in-vivo* Draize eye irritation test (Draize et al., 1944) and its modifications (OECD, 2012), which were used for this purpose for a number of decades, have gradually ceased to meet the modern requirements for toxicological testing. Ethical (3R) and legal (EU, 2003) standards as well as methodological reasons have led to a search for more suitable alternatives. The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test performed according to the OECD testing guideline (TG) 437 (OECD, 2013) first described by Gautheron et al. (1992), ranks among the few *in-vitro* and *ex-vivo* alternatives accepted by European Union (EU) regulatory authorities for eye irritation testing. According to the prediction model presented in Test Guideline 437 (OECD, 2013), the assay allows for identifying severe eye irritants; i.e., those having irreversible effects on the eye/causing serious damage to the eye (Category 1)

(Global Harmonized System [GHS], Category 1) and those not requiring classification.

According to the OECD test guideline (OECD, 2013), the critical factors of the BCOP test ensure that the test substance adequately covers the epithelial surface and that it is adequately removed during the rinsing steps. Highly viscous pastes and oily substances often exhibit a strong tendency to stick on the cornea surface and it is difficult to wash them off using the standard procedure (Cassidy and Stanton, 1997). Prolonged contact of highly lipophilic compounds with corneal tissue may subsequently lead to enhanced penetration (Gautheron et al., 1992). Colored substances in turn can cause ostensibly irreversible staining of the cornea, which we have also noticed several times during the testing of chemicals for the purposes of REACH. This staining has subsequent influence on resulting IVIS score.

When REACH entered into force, the BCOP test was introduced in our GLP (Good Laboratory Practice) complying laboratory. Since this time, a high number of chemical substances and mixtures have been tested, with some of which ranking with the group of highly viscous and colorful chemicals. The classical rinsing procedure recommended by OECD TG 437 did not ensure the appropriate removal of adhering and coloring samples from the cornea and

* Corresponding author.

E-mail address: miloslav.pouzar@upce.cz (M. Pouzar).

the measured IVIS score values were evidently distorted. The aim of our study was to modify the rinsing procedure within the BCOP test in order to enhance the removing efficiency for highly viscous and colored samples. The results obtained through the use of the modified rinsing procedures were compared with those obtained by the process with unmodified rinsing. The reasons for the differences in the measured irritancy status for certain samples were consequently discussed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Our interest was focused on water insoluble, lipophilic, highly viscous and/or colored samples with expected significant adhesiveness to the ocular cornea tissue. For the purposes of our work it would be ideal to use only such substances whose irritation status had already been defined on the basis of certified in-vitro or in-vivo OECD methods. Unfortunately, the group of samples meeting the above criteria, which we were able to gather with using our testing results database, was insufficiently large. We were therefore forced to supplement the group of samples with pharmaceuticals, cosmetics and chemical products with a less exact irritancy status. The potential ocular irritancy of these samples was estimated based on leaflets and safety data sheets information. Finally, the group of 20 samples with the required physicochemical properties was assembled. Detailed information about the samples is summarized in Table 1.

2.2. BCOP tests

The initial phase of testing was performed according to standard OECD TG 437 protocol, where the selected corneas without macroscopic tissue damage were mounted in holders and incubated with EMEM for the duration of 1 h. Baseline opacity was measured after removing the medium (Opacitometer MC2- le specialist du laboratoire – France). The open-chamber method with direct application to the cornea was used for application of the test samples in order to achieve complete coverage of the epithelial surface by viscous liquid/borderline waxy solid substances. The

exposure time was selected with respect to the sample character and the aim of the study.

The exposure for 10 min and a subsequent 2 h of post-exposure incubation are the conditions primarily used for BCOP test of liquids and surfactants. Solid samples are typically exposed for 4 h without post-exposure incubation. OECD TG 437 expressly recommends testing the semi-solids, creams and waxes as liquids. We have nevertheless decided to use a longer exposure time and test such samples as solids. Since our study was focused on improving the rinsing procedure efficiency, it was necessary at least in some cases to induce the pathological changes of cornea. Only a few of the samples previously tested at our facility were classified as class 2 irritants while the rest of the samples had an uncertain irritancy status. Their ability to induce the desired effects (increasing permeability/opacity) was therefore questionable. The more extreme experimental conditions were supposed to induce a wider spectrum of test responses with the use of the available set of samples and enable us to achieve our study objectives.

The substances were therefore tested at 100% concentration for 4 h. Then in accordance with OECD TG 437 the test samples were washed off three times from the exposed cornea using the prescribed EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) with phenol red and then once with EMEM without phenol red. First step (three times washing by EMEM with phenol red) was unified due to effort to use the same conditions for whole sample set. The high adhesion of some samples to the cornea surface and related low efficiency of above mentioned rinsing procedure was expected. Sample residuals trapped on the cornea were crucial for possibility to test the efficiency of modified rinsing procedures.

Our proposed modification of the rinsing procedure first consisted of adding a second washing step, during which the olive oil was applied in order to increase the removing efficiency of the highly lipophilic sample components. The epithelial surface was washed with olive oil (pharmaceutical quality, supplier Dr. Kulich Pharma, Czech Republic, lot. No. 0010/0112/538 and CH/0275/538) either three times or as long as the cornea surface was free of visible sample residues. After the olive oil washing procedure, the corneas were rinsed with EMEM once again. During each washing step, the anterior chamber of the holder was completely filled with the liquid medium and the cornea was washed by a repeated circular movement in a horizontal position.

Table 1
Characteristics of the tested samples.

No.	Substance name or code		Physical description - color	Expected eye irritancy	In vivo data/GHS classification
1	176/12 (azodye)	Chemical product	Black	Yes ^a	Eye. Irrit. cat 2
2	177/12 (azodye)	Chemical product	Red	No ^a	Not classified
3	Petroleum jelly	Chemical product	White	No ^a	Not classified
4	Aluminous grease	Chemical product	Gray	No ^b	(N/A)
5	Oil color	Chemical product	Red	No ^b	(N/A)
6	Plastic grease	Chemical product	White	No ^b	(N/A)
7	12/09 antimycoticum	Pharmaceutical product	Colorless	Yes ^a	Eye irrit. cat 2
8	Imazol cream	Pharmaceutical product	White	Yes ^b	(N/A)
9	101/08 dermatologicum	Pharmaceutical product	White	Possible ^b	Skin Irrit. cat.2
10	Ichtoxyll cream	Pharmaceutical product	Dark brown	Possible ^b	(N/A)
11	Dermaazulen cream	Pharmaceutical product	Colorless	Possible ^b	(N/A)
12	Triancinolon E cream	Pharmaceutical product	Colorless	No ^b	(N/A)
13	Veterinary cream	Pharmaceutical product	White	No ^b	(N/A)
14	245/11 immunosuppressivum and dermatologicum	Pharmaceutical product	White	No ^a	Not classified
15	Wella hair wax	Cosmetics	Pink	No info	(N/A)
16	Hair wax	Cosmetics	Colorless	No info	(N/A)
17	Cocoa body butter	Cosmetics	White	No info	(N/A)
18	Make up	Cosmetics	Brown	No info	(N/A)
19	Peeling cream	Cosmetics	Colorless	No info	(N/A)
20	Deodorant	Cosmetics	White	No info	(N/A)

^a In vivo data VUOS (skin or eye irritation).

^b Leaflets and safety data sheets.

Table 2
Results of BCOP tests with using various rinsing procedures.

No.	Expected eye irritancy	Standard rinsing method using EMEM				Modified rinsing method – EMEM followed by olive oil rinse and EMEM rinse				Modified rinsing method – EMEM followed by mechanical removal and olive oil rinse and EMEM rinse			
		Mean opacity (SD)	Mean permeability (SD)	IVIS (SD)	Presence of test substance after washing procedure	Mean opacity (SD)	Mean permeability (SD)	IVIS (SD)	Presence of test substance after washing procedure	Mean opacity (SD)	Mean permeability (SD)	IVIS (SD)	Presence of test substance after washing procedure
1	Yes	55.2 (13.03)	0.039 (0.008)	55.78 (12.92)	Not fully removed, colored	66.2 (23.17)	0.057 (0.005)	67.06 (23.13)	Not fully removed, colored	36.6 (15.73)	0.052 (0.009)	37.39 (15.68)	Not fully removed
2	No	53.4 (3.65)	0.012 (0.005)	53.58 (3.65)	Not removed, colored	5.4 (2.88)	0.009 (0.003)	5.4 (2.92)	Without	6 (2.74)	0.01 (0.005)	6.16 (2.74)	Without
3	No	101 (17.89)	0.021 (0.004)	101.31 (17.9)	Not removed	82.4 (17.39)	0.012 (0.005)	82.59 (17.44)	Not fully removed	13 (5.34)	0.011 (0.003)	13.17 (5.35)	Without
4	No	38 (17.35)	0.017 (0.003)	38.26 (17.32)	Not fully removed	9.8 (5.07)	0.026 (0.003)	10.2 (5.05)	Without	2.2 (1.30)	0.014 (0.004)	2.41 (1.30)	Without
5	No	9.6 (3.51)	0.067 (0.024)	10.6 (3.57)	Without	37 (11.42)	0.012 (0.005)	37.17 (11.42)	Without	10.4 (2.61)	0.023 (0.005)	10.74 (2.61)	Without
6	No	3 (1.58)	0.023 (0.003)	3.35 (1.61)	Without	10.6 (4.72)	0.023 (0.004)	10.94 (4.77)	Without	12 (4.47)	0.054 (0.004)	12.81 (4.47)	Without
7	Yes	209.4 (53.33)	0.089 (0.003)	210.73 (53.36)	Not removed	214 (27.45)	0.071 (0.003)	215.07 (27.45)	Not removed	79.4 (28.87)	0.023 (0.005)	80.08 (28.91)	Without
8	Yes	204.6 (26.18)	0.013 (0.003)	204.79 (26.18)	Not removed	229.2 (26.60)	0.02 (0.005)	229.51 (26.61)	Not removed	71.2 (20.51)	0.054 (0.004)	72.16 (20.48)	Without
9	Possible	18.4 (5.46)	0.185 (0.007)	21.18 (5.56)	Without	43.2 (8.93)	0.039 (0.005)	43.79 (8.96)	Without	29.6 (6.66)	0.032 (0.006)	30.08 (6.66)	Without
10	Possible	11.6 (5.18)	0.084 (0.004)	12.86 (5.21)	Without	23.6 (9.50)	0.029 (0.003)	24.04 (9.46)	Without	6.4 (2.61)	0.013 (0.003)	6.6 (2.64)	Without
11	Possible	9.8 (3.27)	0.043 (0.003)	10.45 (3.24)	Without	6 (2.00)	0.037 (0.004)	6.56 (2.03)	Without	7.6 (3.97)	0.065 (0.004)	8.58 (3.95)	Without
12	No	202.4 (20.89)	0.016 (0.004)	202.64 (20.92)	Not removed	20.4 (4.28)	0.064 (0.005)	21.35 (4.26)	Without	5 (1.58)	0.041 (0.006)	5.61 (1.59)	Without
13	No	8.8 (2.59)	0.047 (0.007)	9.51 (2.52)	Without	15.4 (4.83)	0.032 (0.007)	15.87 (4.76)	Without	10.2 (3.96)	0.014 (0.005)	10.42 (4.0)	Without
14	No	141.2 (38.22)	0.026 (0.004)	141.6 (38.22)	Not fully removed	8.4 (3.58)	0.014 (0.003)	8.61 (3.56)	Without	9.6 (5.03)	0.032 (0.005)	10.08 (5.05)	Without
15	No	168 (33.38)	0.026 (0.003)	168.38 (33.42)	Not removed	160.8 (30.31)	0.012 (0.003)	160.99 (30.30)	Not removed	21 (10.84)	0.019 (0.004)	21.29 (10.88)	Without
16	No	15 (3.74)	0.013 (0.003)	15.19 (3.74)	Without	50.8 (10.06)	0.027 (0.003)	51.21 (10.04)	Without	11 (2.55)	0.054 (0.008)	11.82 (2.57)	Without
17	No	227.2 (17.37)	0.023 (0.005)	227.55 (17.35)	Not removed	232.4 (30.96)	0.015 (0.003)	232.63 (30.95)	Not removed	23.2 (5.07)	0.009 (0.003)	23.34 (5.09)	Without
18	No	16 (3.39)	0.018 (0.004)	16.28 (3.37)	Without	15.4 (3.97)	0.022 (0.003)	15.72 (3.95)	Without	7 (2.92)	0.009 (0.003)	7.14 (2.89)	Without
19	No	113.4 (29.85)	0.026 (0.004)	113.79 (29.84)	Not removed	115.8 (22.73)	0.093 (0.005)	117.2 (22.71)	Not removed	80.4 (22.03)	0.045 (0.004)	81.07 (22.04)	Without
20	No	19.4 (6.07)	0.776 (0.002)	31.04 (6.08)	Without	19.4 (8.02)	0.85 (0.003)	32.15 (8.03)	Without	13.4 (4.98)	0.611 (0.004)	22.57 (4.95)	Without

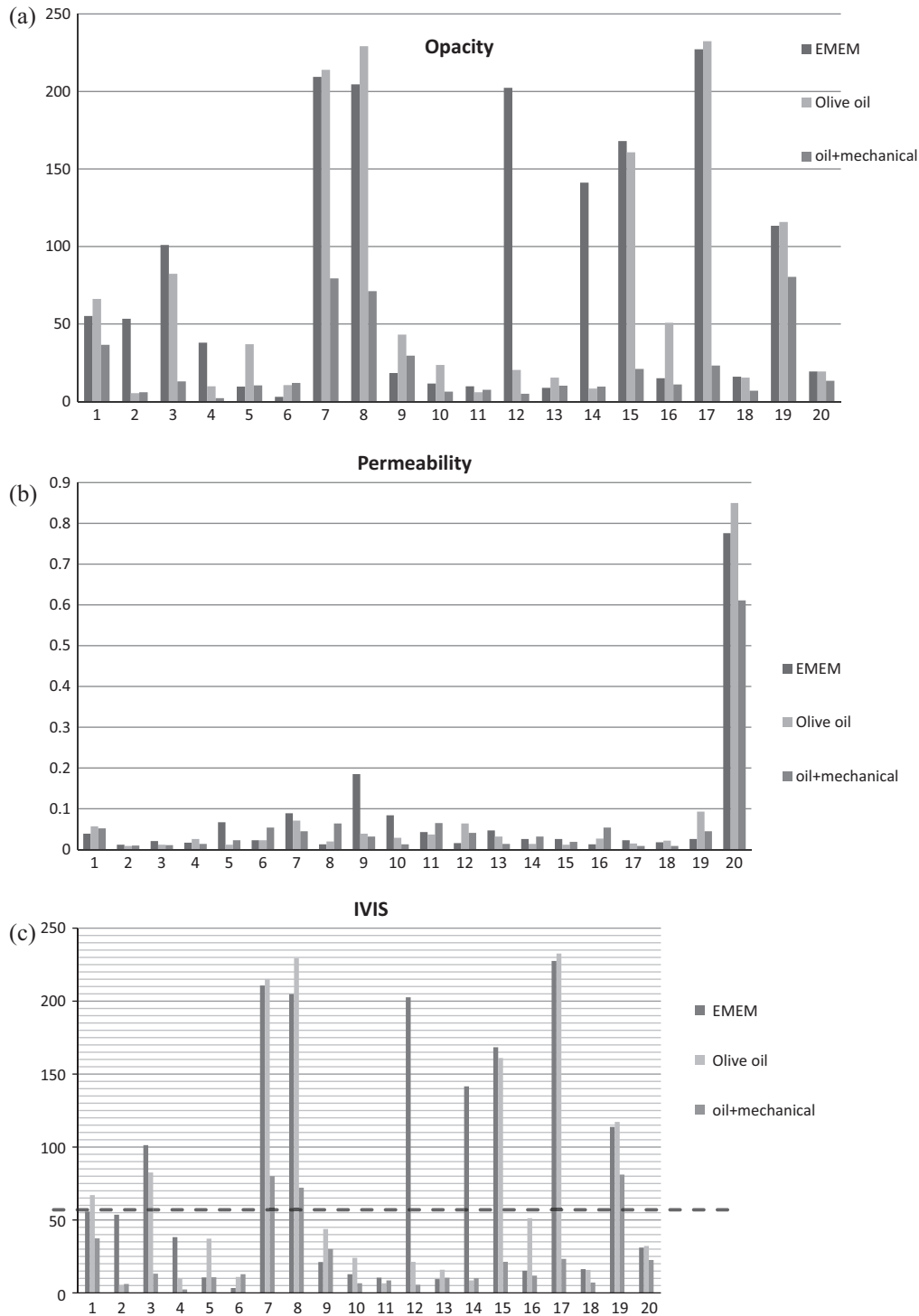


Fig. 1. Measured opacity (a), permeability (b), and calculated IVIS scores (c).

The mechanical removal of the tested samples from the surface of the corneal tissue was carried out before the sequence of the washing procedures such as the second rinsing procedure modification. The careful wiping of the cornea was performed using a cotton-wool pad (supplier Hartmann Rico a.s., Czech Republic).

The final part of the test was again performed completely in accordance with the OECD TG 437. Corneal opacity after 2 h post-exposure time was measured and consequently 1 mL sodium fluorescein solution (concentration 4 mg/mL) was added to the anterior chamber of the cornea holder. After 1.5 h of incubation the amount of sodium fluorescein that had penetrated through

cornea into the posterior chamber was quantified using UV/VIS spectrophotometry (Spectrophotometer GENESYS™ 10 UV/VIS Scanning). The in vitro irritation score (IVIS) was calculated according to the following formula (Eq. (1))

$$IVIS = \text{mean opacity value} + (15 \times \text{mean OD}_{490} \text{ value}) \quad (1)$$

Calculation of IVIS score for each sample and each experimental design (unmodified process, and the first and second modifications) was performed using 5 independent measurements, thus a total of 15 corneas were spent within the experiments with the particular sample.

3. Results

3.1. Standard OECD TG 437 protocol

The opacity and permeability values and corresponding IVIS summarized in Table 2 were calculated as the arithmetic mean of five repeated experiments consisting of an exposure of five individual bovine corneas to a particular tested substance. The IVIS of the nine samples (45%) exceeded the value 55. Two of them were chemical products (1, 3); four of them were pharmaceuticals (7, 8, 12 and 14) and three of them belonged to cosmetics (15, 17 and 19). It was possible to visually detect sample residues on the corneal surface in the case of all the samples with IVIS above 55. The next two samples with not fully removed sample traces express the IVIS of 53.6 (2) and 38.3 (4). Only one sample, which showed no visually detectable traces of the sample, has an IVIS score above 30 (20).

3.2. First rinsing procedure modification (olive oil)

Application of a second washing step using olive oil and EMEM resulted in a substantial decrease in the measured IVIS for sample Nos. 12 and 14. The value of this parameter for sample No. 12 was 202.6 when the classical approach was used and 21.4 for the modified procedure (89% reduction). In the case of sample 14, the value of the IVIS dropped from 141.6 to 8.6 (94% reduction). Unlike the classical process, the modified rinsing procedure was capable of completely removing both these samples from the corneal surface. For the other samples, where the non-modified process provided IVIS values higher than 55 (1, 3, 7, 8, 15, 17 and 19), the modification did not induce a substantial IVIS decrease. In the case of these samples, the removal efficiency of the modified rinsing procedure was similarly low as the efficiency of the unmodified process. The IVIS decrease was also detected for certain samples, where the non-modified process provided values lower than 55 (Nos. 2, 4, 11, 18). The most substantial decline in IVIS was again observed

for those samples, where the modification led to the visible elimination of sample residues irremovable by the classical approach (2, 4). In contrast, however, using the olive oil led to an increase in IVIS for several samples (Nos. 5, 6, 9, 10, 13, 16 and 20). This effect was strongest for sample 5 (increase of 285%) and most serious for sample No. 16, where the IVIS changed from 15.2 to 51.2.

3.3. Second rinsing procedure modification (mechanical removal and olive oil)

The second modification of the rinsing procedure was based on the mechanical removal of the tested sample from the bovine cornea after the exposure time and subsequent two-step washing process, which was identical to the procedure described in the previous Section 3.2. This modification resulted in an increased IVIS score in comparison with the non-modified process in four cases (Nos. 5, 6, 9 and 13). For all these samples, the IVIS obtained using the non-modified process was far below the value of 55 (from 3.4 to 21.2) and the results of the modified procedure (from 10.4 to 30.1) did not attain this value. The seven samples express an IVIS score higher than 55 (1, 3, 7, 8, 15, 17 and 19), when the first modification was used. The second modification caused the IVIS to drop below this value for four of them (1, 3, 15 and 17). A significant difference in sample residues removal efficiency between first and second modification was observed for six of these samples (3, 7, 8, 15, 17 and 19). Visible corneal staining was only detected after second modification for one sample (1).

4. Discussion

Two modifications of the rinsing procedure within the BCOP test performing in accordance with OECD TG 437 were suggested. These modifications were intended to enhance the removal efficiency of the sample residues, if highly viscous and if the coloring samples were tested.

Table 3
Effects of the modifications on the baseline opacity.

Standard rinsing method using EMEM				Modified rinsing method – EMEM followed by olive oil rinse and EMEM rinse				Modified rinsing method – EMEM followed by mechanical removal and olive oil rinse and EMEM rinse			
Cornea no.	Baseline opacity	Final opacity	Opacity difference	Cornea no.	Baseline opacity	Final opacity	Opacity difference	Cornea no.	Baseline opacity	Final opacity	Opacity difference
1	7	7	0	1	6	7	+1	1	4	4	0
2	4	5	+1	2	7	7	0	2	4	4	0
3	7	7	0	3	7	7	0	3	5	6	+1
4	6	6	0	4	7	8	+1	4	5	5	0
5	6	7	+1	5	6	6	0	5	4	5	+1
6	7	7	0	6	6	7	+1	6	2	2	0
7	7	7	0	7	7	7	0	7	6	6	0
8	5	6	+1	8	5	6	+1	8	4	4	0
9	7	7	0	9	7	7	0	9	7	8	+1
10	7	7	0	10	6	6	0	10	6	6	0

Table 4
Effect of the modification on the permeability.

Standard rinsing method using EMEM				Modified rinsing method – EMEM followed by mechanical removal and olive oil rinse and EMEM rinse			
Positive item	Opacity difference mean/SD	Permeability mean/SD	IVIS mean/SD	Positive item	Opacity difference mean/SD	Permeability mean/SD	IVIS mean/SD
NaOH 1%	77.4/22.05	1.898/0.388	105.87/22.11	NaOH 1%	75.8/26.48	1.952/0.262	105.08/25.84
Imidazole 20%	43.2/4.09	1.922/0.228	72.03/5.31	Imidazole 20%	42.6/7.02	1.766/0.274	69.09/4.72
DMFA	90.4/10.99	0.169/0.055	92.93/11.31	DMFA	91.6/14.33	0.146/0.067	93.79/14.38

Table 5
Result of the histopathological examination.

Test substance	Epithelium lesions/intensity	Stroma lesions/intensity	Endothelium lesions/intensity
Untreated	–/–	–/–	–/–
<i>Standard rinsing method using EMEM</i>			
NaOH 1%	Loss/+++ Loss of staining S/+++ Degeneration S/+++ Vacuolation/+++	Swelling/++ Degeneration/++	Detachment/+
Imidazole 20%	Desquamation S/++ Vacuolation W/++ Detachment/+ Loss of staining/++ Coagulation and degeneration/++	–/–	Loss
DMFA	Vacuolation S/++ Loss of adherence Desquamation S/+++	Swelling/++	Detachment/+
No. 5	Desquamation S/+	–/–	Desquamation/+
No. 7	Desquamation S/++ Coagulation and hypereosinophilia S/++ Nuclear condensation S/++ Detachment/+ Vacuolation S/++	Swelling/++	Detachment/+
No. 9	Desquamation S /+ Detachment/+ Vacuolation B/++	–/–	–/–
No. 20	Detachment/+++	Degeneration/++	Detachment/+++
<i>Modified rinsing method – EMEM followed by mechanical removal and olive oil rinse and EMEM rinse</i>			
NaOH 1%	Loss	Swelling/++ Degeneration/++	Detachment/+++ Degeneration/++
Imidazole 20%	Desquamation S/++ Vacuolation W/++ Detachment/+ Loss of staining S/++ Degeneration S/++	–/–	Loss
DMFA	Detachment/+ Swelling and vacuolation /++ Loss of adherence	Degeneration/++	–/–
No. 5	Desquamation S /+ Detachment/+	–/–	–/–
No. 7	Desquamation S/+++– Coagulation and hypereosinophilia S/++ Swelling and vacuolation W,B/++	–/–	Loss
No. 9	Swelling S/++ Desquamation S/+ Nuclear condensation S/++ Detachment/+ Vacuolation S/+	Swelling/++	Detachment/+
No.20	Detachment/+++ Vacuolation and swelling/++	Nuclear condensation/++	–/–

+ Focal changes, slight intensity of changes.

++ Mild intensity of changes.

+++ Marked intensity of changes.

S – squamous stratum of epithelium.

W – wing stratum of epithelium.

B – basal stratum of epithelium.

The first modification based on the application of olive oil induced a sharp decline in the IVIS namely for samples 2, 4, 12 and 14 (Fig. 1c) This effect was connected with the apparent difference in efficiency of sample residues removal between the unmodified and modified procedure (Table 2) and with related changes in the opacity (Fig. 1a). The permeability of these samples (Fig 1b) remained virtually unchanged (2, 4, 14) or even rose (12). Changes in opacity were also important in cases, when the first modification led to an essential increase in IVIS (5 and 16). The dissolution of these materials (5 and 16) in olive oil could have probably caused the sample penetration into the inner layers of the corneal tissue and induce the observed effect. The effect of the olive oil itself could be the alternative explanation of this finding. Moreover, a less important opacity increase was observed for certain other samples (1, 6, 8, 9, 10, and 13). Therefore, the other

experiment with 30 new untreated corneas was performed. 10 corneas were treated by unmodified, 10 by modified rinsing procedure and 10 by mechanical contact and modified rinsing procedure without application of any sample and opacities were measured. The results summarized in Table 3 indicate that the application of olive oil itself has no or a minimal effect on the opacity values.

The highest increase in permeability caused by the first modification was observed for samples 12 and 19. In the case of sample 12, this effect was overbalanced by a simultaneous opacity decline, which was crucial for the resulting IVIS drop, while a slight IVIS rise was observable for sample 19, where the competitive process did not take place. The possible effect of olive oil on fluorescein permeability is discussed in the next paragraph.

The mechanical removal of the sample residues before the sequence of washing steps led to a dramatic change in removal

efficiency, related opacity and the resulting IVIS score for several samples (1, 3, 15 and 17). The permeability variation in this case also had a minimal effect on the calculated IVIS. The expected weakness of the procedure based on the wiping of corneas was in their potential mechanical damage. The test performed with a set of three substances declared as positive control substances (1% NaOH, 20% Imidazole and DMFA) did not confirm this concern. The results summarized in Table 4 reveal no significant difference in opacity and permeability when the unmodified process and mechanical removal of the sample residues was performed. This conclusion is supported by histopathological analysis of corneas exposed by the above-mentioned positive substances and by samples 5, 7, 9 and 20, the results of which are summarized in Table 5. Epithelia and stromal lesions were evaluated according to Harbell et al. (2006) and OECD No. 160 (OECD, 2011).

5. Conclusion

Two modifications of the rinsing procedure within the BCOP test were suggested and tested for their ability to remove the residues of highly viscous and coloring samples from the corneal surface. Particular modifications namely influenced opacity measurements, while permeability values in general remained unaffected. The rinsing procedure based on wiping and subsequent washing of exposed corneas with olive oil proved to be extremely effective in removal of highly adhesive samples and could potentially expand the application area of the BCOP test. Both discussed

modifications are simple and inexpensive. They require no special equipment and do not substantially increase the labor intensity of the testing.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the valuable advice and support of Rostislav Čihák, the National Coordinator of the OECD Test Guidelines Program.

References

- Cassidy, S.L., Stanton, E., 1997. In vitro eye irritation studies on organosilicon compounds. *J. Toxicol.-Cutan. Ocul. Toxicol.* 16, 45–60.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- EU, 2003. Directive 2003/15/EC.
- Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F., 1992. Bovine corneal opacity and permeability test – an in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18, 442–449.
- Harbell, J.W., Mun, G., Curren, R.D., 2006. Application of histological evaluation to enhance the bovine permeability and opacity (BCOP) assay. In: 45th Annual Society of Toxicology Meeting, San Diego, USA.
- OECD, 2011. Guidance document on the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and isolated chicken eye (Ice) test methods: collection of tissues for histological evaluation and collection of data on non-severe irritants.
- OECD, 2012. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Publishing.
- OECD, 2013. 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. OECD Publishing.