



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2012**



**BIOCID TERMÉKEK IN VITRO
SZEMIRRITÁCIÓS VIZSGÁLATA**

Készítette: Somody Gergő Lajos

Témavezető: Dr. Budai Péter

Intézet / Tanszék: Növényvédelmi Intézet

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1.	A szem felépítése.....	5
2.2.	A biocid termékek toxikológiai minősítése.....	6
2.2.1	A hagyományos és az alternatív akut szemirritációs vizsgálatok	9
2.3.	A szemirritáció toxikológiai vizsgálata organotipikus módszerekkel.....	14
2.3.1	A chorioallantois membrán (CAM) kialakulása, szerkezete	14
2.3.2	A tyúktörzs chorioallantois membránjának felhasználása szemirritáció vizsgálatokhoz.....	17
3.	SAJÁT VIZSGÁLATOK	20
3.1.	A vizsgálatban felhasznált anyagok és módszerek.....	20
3.1.1	A tyúktörzs chorioallantois membrán (HET-CAM) teszt	20
3.1.2	A Draize-féle primer szemirritációs teszt	23
3.1.3	A vizsgálatban alkalmazott biocid termékek jellemzése	27
3.2.	A vizsgálatok eredményei és értékelésük.....	29
3.2.1	A HET-CAM tesztből származó eredmények	29
3.2.2	A Draize-féle szemirritációs tesztből származó eredmények	30
3.2.3	Az <i>in vivo</i> és az <i>in vitro</i> eredmények összehasonlítása.....	31
4.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	32
5.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
6.	IRODALOMJEGYZÉK.....	34

1. BEVEZETÉS

„Egy nemzet nagysága és erkölcsi
fejlettsége híven tükröződik abban,
ahogyan az állatokkal bánt.”

Mahatma Gandhi

Az egészségügyi kártevők irtására felhasználható irtószerek (biocid termékek) pontos toxikológiai minősítése rendkívül fontos feladat, hiszen azokat az ember közvetlen lakó- és munkakörnyezetében használják fel, ezen felül egészségügyi intézményekben, akár legyengült szervezetű betegek közelében.

A felhasználókat érintő kockázatbecslés szempontjából kiemelendő, hogy a biocid irtószer készítmények nagy arányban szabadforgalmú szereket jelentenek, amelyeket szakképesítés nélküli személyek használnak fel. Külön említést érdemelnek a kereskedelmi forgalomban elérhető azon riasztószerek, melyek a bőrfelületre juttatva fejtik ki hatásukat.

A biocid termékek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatok kivitelezése a 440/2008/EK irányelv alapján többségében *in vivo* metodikán alapszik, emlős állatkísérletekre támaszkodik. Az irányelv alapján a bőr- és szemirritációs valamint a bőr- és szemkorrozációs vizsgálatokban preferált állatfaj az albínó házinyúl. Az általánosan elfogadott *in vivo* szemirritációs vizsgálatot Draize és munkatársai fejlesztették ki 1944-ben.

Az évek során igyekeztek kifejleszteni olyan alternatív eljárásokat, amelyek csökkentik a kísérletekben felhasznált állatok szenvedését és azok létszámát. Az OECD TG 405 (2002) elnevezésű a vegyi anyagok toxikológiai vizsgálatára vonatkozó útmutató már tartalmaz egy kiegészítést, melyben az *in vivo* Draize-teszt csak utolsó mozzanatként szerepel, ha a jóváhagyott *in vitro* módszerek az erősen irritatív potenciálnál gyengébb irritációt értékelnek a vegyi anyagok irritatív tulajdonságainak meghatározása során.

Ilyen alternatív eljárások közé tartoznak a tyúktojás chorioallantois membránját (HET-CAM) felhasználó *in vitro* módszerek, hiszen általuk megfelelően modellezhetők a különböző vegyi anyagoknak a szem kötőhártyájára gyakorolt károsító hatásai.

A Georgikon Kar Növényvédelmi Intézetében régóta végeznek olyan alternatív toxikológiai vizsgálatokat, amelyekben mezőgazdasági vegyi anyagok szemirritációs tulajdonságait vizsgálják *in vitro* tesztekkel, melyek eredményei jól közelítik a hagyományos *in vivo* szemirritációs tesztek eredményeit.

Jelen munkámmal igyekszem felmérni, hogy előzetesen (néhány terméken bemutatva) használható-e a tyúktojás chorioallantois membránja a biocid irtószerek irritációs potenciáljának meghatározására.

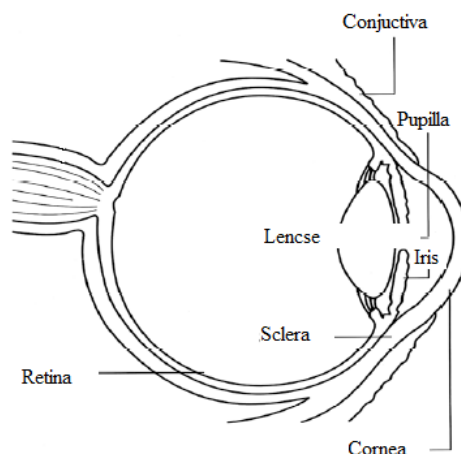
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szem felépítése

A szem a gerinces állatoknál a csontos szemüregben helyezkedik el, amely a szemhéjjal, a szempillával és a kötőhártyával (*conjunctiva*, ami a szemhéjakat bélelő és a szemgolyó frontális részét fedő vékony nyálkahártya) együtt a külső behatásokkal szemben védi a szemet. A szemgolyó falát adó három hártyán belül a szemgolyó magja, a szemcsarnokok, a szemlencse és az üvegtest foglalnak helyet (1. ábra) (SZENTÁGOTHAJ - RÉTHELYI, 1985).

A szemgolyó három koncentrikus hártyából épül fel. A külső hártya a tülkhártyából (*sclera*) és a szaruhártyából (*cornea*) épül fel. A középső hártyának három része van a *chorioidea*, a *corpus ciliare* és az *iris*. A legbelső réteg magában foglalja az ideghártyát (*retina*), amely fotoreceptorokat tartalmaz és összeköttetésben áll a központi idegrendszerrel (WILKIE – WYMAN, 1991).

A szemgolyó vérellátását az ideghártyához térő retinális, az érhártyát ellátó *ciliaris* és az *episcleralis - conjunctivalis* érrendszer biztosítja. Külső inger hatására, illetve gyulladásos állapotban az erek kitágulnak (FEHÉR, 1989).



1. ábra: A szem felépítése

A szemirritatív anyag hatására először a legkülső réteg, a *cornea* sérül, de erősebb irritáció, vagy korrozív természetű anyag hatására a szem mélyebben fekvő rétegei is károsodhatnak (KISS, 1997).

A szaruhártya és a kötőhártya hámszöveti jellegűek, ezért a károsító vegyületek hatásmechanizmusa hasonló, mint bőrirritáció esetén, viszont a következmények súlyosabbak: a szaruhártya fénytörésének minimális változása is gátolja a normális szemműködést. A gyulladás az alatta található *iris* és az érhártya gazdag érhálózatát érinti, hiszen a *cornea* nem tartalmaz kapilláris ereket.

A szemirritációs vizsgálatokat döntően házi nyulakon végzik. Azonban számtalan különbség található az ember és a nyúl szeme között. Anatómiai eltérés a nyulak harmadik szemhéja, a *membrana nictitans*, valamint relatíve nagyobb és vékonyabb szaruhártya felülete. Könnytermelésük is elmarad az emberétől (HUHTALA et al., 2008).

2.2. A biocid termékek toxikológiai minősítése

A biocid fogalomkör használata és az irtószerek különféle toxikológiai minősítési eljárásainak újragondolása, Magyarország Európai Unióhoz történő csatlakozásával elkerülhetetlenné vált.

A biocid az élő szervezetek elpusztítására szolgáló anyag, a biocid termék a kártékony szervezet kémiai vagy biológiai eszközökkel történő elpusztítására, ártalmatlanná tételére, tevékenységében való megakadályozására, elrettentésére vagy más módon történő korlátozására alkalmas szerforma. Ezen fogalmak használatát, valamint a 4 fő- és 23 termékcsoportha (1. táblázat) történő besorolását a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) határozta meg (ERDŐS - SZLOBODNYIK, 2004).

1. táblázat: A biocid termékek felosztása a 38/2003. (VII. 7.) ESzCsM-FVM-KvVM rendelet 5. számú melléklete alapján

Főcsoportok	Termékcsoporthok
1. Fertőtlenítőszeres és általánosan használt biocid termékek	1. Humán egészségügyi biocid termékek
	2. Fertőtlenítőszeres és egyéb biocid termékek
	3. Állat-egészségügyi biocid termékek
	4. Élelmiszer és takarmány fertőtlenítő szerek
	5. Ivóvíz fertőtlenítő szerek
2. Tartósítószeres	6. Tartósítószeres tartályban forgalomba hozott készítményekre.
	7. Bevonatvédő szerek
	8. Faanyagvédő szerek
	9. Rost, bőr, gumi és polimerizált anyagok konzerválószeres
	10. Falazási anyagok konzerválószeres
	11. Konzerválószeres hűtőfolyadékokhoz és technológiai eljárásokhoz
	12. Nyálkásodásgátló szerek
	13. Fémmegmunkáló folyadékok tartósítószeres
3. Károsítók elleni védekezésre használt szerek	14. Rágcsálóirtó szerek
	15. Madárirtó szerek
	16. Csigaölő szerek
	17. Halirtó szerek
	18. Rovarölő, atkaölő és más ízeltlábúak elleni szerek
	19. Riasztó- és csalogatószerek
4. Egyéb biocid termékek	20. Élelmiszer- és takarmánytartósító szerek
	21. Algásodásgátló termékek
	22. Balzsamozáshoz és állatok kitömése során használt folyadékok
	23. Egyéb gerincesek elleni szerek

Az 1998. február 16-án elkészített 98/8/EK irányelv az Európai Unió országaiban a lakosság és a természeti környezet védelméért, a biocid hatóanyagokra vonatkozó egységes, kötelező érvényű a minősítésre, forgalmazásra, és felhasználásra vonatkozó szabályrendszert jelent. Az irányelv értelmében a biocid termékek toxikológiai elbírálása a tagországok feladata, míg a hatóanyagokat egységesen, központilag véleményezik.

A biocid hatóanyagok veszélyességének elbírálása az EU irányelvein, az OECD ajánlásain és a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat (Good Laboratory Praxis, GLP) követelményeire épülő, a tudomány és technika fejlődése miatt folyamatosan módosított vizsgálati módszereken, valamint a kérdéses vegyi anyag fizikai, kémiai és toxikológiai jellemzőinek ismeretén alapszik (ERDŐS - SZLOBODNYIK, 2005).

A hatóanyagok és bomlástermékeik megítélése az akut, szubkrónikus, krónikus és speciális (mutagén hatások, daganatkeltés, fejlődési rendellenességek okozása, kromoszómaszám

módosítása, nemző- és fogamzó képesség befolyásolása) toxikológiai vizsgálatok alapján történik. Ugyanakkor, némely esetekben szükséges a haszon- és háziállatokra gyakorolt károsító hatást is értékelni, ezen felül, bizonyos hatóanyagcsoportoknál pl. a szerves foszforsav-észtereknél az alapvizsgálatokat kiegészíteni neurotoxicitási vizsgálatokkal. Nem feledkezhetünk meg az orvosi megfigyelések (mérgezés diagnózisa, klinikai vizsgálata, mérgezés prognózisa) fontosságáról sem.

A kockázatbecslés a megfigyelhető hatást nem okozó mennyiség (No Observed Effect Level, NOEL), a megfigyelhető káros hatást nem okozó mennyiség (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), a legkisebb megfigyelhető hatást okozó mennyiség (Low Observed Effect Level, LOEL), a legkisebb megfigyelhető káros hatást okozó mennyiség (Low Observed Adverse Effect Level, LOAEL), az ökoszisztémát nem károsító mennyiség (Predicted No Effects Concentration, PNEC), illetve a megengedhető napi bevitel (Allowable Daily Intake, ADI) alapján készül. Az elsősorban állatkísérletek alapján nyert információkból származnak a kockázatmentes rendeltetésszerű felhasználást lehetővé tévő értékek, így a megengedhető hatóanyag maradék, a maximális biocid maradék (Maximum Residue Limit, MRL), a felhasználót érő elfogadható expozíciós szint (Acceptable Operator Exposure Level, AOEL), a munkahelyi általános koncentráció érték (ÁK) és a munkahelyi csúskoncentráció érték (CK). A kockázatbecslés lehetővé teszi az embert és környezetét védő intézkedések meghozatalát. Ennek alapján a veszélyeket és kockázatokat (Risk) egyértelműsítő R-mondatokhoz és számokhoz a biztonságos (Safety) felhasználást szavatoló S-mondatok és számok tartoznak (ERDŐS – SZLOBODNYIK, 2006).

Elmondható, hogy egy vegyi anyagnak az emberre gyakorolt károsító hatásának meghatározása elsődlegesen az emlős állatokon végzett kísérletek eredményein alapszik. Azonban a vizsgálatok között nagy az eltérés a felhasznált állatok létszámát tekintve. A nagyságrendek megismerésének érdekében elmondható, hogy egy gyógyszerkészítmény esetében az akut, szubkrónikus és krónikus toxikológiai vizsgálatokhoz, valamint a reprodukciós képességre gyakorolt hatásának, genotoxikusságának, karcinogenitásának megállapításához akár 1500-3000 állatra is szükség lehet. A leggyakrabban egereket és patkányokat (74%), majd nyulakat (4%), tengeri malacokat (3%), kutyaakat (1%) és nagyon ritkán főemlősöket (> 1%) használnak fel (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2005).

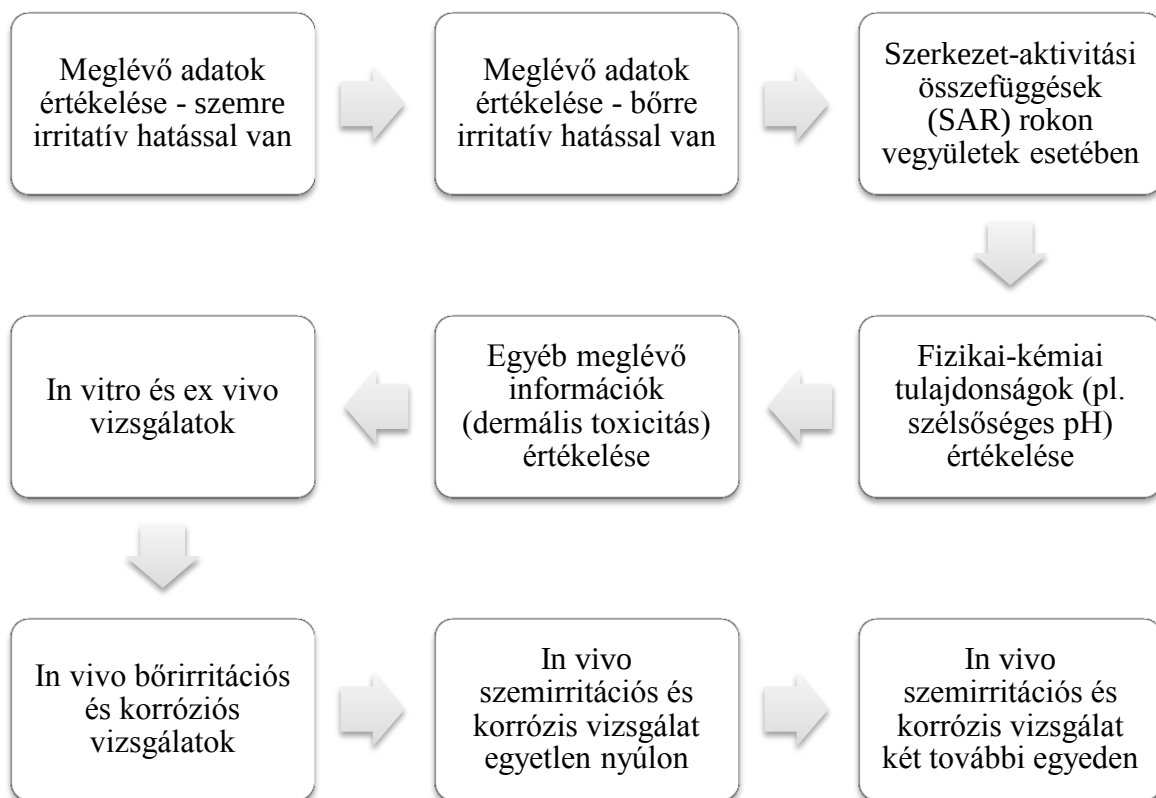
2.2.1 A hagyományos és az alternatív akut szemirritációs vizsgálatok

Az Európai Bizottság 440/2008/EK rendelete egyértelműen meghatározza a vegyi anyagok szemirritációs (a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások) és szemkorróziós (a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül nem teljes mértékben visszafordítható szövetkárosodások a szemben, vagy súlyos fizikai látóképesség-romlás) hatásának vizsgálati protokollját. Fontos megemlíteni, hogy a rendelet kiemeli az állatvédelem fontosságát, így a vizsgálandó anyagokról rendelkezésre álló korábbi információk kiértékelése révén, azon anyagok esetében szükségtelenné válnak a laboratóriumi állatokon (*in vivo*) történő kísérletezések, ezáltal érvényesítve az állatjóléti szempontokat.

Amennyiben a lépcsőzetes vizsgálatokból (2. ábra) vagy az *in vivo* bőrkorróziós és irritációs tesztekkel sem határozható meg a vegyi anyag szemkorróziós vagy irritációs potenciálja, úgy elvégezhetőek az *in vivo* vizsgálatok.

Ugyanakkor a lépcsőzetes vizsgálati stratégiába bekerültek az *in vitro* módszerek is.

A hagyományosan alkalmazott szemkorróziós és szemirritációs vizsgálatok a DRAIZE és mtsai. (1944) által kifejlesztett nyúl szem vizsgálatokon alapulnak, esetünkben is a fent említett rendelet B.5. szabványának felel meg, mint *in vivo* eljárás. Bizonyos kozmetikumok esetében az Amerikai Egyesült Államokban már alkalmazzák az ún. kis térfogatú szemvizsgálatot (Low Volume Eye Test, LVET), ahol a vizsgálandó anyagból csupán a Draize-tesztben megszokott mennyiség 10%-át juttatják a nyulak szemére (SPIELMANN, 1997).



2. ábra: Vizsgálati és kiértékelési stratégia szemirritációs, illetve szemkorróziós hatás vizsgálatához a 440/2008/EK rendelet alapján

Az alternatív toxikológiai eljárások olyan módszerek, amelyek képesek csökkenteni a felhasznált állatok mennyiségét (reduce), kifinomultabb kísérleti technikákat alkalmaznak, melyek eredményeként a kísérleti állatokat kevesebb szenvedés éri (refine), illetve helyettesítik az emlős kísérleti állatokat (replace). A 3R-ként ismert alternatív elvet 1959-ben definiálták (RUSSELL – BURCH, 1959).

Az *in vitro* vizsgálatok előnyei, hogy kontrollált körülmények között, nagyfokú szabványosíthatóság mellett, gyorsabb és olcsóbb eljárásokat alkalmazva akár emberi szöveteken is, csökkennek az eredmények közötti eltérések (KANDÁROVÁ – LETAŠIOVÁ, 2011).

Bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatok:

A bőrirritációs és korróziós vizsgálati eredményekből is következtethetünk a szemre vonatkozó hasonló hatásokra, így azok pozitív eredményei alapján nem szükséges további kísérleti állatok bevonása, azaz a szemirritációs vizsgálatok elvégzése. Az alábbiakban ismertetem az Európai Bizottság 440/2008/EK rendeletében e témában felsorolt *in vitro* eljárásokat.

Az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatok közé tartozik a transzcután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER). Lényege, hogy a vizsgált vegyi anyagot 24 órán át kétkamrás vizsgálati rendszerben alkalmazzák, melyben a bőrkorongok (kíméletes módon elpusztított 28-30 napos patkányokról) választják el a két kamrát. Korrozív anyagoknak számítanak azok, melyek az *epithelium* épségét megváltoztatják, ezáltal átjárhatóvá válik. A bőr látszólagos elektromos ellenállása megváltozik, amely mérhető. A TER vizsgálat határértéke 5 k Ω . Ezzel a vizsgálattal megbízhatóan megkülönböztethetők a bőrkorróziót okozó és nem okozó ismert vegyi anyagok (BARRATT et al., 1988; FENTEM et al., 1988).

Az előző csoportba tartozik az emberi bőrmoddellen végzett vizsgálat. Az eljárás elve, hogy a vizsgált anyagot helyileg egy háromdimenziós *in vitro* emberi bőrmoddellre viszik fel. A korrozív anyagot azáltal azonosítják, hogy egy megadott expozíciós időtartam alatt képes-e a meghatározott határérték alá csökkenteni a sejt életképességét. (BARRATT et al., 1988; FENTEM et al., 1988).

A 776/2009/EK rendelet kiegészítette *in vitro* bőrirritációs eljárásokat egy új módszerrel, a rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálattal. Lényege, hogy a vizsgált anyagot helyileg egy háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel, melyet speciálisan tenyésztettek ki. A rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálat elve azon alapul, hogy az irritatív hatású anyagok képesek diffúzióval áthatolni a szarurétegen. Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtleletképességet 50%-os határérték alá csökkentik (OKBI, 2008).

A 776/2009/EK rendelet megemlíti az OECD 435. útmutatóját. Ez az *in vitro* bőrkorróziót vizsgáló membrán-barrier eljárás. Lényege, hogy egy mesterségesen kialakított membránon a vegyi anyag által előidézett változásokból becslik a bőrre gyakorolt korrozív hatást (OECD, 2006).

Izolált szerveken történő szemirritációs vizsgálatok:

Az OECD 437. számú tesztleírása a szarvasmarha szaruhártya opacitás és permeabilitás (Bovine Cornea Opacity Permeability, BCOP) *ex vivo* vizsgálatot tartalmazza, amely alkalmas

szemkorrozív vegyületek azonosítására. Ezt a tesztet nem élő állatokon végzik, hanem a vágóhidakról gyűjtik össze a szarvasmarha szaruhártyákat. A kifogástalan állapotú szaruhártyákat egy hordozóra erősítik, majd megméri az opacitását (csökkent fényátbocsátás). A vizsgálandó vegyi anyaggal 10 percen keresztül érintkeztetik a szaruhártyát, majd a kezelés utáni opacitást is megméri. Ezután a szaruhártyák permeabilitását egy fluoreszcens festékanyag áthatolásának mérésével (spektrofotométer) határozzák meg (GAUTHERON et al., 1992).

Ugyancsak *ex vivo* az izolált csirkeszemén végzett (Isolated Chicken Eye, ICE, vagy Chicken Enucleated Eye Test, CEET) irritáció vizsgálat (OECD TG 438). A teszt során a vizsgálandó vegyület által a csirkeszem-szaruhártyán okozott károsodás mértékét a szaruhártya megduzzadásának mértékéből, az opacitásból és a fluoreszcen visszartató képességből határozzák meg. A csirkefejekből eltávolított szemeket a legrövidebb időn belül a laboratóriumba szállítják, majd a szemeket 45–60 percig inkubálják, hogy egyensúlyi állapotba kerüljenek, majd megméri az alap szaruhártya vastagságot, és az opacitást, hogy később ezzel korrigálhassák az eredményeket. A vizsgálandó anyagok mindössze 10 másodpercig kerülnek kontaktusba a szaruhártyával, majd izotóniás sóoldattal leöblítik róla. A kezelés után különböző időpontban (30, 75, 120, 180, 240 perc) méri a 3 vizsgálandó paramétert, majd az eredményekből irritációs értékeket képeznek (PRINSEN - KOËTER, 1993).

Nem csupán a csirke és a szarvasmarha, de a nyúl izolált szeme (Isolated Rabbit Eye, IRE) is felhasználható vegyi anyagok szemkorrozíós hatásának vizsgálatára. Az *ex vivo* módszer esetében a kíméletesen elpusztított állatok szemeit eltávolítják, majd a szaruhártya vastagodásából (Draize-teszthez hasonlóan), és a fluoreszcen visszartató képességből következtetnek az irritációs tulajdonságra (WHITTLE et al., 1992).

Az emberi szaruhártya hámszövetének modellezésén alapuló szemirritációs vizsgálatok:

Az emberi szem szaruhártyájának hámszövetét (*epithelium*) modellező vizsgálatok közé tartozik az EpiOcularTM eljárás. A modell humán eredetű epidermális keratinocitákból áll, melyek többrétegű struktúrába rendeződnek, így a szaruhártya epitheliumához hasonlítanak. A vegyi anyag által okozott károsodást az ET₅₀ értékkel szemléltetik (sejtek életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő) (BLAZKA et al., 2003).

A Skinethic HCE modell immortalizált epithelsejtekből áll, melyeket levegő-folyadék határfelületen tenyésztnek. A módszer *in vivo* / *in vitro* összehasonlító elemzését NGUYEN és mtsai. 2003-ban elvégezték.

A Gillette modell transzfektált humán szaruhártya epithel sejtvonalat használ fel (Transfected Human Corneal Epithelial Cell Line, HCE-T) (KAHN et al., 1993).

Sejtszintű, citotoxicitási vizsgálatokon alapuló szemirritációs tesztek:

A sejtalapú citotoxicitás módszerek közé tartozik a neutrál vörös felvétel (Neutral Red Uptake, NRU). A neutrál vörös egy festék, mely áthatol a sejthártyán, majd lizoszómákban halmozódik fel. A sejtfelszín, vagy a lizoszóma membrán változásai módosult felvételt eredményeznek, ezáltal a sejtek életképességének módosulása érzékelhető (BORENFREUND – PUERNER, 1985).

Az előző vizsgálattal ellentétes megfigyelésen alapul a neutrál vörös kibocsátásának mérése (Neutral Red Release, NRR). Alkalmas az azonnali toxicitás meghatározására, hiszen ilyenkor a sejtmembránok sérülése és a lizoszóma integritásának megbomlása történhet (BARSTADT et al., 1991).

A sejtalapú citotoxicitás tesztek utolsó képviselője a vörösvérsejt hemolízis vizsgálat (MUIR et al., 1983).

A Draize-teszt alternatívájaként használható eljárások következő csoportja a sejtfunkciókon alapuló technikák. Első képviselőjük a fluoreszcein festékszivárgás módszer (Fluorescein Leakage, FL). Normális esetben a szaruhártya áthatolhatatlan akadályt képez a veszélyes anyagokkal szemben, az irritáció akkor következik be, ha a szerkezete sérül. Ilyen esetben a fluoreszcein is képes átszivárogni az alkalmazott mesterséges szaruhártya modellen, az átjutó festék mennyisége detektálható (COOK et al., 1992).

A második módszer a csoporton belül a szilícium mikrofiziométer (SM). Ebben az esetben a sejtenyészet metabolikus aktivitását mérik, detektálják a metabolizmus következtében fellépő pH változásokat, mindaddig, amíg egy bizonyos vegyszer koncentrációnál a sejtek nem lesznek képesek a metabolizmusra (BRUNER et al., 1991).

A szemirritáció vizsgálatához használható egyéb eljárások:

A következő három vizsgálati módszer az előző csoportokba nem sorolható, külön említem meg a csigákon (pl. *Arion lusitanicus*) alkalmazható nyálkahártya irritációs tesztet. Az irritációs potenciál becsülhető a felszabaduló nyálkaanyagok mennyiségéből, illetve a károsodás révén

keletkező fehérjék (laktát-dehidrogenáz, LDH; alkalikus-foszfataz, ALP) arányából (ADRIAENS - REMON, 2002).

Az IRRITECTION® az EYTEX™ továbbfejlesztett változata, egy biokémiai vizsgálati készlet, amely felhasználja azt a feltevést, hogy a vegyi anyagok által okozott szemirritáció és a szaruhártya opacitás, bizonyos fehérjék denaturációjának eredménye. Egy speciális reagens képes utánozni az emberi szemben végbemenő változásokat (KELLY, 1989).

A pollentömlő növekedés (Pollen Tube Growth, PTG) vizsgálatban a pollentömlő tömegének növekedését fotometriásan mérik. Ezek a növényi sejtek nem fotoszintetizálnak, ezért az eljárás kimenetelét, a vegyszerek okozta gátló hatást nem befolyásolják a klorofillok és egyéb növényi pigmentek (KAPPLER - KRISTEN, 1988).

Az alternatív eljárások közé tartoznak a különböző szerkezet-aktivitási összefüggéseket felhasználó módszerek. Ilyenek pl. a klasszifikációs törekvések, amelyekben a vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságai alapján becsülhető a szemirritációs potenciáljuk (WORTH - CRONIN, 2000).

Az organotipikus módszereket, azaz pl. a chorioallantois membránt felhasználó eljárásokat a következő fejezetben részletesebben ismertetem.

Az engedélyező hatóságok által elfogadott alternatív szemirritációs vizsgálatok gyakorlati alkalmazása tették azt lehetővé, hogy az Egyesült Királyság területén az 1995-ben még közel kb. 4000 db Draize-tesztet végeztek, ezen vizsgálatok száma azonban 2003-ra mindössze 1100-ra csökkent (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2005).

2.3. A szemirritáció toxikológiai vizsgálata organotipikus módszerekkel

2.3.1 A chorioallantois membrán (CAM) kialakulása, szerkezete

Az organotipikus *in vitro* szemirritációs módszerek, így a tyúktojás chorioallantois membránját (HET-CAM) felhasználó vizsgálatok részletes bemutatása előtt, fontos a tyúk embrionális fejlődését röviden tárgyalnom.

A tyúkembrió keltetés alatti, azaz a korai embriófejlődés utáni, megtojást követő időszakot két részre oszthatjuk. A 8-9. napig tartó embrionális szakaszban a gyors, minőségi változások dominálnak, kialakulnak a szervek, végtagok, a 21. napig, tehát a kikelésig tartó magzati időszakban a mennyiségi fejlődés eredményeként a csirke felveszi végleges formáját.

A korai embriófejlődés első napján létrejön az *ektoderma*-lemezen kiemelkedő sejtvastagodás, az őcsík. A továbbiakban az *ektoderma* és az *entoderma* között kialakul a *mezoderma* alaprétege. Ezekből differenciálódnak a különböző szövetek és szervek.

A második napon kezdődik a szív és a véredények fejlődése. Kialakul a vérrendszer az embrióban, a szikben, majd továbbterjed a fehérjére is. A 42. órában megkezdődik a szívverés, ettől a pillanattól kezdve az embrió külön szervezetté válik, a szikkel a vérkeringése révén tartja fenn a kapcsolatot.

Harmadik nap jelennek meg az orr, a lábak, a szárnyak és a farok kezdeményei, az embrió elkezd forgását, a bal oldalára fordul.

A negyedik nap már minden testrész megjelenik, az ötödik nap a szaporítószervek differenciálódásának ideje, a szív még az embrió testén kívül található, de a többi szerv már a végleges helyén van.

A 6-9. nap között a szív a testbe záródik, az embrió a szik állományával a köldökön keresztül, vérkeringéssel tart kapcsolatot. Az embrió csibe formát vesz fel.

A 10. naptól kezdődik a csontosodás, a 13. napon megjelennek a pihetollak, a 19. naptól a szikzacskó fokozatosan behúzódik a testüregbe, a 20. naptól számítható a köldögzáródás.

A madárembrió nincs anatómiai kapcsolatban az anyai testtel, ezért anyagcseréjét az extraembrionális hárták segítségével folytatja. Ezek a hárták végleges formájukat a keltetés középső szakaszára érik el.

A sziktömlő olyan embrióon kívüli hártya, amely a szik anyagaival táplálja az embriót. Funkcióját már a 2. naptól megkezdí, az embrionális burkok közül elsőként alakul ki.

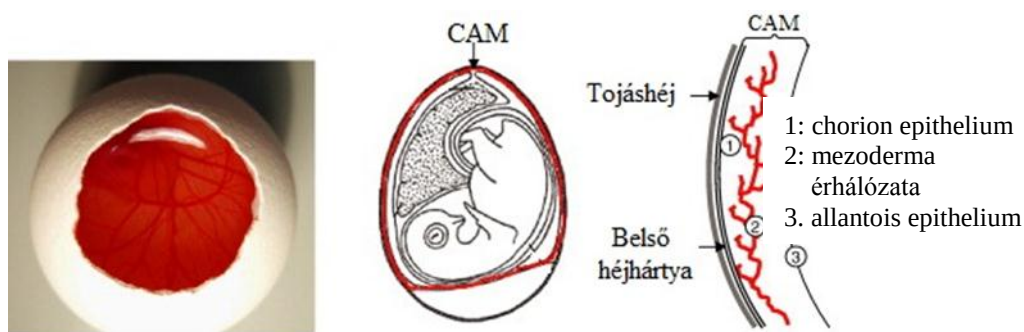
Az inkubáció 10-11. napja után a *chorioallantois* háromrétegű. A külső réteg a héjhártyával érintkező ektodermális eredetű hámréteg. A középső réteg embrionális kötőszövet, a *mesenchyma*. A belső réteg az entodermából származó allantois-hám.

Az *amnion* a 2-3. nap között alakul ki, majd közvetlenül fogja körül az embriót. A benne lévő folyadékban úszik az embrió, így védő és tápláló közegként funkcionál.

A *chorion* az *amnionnal* egy időben jön létre, valamennyi extraembrionális hártát körülveszi. A *chorion* alkotja az ektodermális eredetű külső, héjhártyával érintkező réteget. Kétrétegű hámja kötőhámsejtekből áll. A külső hámsejtréteg, lap vagy alacsony köbhámsejtekből épül fel. A belső - *mesenchyma* felőli - a réteg magas köbhámsejtekből áll. A kapillárisok mind a két hámréteg, mind a külső hámréteg és a héjhártya között megtalálhatók. Ez utóbbiak tág öblöket, *sinusokat* képeznek. A *chorion* az anyagcsere közvetítésében úgy vesz részt, hogy egyesül az *allantoisszal* és a belső héjhártyával, így kialakítja a chorioallantois membránt.

A *chorioallantois* (3. ábra) kialakulásakor a *somato-* és a *splanchnopleura* összeolvadásából fejlődik a *mesenchyma*-réteg, amely csillag alakú, hosszú, nyúlványos sejtekből áll. A *mesenchyma* héjhártya felőli rétegében szűk és vékonyfalú, az *allantois* közelében tágabb erek haladnak.

Az *allantois* központi fala szorosan az *amniarra* és a sziktömlőre fekszik, véredényekkel dúsan átszőtt, teljesen körülveszi a héjhártya mentén a tojás tartalmát. Az *allantois* részt vesz a fehérjék feltárában, a héj kalcium tartalmát eljuttatja az embrióba, a kiválasztásban, a vízháztartásban fontos szerepet tölt be, vérerei bonyolítják az embrió gázcseréjét. Az *allantois* egyrétegű laphámsejtekből áll. Az *allantois* hámsejteknek a tömlő ürege felé eső felületén rövid, vaskos nyúlványok, bolyhok és invaginációk találhatók (FÁNCSI - FEHÉR, 1978; ZOLTÁN, 1997).



3. ábra: A chorioallantois membrán (CAM) ábrázolása három nézőpontból

2.3.2 A tyúktojás chorioallantois membránjának felhasználása szemirritáció vizsgálatokhoz

A Chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) teszt célja, hogy előre jelezze a lehetséges szemirritációt a csirke embrió chorioallantois membránjának (CAM) károsodása alapján. Ehhez, az embrionális fejlődés 4. napján egy kis nyílást vágnak a tojás héján, majd egy kis mennyiségű albumin eltávolításával biztosítják a CAM optimális fejlődését. A 10. napon a vizsgálni kívánt anyagot közvetlenül a CAM-ra juttatják. Az érrendszeri elváltozások (vérzés, hyperaemia, vér nélküli erek) vizsgálhatók. Toxikológiai végpontnak tekinthető a tesztanyag azon koncentrációja, ami a kezelt tojások 50%-án okoz érrendszeri elváltozást (BAGLEY et al., 1989).

A második vizsgálat ebben a csoportban a Chorioallantoic membrane – tripán kék festés (CAM-TB). A teszt célja az volt, hogy csökkentsék a kémiai irritáció hatására a CAM károsodásának értékelésével járó szubjektivitást és az ezzel járó hibalehetőséget. Tették ezt azért, hogy a CAM által megkötött tripán kék festék mennyiségéből becsülték a membrán károsodását. Egyébként a tripán kék festés széles körben alkalmazott a sejtek életképességének, illetve a membránok károsodásának mérésére (HAGINO et al., 1999).

Saját vizsgálataimat a harmadik chorioallantois membránt felhasználó eljárással végeztem el. A HET-CAM (Hen's Egg Test on the Chorio-allantoic Membrane) tesztet LUEPKE 1987-ben fejlesztette ki, bár a virológusok régóta alkalmazzák embriótoxicitási vizsgálatokhoz (PARISH, 1985). A legtöbb tanulmány szoros korrelációt ír le a Draize-teszt és a HET-CAM teszt eredményei között, az enyhén- és az egyáltalán nem irritatív-, valamint a felületaktív- és felületaktív alapú vegyi anyagok esetében (ROUGIER et al., 1992; SPIELMANN, 1993). Bár a HET-CAM elvileg valamennyi vegyi anyagnál használható eljárás, a szilárd, színes és oldhatatlan vegyületek rontják az eredmények reprodukálhatóságát (SPIELMANN, 1993).

BLEIN és mtsai (1991) 40 vegyületet vizsgáltak, köztük oldószereket, savakat, bázisokat, felületaktív anyagokat, amelyek széleskörűen reprezentálták a szemirritáció különböző fokozatait és azt tapasztalták, hogy hígítatlanul a HET-CAM teszt túlbecsüli az irritációs potenciált, azonban 10-szeres hígítás mellett jó korrelációt találtak az *in vivo* Draize-teszt adataival.

BAGLEY és mtsai. (1992) háztartási vegyi anyagok szemirritációs tulajdonságait vizsgálták, öt különböző alternatív toxikológiai vizsgálat eredményeit hasonlították össze a hagyományos Draize-teszttel, és jó korrelációt tapasztaltak a HET-CAM teszt esetén ($r = 0,77$).

SILVA és mtsai. (1992) 60 vegyi anyag és 41 kozmetikum szemirritációs potenciálját vizsgálták *in vitro* HET-CAM vizsgálatokkal. 20 anyagot leöblítettek a CAM-ról, az elszíneződés okozta átlátszatlanság miatt. Az eredmények reprodukálhatóságát magasnak találták, az *in vivo* vizsgálatok eredményeivel jó korrelációt írtak le.

HAGINO és mtsai. (1993) megjegyezték, hogy a HET-CAM teszt alkalmas dózis-válasz összefüggések vizsgálatára. 12 különböző fizikai formájú vegyület esetén hasonlították össze az *in vivo* és *in vitro* eredményeket, és jó korrelációt tapasztaltak, abban az esetben is, ha az anyagokat oldhatóságuk szerint külön értékelték.

VINARDELL és MACIÁN (1994) 6 fertőtlenítőszer szemirritációs potenciálját vizsgálva ugyanolyan eredményt kaptak az *in vivo* és *in vitro* HET-CAM tesztekkel egyaránt.

BALLS és mtsai. (1995) 52 vegyi anyag (legkülönbözőbbek az alkoholoktól a felületaktív anyagokon át a peszticidekig) felhasználásával gyenge és közepes korrelációt találtak a HET-CAM *in vitro* és az *in vivo* eredmények között, függetlenül a felhasznált vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságaitól.

BRANTOM (1997) valamint STEILING és mtsai. (1999) 23 kozmetikai anyag és 32 kozmetikai készítmény esetén vizsgálták a HET-CAM teszt reprodukálhatóságát. Az erősen irritatív eredmények esetén jónak, azonban a közepesen irritatív eredményeknél már jóval gyengébb reprodukálhatóságot figyeltek meg.

BUDAI és mtsai. (1997), illetve BUDAI és VÁRNAGY (2000) 6 peszticiddel, három koncentrációban végeztek összehasonlító elemzést. Jó korreláció mutatkozott az *in vivo* eredményekkel.

GILLERON és mtsai. (1997) szintén 60 vegyületet elemeztek, melyből 28 folyadék, 20 szilárd és 12 felületaktív anyag volt. Az eredményeket összegezve, a HET-CAM teszt alacsony specifikitását, magas érzékenységet és közepes pontosságát értékelték.

BENDER és mtsai. (2011) gyógyászati készítmény gyulladáskeltő hatását kívánták jellemezni, és ehhez ideális módszernek tartották a tyúktojás chorioallantois membránjának kezelését, majd az elváltozások értékelését.

SCHEEL és mtsai. (2011) a HET-CAM teszt alkalmazhatóságának korlátait írták le, a nem irritatív anyagok meghatározására jó módszernek jellemezték. A nagyon irritatív vegyi anyagok esetében magas specifitást, de alacsony szenzitivitást tapasztalnak.

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK

3.1. A vizsgálatban felhasznált anyagok és módszerek

3.1.1 A tyúktojás chorioallantois membrán (HET-CAM) teszt

A vizsgálatokhoz a sármelléki Goldavis Kft. keltető üzeme által biztosított Shaver Farm tenyésztójasokat alkalmaztam. A Shaver Farm jó termékenységi mutatókkal rendelkezik, a tojások kelési aránya magas. A tojásokat Ragus inkubátorban, 37 °C hőmérsékleten, 60-70%-os relatív páratartalom mellett, a megfelelő fejlettségi állapot eléréséhez 10 napig keltettem. Az embrió letapadásának elkerülése érdekében a tojásokat 8 napig forgattam. A 9. napon, lámpázást követően a hibásakat eltávolítottam, és a tojást a tompa végével felfelé helyeztem vissza a keltetőbe, ami a CAM 10. napi hozzáférhetőségét segítette elő.

A módszert az Invitox Protocol 47. száma (1990) írja le. A CAM-on bekövetkező változások (4. ábra) (érlízis, vérzés, koaguláció) alapján az irritáció mértéke becsülhető, számítógépes program segítségével számszerűsíthető, és a kapott számszerű érték alapján irritációs kategóriába sorolható.

A kísérletekhez a következő eszközöket és vegyszereket használtam fel:

Eszközsükséglet:

- Ragus keltetőgép: optimális hőmérséklet 37,5 °C ($\pm 0,5$)
relatív páratartalom 62,5% ($\pm 7,5\%$),
- átvilágító lámpa,
- csipesz, olló,
- pipetták, szemcseppentők,
- stopperóra,
- számítógép megfelelő értékelő programmal.

Vegyszersükséglet:

- 0,9%-os NaCl,
- 1%-os SDS (Na-lauril szulfát),
- 0,1 M NaOH.

A HET-CAM vizsgálatokhoz szükséges tojásokat a keltetés 10. napján használtam fel. Ekkorra az embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránja már kifejlődött, kezelésre alkalmas. A CAM-on vérzés, véredény lízis vagy koaguláció figyelhető meg. Az elváltozásokat és azok időpontját (másodpercben) jegyzőkönyvben rögzítettem.

Az értékelés számítógépes program segítségével történt, a következő algoritmus alapján (1. egyenlet) (INVITTOX PROTOCOL 47, 1990):

$$RI = \frac{301 - \text{secH}}{300} \times 5 + \frac{301 - \text{secL}}{300} \times 7 + \frac{301 - \text{secC}}{300} \times 9$$

ahol H: vérzés, L: érlízis, C: koaguláció, RI: irritációs index, sec: indulási idő másodpercben

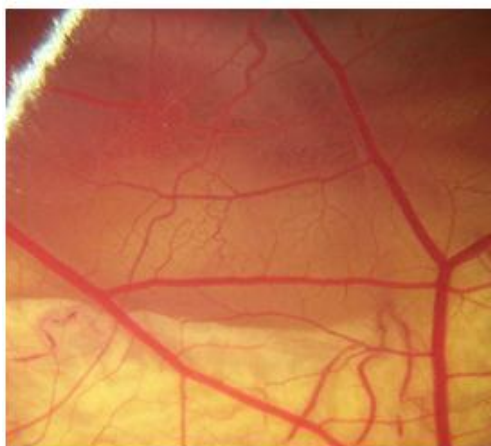
1. egyenlet: A HET-CAM teszt értékeléséhez felhasznált algoritmus

Az egyes vegyi anyagok vizsgálatából származó eredmények átlagát a képletbe helyettesítve, az irritációs indexeket meghatároztam. A számítógépes program algoritmus alapján kapott irritációs indexeket a 2. táblázat alapján irritációs kategóriákba soroltam.

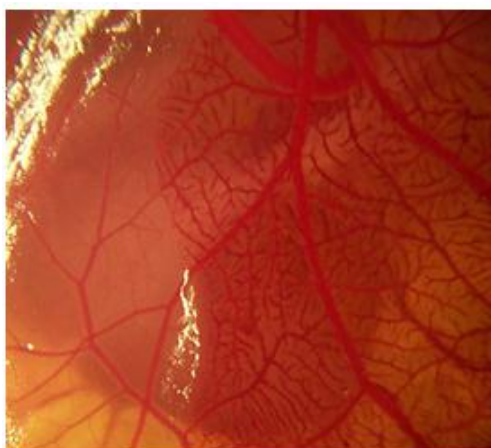
2. táblázat: Az irritációs indexekből képezhető kategóriák

Irritációs index	Irritációs kategória
0 – 0,9	Nem irritatív
1 – 4,9	Gyengén irritatív
5 – 8,9	Közepesen irritatív
9 - 21	Erősen irritatív

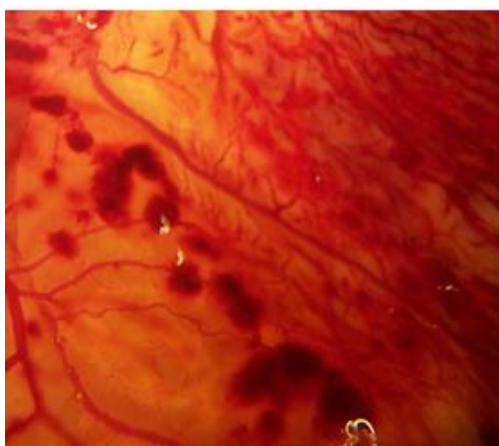
Az ép CAM



Véredény lízis a CAM-on



Vérzés a CAM-on



4. ábra: A chorioallantois membránon megfigyelhető elváltozások

3.1.2 A Draize-féle primer szemirritációs teszt

A Draize-féle primer bőr- és szemirritációs teszteket egyaránt nyúlön végzik. Az új-zélandi fehér nyúl középnagy testű fajta, szőre fehér, szemei pirosak. Kifejlett kori testtömege 4,5-5,5 kg. Fejlődése gyors, a takarmányhasznosítása kiváló, így 8 hetes korára elérheti az 1,8-2,0 kg-ot (Holdas, 1976). A klasszikus Draize-féle szemirritációs vizsgálatot az OECD 405-ös számú útmutatója (2002) alapján végeztem el. A kísérletben minden vegyi anyag esetén 2 új-zélandi fehér nyulat használtam fel. A nyulak bal oldali szemét kezeltem, a kezeletlen jobb oldali szem kontrollként szolgált, ezért kontroll csoport beállítása nem szükséges (önkontrollos teszt).

Az egyedileg elhelyezett állatok számára 22-25 °C-ot, 50-70 %-os relatív páratartalmat és napi 12 óra mesterséges megvilágítást biztosítottam. Takarmányként egységes nyúltápot és csapvizet kaptak *ad libitum*.

A kísérleti anyagot főzőpohárban készítettem elő, és szemcseppentővel az egyik szem kötőhártyaszákjába 0,1 ml vizsgálati anyagot helyeztem, majd a kezelést követő 1 óra, 1 nap, 2 nap, 3 nap és 7 nap után értékeltem a szem hártáin jelentkező elváltozásokat (DRAIZE és mtsai., 1944). A szem különböző hártáin jelentkező elváltozások a 3. táblázat alapján külön kerültek értékelésre.

3. táblázat: A Draize-féle értékelő pontozás

I. Kötőhártya (Conjunctiva)		(A+B+C) x 2 Max. 20 pont	
A. Vértbőség			
Az erek a normálist meghaladóan, határozottabban láthatók		Kifejezettebb, sötétebb, karmazsinvörös szín	Diffúz, sötétvörös
Pontok: 1		2	3
B. Duzzadás			
Enyhe duzzadás, beleértve a pislogóhártyát is	Szemhéjak részleges kifordulásával	Félig zárt, duzzadt szemhéjak	Teljesen zárt, duzzadt szemhéjak
1	2	3	4
C. Váladékképződés			
Normálist meghaladó mennyiség	A szemhéjak széle nedves		A szemhéjak környéke is nedves
1	2		3

3. táblázat folytatása:

II. Szaruhártya (Cornea)		(A+B) x 5 Max. 80 pont	
A. Homály mértéke			
Elszórt, diffúz homály, a szivárványhártya világosan látható	A homályban átlátszó területek, a szivárványhártya részletei csak homályosan láthatók	Opálos homály, a szivárványhártya részletei nem láthatók	Intenzív opálos, a szivárványhártya láthatatlan
1	2	3	4
B. Homály területe			
1/4 rész vagy kisebb	2/4 résznél kisebb, de 1/4 résznél nagyobb	3/4 résznél kisebb, de 1/2 résznél nagyobb	Teljes felszín, 3/4 résznél nagyobb
1	2	3	4
III. Szivárványhártya (Iris)	A x 5 Max. 10 pont		
A. Elváltozások			
Vérbő, redőzöttebb írisz, szaruhártya belövellt, az írisz fényre még enyhén reagál		Vérzés, fényre nem reagál	
1		2	

Az elváltozásokhoz értékelő pontokat rendeltem, majd ezeket összesítve, KAY és CALANDRA (1962) módszere alapján (Maximum Mean Total Score, MMTS) határoztam meg az irritációs indexet (4. táblázat).

4. táblázat: Maximum Mean Total Score (MMTS)

Maximum átlag pontszám	Csoport átlag pontszám	Tünetek fennállása	Osztályozás
0,0-0,5	24 óránál = 0		Nem irritatív (1)
	24 óránál > 0		Gyakorlatilag nem irritatív (2)
0,5-2,5	24 óránál = 0		Gyakorlatilag nem irritatív (2)
	24 óránál > 0		Minimálisan irritatív (3)
2,5-15	48 óránál = 0		Minimálisan irritatív (3)
	48 óránál > 0		Enyhén irritatív (4)
15-25	72 óránál = 0		Enyhén irritatív (4)
	72 óránál > 0		Közepesen irritatív (5)
25-50	7 napon ≤ 20	Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon ≤ 10	Közepesen irritatív (5)
		Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon $10 <$ de egy esetben sem > 30	Közepesen irritatív (5)
	7 napon ≥ 20	Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon $10 <$ és $30 <$ is lehet	Erősen irritatív (6)
	7 napon > 20		Erősen irritatív (6)
50-80		Az egyedi pontszámok több, mint a fele a 7. napon ≤ 30	Erősen irritatív (6)
	7 napon ≤ 40	Az egyedi pontszámok több, mint a fele a 7. napon > 30 de egy esetben sem > 60	Erősen irritatív (6)
		Az egyedi pontszámok több, mint a fele a 7. napon > 30 és > 60 is lehet	Nagyon erősen irritatív (7)
	7 napon > 40		Nagyon erősen irritatív (7)

4. táblázat folytatása:

Maximum átlag pontszám	Csoport átlag pontszám	Tünetek fennállása	Osztályozás
80-100		Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon ≤ 60	Nagyon erősen irritatív (7)
	7 napon ≤ 80	Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon > 60 de egy esetben sem > 100	Nagyon erősen irritatív (7)
		Az egyedi pontszámok több, mint fele a 7. napon > 60 és > 100 is lehet	Extrém irritatív (8)
	7 napon > 80		Extrém irritatív (8)
100-110	7 napon ≤ 80		Nagyon erősen irritatív (7)
	7 napon > 80		Extrém irritatív (8)

3.1.3 A vizsgálatban alkalmazott biocid termékek jellemzése

A kísérletben felhasznált valamennyi biocid rovarirtó szer (inszekticid) (5. táblázat). A kísérleti anyagokat a HET-CAM és Draize-féle szemirritációs tesztekben 100 %-os töménységben alkalmaztam.

5. táblázat: A vizsgálatban felhasznált biocid termékek

Tesztanyag	Hatóanyag	LD ₅₀ mg/ttkg	Irritáció (szem)
DIAZIPOL G	diazinon cipermetrin	n. a.	n. a.
PESGUARD B	d-tetrametrin cifenotrin	orális patkány: 1550	irritatív
PESTSTOP-B 10 EC	d-tetrametrin	orális patkány: > 5000	enyhén irritatív

n.a.: biztonsági adatlapban nem szereplő toxikológiai adatok

A DIAZIPOL G 5 % cipermetrin- és 7,5 % diazinon hatóanyagot tartalmazó II. forgalmazási kategóriába tartozó biocid termék, rovarirtó koncentrátum. Felhasználható legyek (házi légy (*Musca domestica*), szuronyos istállólegy (*Stomoxys calcitrans*), élelmiszerlátogató legyek (*Drosophilidae* sp., *Sarcophagidae* sp., *Calliphoridae* sp.), illetve rejtett életmódú rovarok: német csótány (*Blattella germanica*), ágyi poloska (*Cimex lectularius*), bolha fajok (*Pulicidae* sp.), ezüstös pikkelyke (*Lepisma saccharina*), hangya fajok (*Formicidae* sp.) elleni védekezéshez. Az irtószer biztonsági adatlapjában nem szerepelnek a termék konkrét toxikológiai paraméterei. Fizikai-kémiai tulajdonságait a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A DIAZIPOL G rovarirtó koncentrátum fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	flyékony
Szín:	átlátszó, sárga
Szag:	termekre jellemző, szúrós
pH:	< 6,5 (1 %-os oldat)
Lobbanáspont:	46 °C
Oldhatóság:	szerves oldószerekben jól oldódik, vízzel emulziót képez
Viszkozitás:	10,5 cps (Brookfield)
Sűrűség 20°C-on:	0,920 g/cm ³

A PESGUARD B 4 % d-tetrametrin- és 12 % cifenotrin hatóanyagot tartalmazó II. forgalmazási kategóriába tartozó biocid termék, rovarirtó koncentrátum. Felhasználható rejtett életmódú rovarok (csótány fajok (*Blattoidea sp.*), ágyi poloska (*Cimex lectularius*), bolha fajok (*Pulicidae sp.*), ezüstös pikkelyke (*Lepisma saccharina*, hangya fajok (*Formicidae sp.*) elleni védekezéshez. Fizikai-kémiai tulajdonságait a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A PESGUARD B rovarirtó koncentrátum fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	flyékony
Szín:	sárgás
Szag:	jellegzetes
pH:	4,65
Lobbanáspont:	71 °C
Fagyáspont:	< -5 °C
Sűrűség 20 °C-on	0,903 g/cm ³

A PESTSTOP-B 10 EC 10 % d-tetrametrin hatóanyagot tartalmazó II. forgalmazási kategóriába tartozó biocid termék, rovarirtószer. Felhasználható rejtett életmódú rovarok (ágyi poloska (*Cimex lectularius*), csótány fajok (*Blattoidea sp.*) elleni védekezés hatékonyságának növelésére (kiűző hatás), illetve házi légy (*Musca domestica*) irtására. Fizikai-kémiai tulajdonságait a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: A PESTSTOP-B 10 EC rovarirtószer fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	flyadék
Szín:	halványsárga
pH:	6,4
Vízben való oldhatóság:	emulziót képez
Sűrűség 20 °C-on:	0,820 g/cm ³

3.2. A vizsgálatok eredményei és értékelésük

3.2.1 A HET-CAM tesztből származó eredmények

A biocid készítményeket közvetlenül a tyúktojás chorioallantois membránjára csöppentettem, a kezelés után a megfigyelt tünetek (vérzés, véredény lízis) megjelenésének időpontjait feljegyeztem. A számítógépes algoritmus segítségével a megfigyelt tünetekből és azok megjelenésének időpontjából irritációs indexet számoltam.

DIAZIPOL G – Közepesen irritatív

A kezelést követően a chorioallantois membránon 25–30 másodpercen belül lízist figyeltem meg a kapillárisokon, vérzés nem jelentkezett az 5 perces megfigyelési időn belül. A számítógépes program által számított értékek alapján a vizsgálati anyag irritációs indexe 6,38.

PESGUARD B – Erősen irritatív

A chorioallantois membránon 22-32 másodpercen belül lízist figyeltem meg a kezelést követően. Vérzés a megfigyelési idő 75. és 105. másodperce között jelentkezett. A számítógépes program által számított értékek alapján a tesztanyag irritációs indexe 9,91.

PESTSTOP-B 10 EC – Közepesen irritatív

A kezelés után a chorioallantois membránon 48–54 másodpercen belül véredénylízist, 115-120 másodpercen belül vérzést tapasztaltam. A számítógépes program által számított értékek alapján a vizsgálati anyag irritációs indexe 8,89.

3.2.2 A Draize-féle szemirritációs tesztből származó eredmények

DIAZIPOL G – (5) Közepesen irritatív

A kezelés után kialakult erős kötőhártya tünetek a 4. napi megfigyelésig voltak jellemzőek, az egy hetes megfigyeléskor már csak enyhe formában jelentkeztek. A szaruhártya tünetek azonban 96 órán belül regenerálódtak. A legerősebb tüneteket (Maximum Mean Total Score = 33) a kezelés után 48 órával figyeltem meg.

PESGUARD B – (5) Közepesen irritatív

Közepes tüneteket (vérbőség, duzzanat, váladékkozás) figyeltem meg a kötőhártyán. A szaruhártyán és az íriszen tünet nem jelentkezett. Egy hét alatt az állatok tünetmentesek voltak. A legerősebb tüneteket (Maximum Mean Total Score = 16) a kezelés után 1 órával figyeltem meg.

PESTSTOP-B 10 EC – (5) Közepesen irritatív

A kezelés után kialakult erős kötőhártya tünetek a 3. napi megfigyelésig voltak jellemzőek, a 4. napi megfigyelés alkalmával már csak enyhe formában jelentkeztek. A 2. napon enyhe szaruhártyahomályt figyeltem meg. A szaruhártyán megjelent elváltozások a 7. napon már nem voltak láthatók. A 7. napon minden állat tünetmentes volt. A legerősebb tüneteket (Maximum Mean Total Score = 25) a kezelés után 48 órával figyeltem meg.

3.2.3 Az *in vivo* és az *in vitro* eredmények összehasonlítása

A biocid készítményekkel folytatott irritációs vizsgálatok eredményeit a 9. táblázat tartalmazza. A kísérleteim során alkalmazott 3 biocid irtószer közül a DIAZIPOL G és a PESTSTOP-B 10 EC esetében megegyezett az *in vitro* HET-CAM tesztből és az *in vivo* Draize-tesztből kapott eredmény. A PESTGUARD B készítménynél az *in vitro* teszt során erősebb irritáció mutatkozott, mint az *in vivo* Draize vizsgálat során.

9. táblázat: A Draize-teszt és a HET-CAM teszt eredményeinek összehasonlítása

Vizsgálati anyag	Eredmény a Draize-tesztből	Eredmény a HET-CAM tesztből
DIAZIPOL-G	Közepesen irritatív	Közepesen irritatív
PESGUARD B	Közepesen irritatív	Erősen irritatív
PESTSOP-B 10 EC	Közepesen irritatív	Közepesen irritatív

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A primer szemirritáció vizsgálatára javasolt perspektivikus alternatív módszerek közé tartoznak a tyúktójs chorioallantois membránját (CAM) használó *in vitro* kísérleti módszerek, köztük a HET-CAM teszt. A HET-CAM teszt megfelel az *in vitro* módszerekkel szemben általánosan támasztott követelményeknek. Olcsóbb és gyorsabb, mint a hagyományos Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat, az eredményei jól reprodukálhatóak, az érzékenysége pedig kiemelkedő. A vizsgálatban tesztobjektumként tyúktójszt használ, ezáltal a szemirritációs kísérletekben felhasznált emlősállatok száma jelentősen csökkenthető. A módszer széleskörű elterjedése az emlősállatok mellőzését is maga után vonhatná a kísérleti toxikológia ezen területén.

Hátránya azonban a kiértékelés szubjektív természete, valamint a tény, hogy a vizsgálati anyagok bizonyos fizikai és kémiai tulajdonságai nehezítik a teszt alkalmazását és csökkenthetik az eredmények megbízhatóságát (pl. szilárd és színes vegyi anyagok vizsgálata).

Az általam biocid készítményekkel elvégzett *in vivo* és *in vitro* kísérletek eredményeinek összehasonlítása és a nemzetközi szakirodalomban található más típusú vegyi anyagokon végzett vizsgálatok hasonló jellegű eredményei alapján a HET-CAM teszt elővizsgálati módszerként javasolható biocid készítmények szemirritációs tulajdonságainak vizsgálatára. Így a HET-CAM teszt alkalmazása csökkentheti a felhasznált emlős kísérleti állatok számát. Célszerű lenne a vizsgálatokat további biocid készítmények tesztelésével kibővíteni, hiszen a Draize-teszt esetleges kiváltására vonatkozó javaslatok csak nagyszámú összehasonlító adatbázis alapján lehetnek megalapozottak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az egészségügyi kártevők irtására felhasználható irtószerek (biocid készítmények) pontos toxikológiai minősítése rendkívül fontos feladat, hiszen azokat az ember közvetlen lakó- és munkakörnyezetében használják fel, ezen felül egészségügyi intézményekben, akár legyengült szervezetű betegek közelében.

A biocid termékek engedélyezéshez szükséges toxikológiai vizsgálatok kivitelezése a 440/2008/EK irányelv alapján többségében *in vivo* metodikán alapszik, állatkísérletekre támaszkodik. Az irányelv alapján a bőr- és szemirritációs valamint a bőr- és szemkorróziós vizsgálatokban preferált állatfaj az albínó nyúl. Az általánosan elfogadott vizsgálatot DRAIZE és munkatársai fejlesztették ki 1944-ben.

Az évek során igyekeztek kifejleszteni olyan eljárásokat, amelyek csökkentik a kísérletekben felhasznált állatok szenvedését és azok létszámát. Az OECD TG 405 (2002) elnevezésű a vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó útmutató már tartalmaz egy kiegészítést, melyben az *in vivo* Draize-teszt csak utolsó mozzanatként szerepel, ha a jóváhagyott *in vitro* módszerek negatív eredményt adnak a mérsékelt vagy gyengén irritáló vegyületek esetében.

Ilyen *in vitro* alkalmazható eljárások közé tartoznak a tyúktojás chorioallantois membránját (HET-CAM) felhasználó tesztek, hiszen általuk megfelelően modellezhetők a különböző vegyi anyagoknak a szem kötőhártyájára gyakorolt károsító hatásai.

Vizsgálatomban biocid termék irtószerek irritatív hatását vizsgáltam az *in vitro* HET-CAM teszttel, a vegyi anyagot közvetlenül a chorioallantois membránra helyezve, az érrendszer károsodásából határoztam meg a biocid termékek irritációs potenciálját. Az *in vitro* irritációs indexeket összehasonlítottam az *in vivo* eredményekkel.

A kísérleti eredményeim alapján elmondható, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jól használható biocid termékek irritatív hatásainak vizsgálatára. Az *in vitro* eredmények kellően jó korrelációt mutatnak a hagyományos Draize-teszt eredményeivel, így elővizsgálatnak ideális módszer lehet a biocid termékek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatokban.

6. IRODALOMJEGYZÉK

ADRIAENS, E. – REMON, J.P. /2002/: The evaluation of an alternative mucosal irritation test using slugs. *Journal of Applied Toxicology and Pharmacology*. 182. 169-175.p.

BAGLEY, D. – BRUNER, L. – SILVA, O. – COTTIN, M. - O'BRIEN, K. – UTTLEY, M. – WALKER, A.P. /1992/: An evaluation of five potential alternatives in vitro to the rabbit eye irritation test in vivo. *Toxicology in Vitro*. 6. 275-284.p.

BAGLEY, D.M. – KONG, B.M. – DESALVA, S.J. /1989/: Assessing the eye irritation potential of surfactant-based materials using the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA). *In: Goldberg, A.M. (szerk.): Alternative methods in toxicology series - Symposium on in vitro toxicology: new directions*. Mary Ann Liebert, Inc., New York. 265-272.p.

BALLS, M. – BOTHAM, P. – BRUNER, L. – SPIELMANN, H. /1995/: The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro*. 9. 871-929.p.

BARRATT, M.D. - BRANTOM, P.G. - FENTEM, J.H. - GERNER, I. - WALKER, A.P. - WORTH, A.P. /1998/: The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. *Toxicology in vitro* 12, 471–482. p.

BARSTADT, R. – CORTESI, J. – JANUS, J. /1991/: Use of Clonetics neutral red bioassay to optimize components of serumfree medium for normal human anchorage-dependent cells.; *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 27. 160. p.

BENDER, C. - PARTECKE, L.I. – KINDEL, E. - DÖRING, F. - LADEMANN, J. - HEIDECKE, C.D. - KRAMER, A. - HÜBNER N.O. /2011/: The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicology in Vitro*. 25. 530–537.p.

BLAZKA, M. - HARBELL, J.W. - KLAUSNER, M. - MERRILL, J.C. - KUBILUS, J. – KLOSS, C. - BAGLEY, D.M. /2003/: Evaluating the ocular irritation potential of 54 test articles using the EpiOcular human tissue construct model (OCL-200). *The Toxicologist* 72. 221. p.

BLEIN, O. – ADOLPHE, M. – LAKHDAR, B. – CAMBAR, J. – GUBANSKI, G. – CASTELLI, D. – CONTIE, C. – HUBERT, F. – LATRILLE, F. – MASSON, P. – CLOUZEAU, J. – LEBIGOT, J.F. – SILVA, O. – DOSSOU, K.G. /1991/: Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test (Opal Project). *Toxicology in Vitro*. 5. 555-557.p.

BORENFREUND, E. – PUERNER, J.A. /1985/: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 24. 119-124. p.

BRANTOM, P. – BRUNER, L. – CHAMBERLAIN, M. - SILVA, O. - DUPUIS, J. - EARL, L. - LOVELL, DP. - PAPE, W.J.W. - UTTLEY, M. – BAGLEY, D.M. – BAKER, F.W. – BRACHER, M. – COURTELLEMONT, P. – DECLERCQ, L. – FREEMAN, S. - STEILING, W. - WALKER, A.P. - CARR, G.J. - DAMI, N. – THOMAS, G. – HARBELL, J. - JONES P.A. – PFANNENBECKER, U. - SOUTHEE, J.A. - TCHENG, M. - ARGEMBEAUX, H. – CASTELLI, D. – CLOTHIER, R. – ESDAILE, D.J. – ITIGAKI, H. – JUNG, K. - KASAI, Y. - KOJIMA, H. - KRISTEN, U. - LARNICOL, M. - LEWIS, R.W. - MARENUS, K. - MORENO, O. - PETERSON, A. - RASMUSSEN, E.S. - ROBLES, C. - STERN, M. /1997/: A summary report of the COLIPA International validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 11. 141-179.p.

BRUNER, L.H. – MILLER, K.R. – OWICKI, J.C. – PARCE, J.W. – MUIR, V.C. /1991/: Testing ocular irritancy in vitro with the silicon microphysiometer. *Toxicology in vitro*. 5. 277-284.p.

BUDAI P. - VÁRNAGY L. - SOMLYAY I. - VARGA T. /1997/: Ocular irritation study of some pesticides in HET-CAM test. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische* 62. 265-268.p.

BUDAI P. - VÁRNAGY L. /2000/: In vitro ocular irritation toxicity study of some pesticides. *Acta Veterinaria Hungarica*. 48. 221-228.p.

COOK, J. – GABRIELS, J. – PATRONE, L. – RHOADS, L. – BUSKIRK, R.G. /1992/: A human epidermal model that can be used in an automated multiple endpoint assay. *Alternatives to laboratory animals*. 20. 313-324. p.

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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 82. 377–390. p.

ERDŐS GY. – SZLOBODNYIK J. /2004/: Toxikológia (Munka és környezetvédelem). Magyar Kártevőirtók Országos Szövetsége, Budapest.

ERDŐS GY. – SZLOBODNYIK J. /2005/: Az irtószerek hatóanyagainak reális toxikológiai megítélése. Magyar Kártevőirtók Országos Szövetsége XV. Országos Konferencia, Szeged.

ERDŐS GY. – SZLOBODNYIK J. /2006/: Az irtószerek (biocid termékek) engedélyezésének múltja és jelene. Kártevőirtás. 2.

FEHÉR GY. /1989/: Háziállatok tájanatómiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

FENTEM, J.H. - ARCHER, G.E.B. - BALLS, M. - BOTHAM, P.A. - CURREN, R.D. - EARL, L.K. - ESDAILE, D.J. - HOLZHUTTER, H.G. - LIEBSCH, M. /1998/: The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. Toxicology in vitro. 12. 483–524.

GAUTHERON, P. - DUKIC, M. - ALIX, D. - SINA, J.F. /1992/: Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. Fundamental and Applied Toxicology. 18. 442-449. p.

GILLERON, L. – COECKE, S. – SYSMANS, M. – HANSEN, E. – OPROY, S. – MARZIN, D. – CAUTEREN, H. – VANPARYS, P. /1997/: Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the Draize eye irritation test. Toxicology in Vitro. 11. 641-644.p.

HAGINO, S. – ITAGAKI, H. – KATO, S. – KOBAYASHI, T. /1993/: Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. Toxicology in Vitro. 7. 35-39.p.

HAGINO, S. – KINOSHITA, S. – TANI, N. – NAKAMURA, T. – ONO, N. – KONISHI, K. – IIMURA, H. – KOJIMA, H. – OHNO, Y. /1999/: Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. Toxicology in vitro. 13(1); 99-113.p.

HOLDAS, S. /1976/: Házinyúltenyésztés. In: Horn, A. (szerk.). Állattenyésztés. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1976. 343.p.

HUHTALA, A. - SALMINEN, L. - TÄHTI, H. - UUSITALO, H. /2008/: Corneal Models for the Toxicity Testing of Drugs and Drug Releasing Materials. Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices, Ed. N Ashammakhi

Invitox Protocol Number 47. HET-CAM test 1990.

KAHN, C.R. – YOUNG, E. – LEE, I.H. – RHIM, J.S. /1993/: Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 34. 3429-3441. p.

KANDÁROVÁ, H. - LETAŠIOVÁ, S. /2011/: Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*. 4. 107–113. p.

KAPPLER, R. – KRISTEN, U. /1988/: Photometric quantification of water-insoluble polysaccharides produced by in vitro grown pollen tubes.; *Environmental and Experimental Botany*. 28(1). 33-36.p.

KAY, J.H. - CALANDRA, J.C. /1962/: Interpretation of eye irritation tests. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 13. 281-289.p.

KELLY, C.P. /1989/: EYTEX: an in vitro method of predicting ocular safety.; *Pharmacopeial Forum*. 15. 4815- 5824. p.

KISS I. /1997/: Szervek és szervrendszerek toxikológiája. *In: Kiss István. (szerk.): Toxikológia. Veszprémi Egyetemi Kiadó. Veszprém, 1997. 54-55.p.*

LUEPKE, N.P. – WALLAT, S. /1987/: HET-CAM - reproducibility studies. *In: Goldberg A.M. (szerk.): Alternative methods in toxicology. Mary Ann Liebert, Inc., New York. 353-363.p.*

MUIR, C.K. – FLOWER, C. - ABB, N.J. /1983/: A novel approach to the search for in vitro alternatives to in vivo eye irritancy testing. *Toxicology Letters*. 18. 1-5. p.

NGUYEN, D.H. – BEUERMAN, R.W. - DE WEVER, B. – ROSDY, M. /2003/: Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. *In: Salem, H. – Katz, S.A.A. (szerk.) Alternative Methods for the New Millenium. CRC Press, Boca Raton, USA. 145-157. p.*

NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS /2005/: The Ethics of Research Involving Animals. Nuffield Council on Bioethics, London.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) /2006/: Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Eye Irritation/Corrosion.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) /2006/: Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) /2009/: Test Guideline 437. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) /2009/: Test Guideline 438. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Adopted 08th September 2009.

OKBI (Országos Kémiai Biztonsági Intézet) /2008/: REACH - toxikológiai információk. In vitro módszerek.

PARISH, W. /1985/: Ability of in vitro (corneal injury-eye organ-and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. Food and Chemical Toxicology. 23. 215-227.p.

PRINSEN, M.K – KOETER, H.B.W.M. /1993: Justification of the Enucleated Eye Test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize Eye Irritation Test with rabbits. Food and Chemical Toxicology. 31/1. 69-76. p.

ROUGIER, A. – SILVA, O. - DOSSOU, K.G. /1992/: The HET-CAM test: a study of the irritation potential of chemicals and formulations. Alternatives to laboratory animals, ATLA. 20. 432-437.p.

RUSSELL, W. M. S. – BURCH, R. L. /1959/: The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen and Co., London. 238pp.

SCHEEL, J. – KLEBER, M. – KREUTZ, J. – LEHRINGER, E. – MEHLING, A. – REISINGER, K. - STEILING, W. /2011/: Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). Regulatory Toxicology and Pharmacology. 59. 471–492.p.

SILVA, O. – ROUGIER, A. – DOSSOU, K. - /1992/: The HET-CAM Test: A study of the irritation potential of chemicals and formulations. ATLA. 20. 432-437.p.

SPIELMANN, H. – KALWEIT, S. – LIEBSCH, M. – WIRNSBERGER, T. – GERNER, I. - BERTRAM-NEISS, E. – KRAUSER, K. – KREILING, R. – MILTENBURGER, H.G. – PAPE, W.

– STEILING, W. /1993/: Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals.; Toxicology in vitro; 7(4); 505-510.p.

SPIELMANN, H. /1997/: Ocular irritation. *In*: CASTELL - GOMEZ-LECHON (szerk.) In vitro methods in pharmaceutical research. Academic Press, London. 265-287. p.

SZENTÁGOTHAJ J. – RÉTHELYI M. /1985/: Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó, Budapest.

VINARDELL, M. – MACIÁN, M. /1994/: Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. Toxicology in Vitro. 8. 467-470.p.

WHITTLE, E. – BASKETTER, D. – YORK, M. – KELLY, L. – MCCALL, J. – BOTHAM, P. – ESDAILE, D. – GARDNER, J. /1992/: Findings of an interlaboratory trial of the enucleated eye method as an alternative eye irritation test. Toxicology Methods; 2. 30-41.p.

WILKIE, D.A. – WYMAN, M. /1991/: Comparative anatomy and physiology of the mammalian eye. *In*: Hobson, D.W. (szerk.) Dermal and Ocular Toxicology, Fundamentals and Methods. CRC Press, Inc., Boca Raton. 433-491.p.

WORTH, A.P. - CRONIN, M.T.D. /2000/: Embedded cluster modelling: a novel QSAR method for generating elliptic models of biological activity. *In*: Balls, M. - van Zeller, A.M.- Halder, M.E. (szerk.) Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Elsevier Science, Amsterdam. 479-491.p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Dr. Budai Péternek a dolgozat elkészítéséhez nyújtott segítségért. Kormos Évának, valamint Tarsoly Gábornénak a vizsgálatok elvégzésében nyújtott önzetlen támogatásért és nem utolsósorban Bődy Bernadettnek, aki a végső simításokban is nélkülözhetetlennek bizonyult.