



**XXXII. Országos Tudományos
Diákköri Konferencia**



**BIOCID KÉSZÍTMÉNYEK SZEMIRRITATÍV HATÁSAINAK
VIZSGÁLATA *IN VITRO* MÓDSZEREKKEL**

Pályázó neve, évfolyama: Somody Gergő Lajos, Növényorvos MSc. II. évf.

Témavezető neve, beosztása: Dr. Budai Péter, egyetemi docens

Kar / Intézet / Tanszék: Pannon Egyetem, Georgikon Kar, 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.	Izolált szerveken történő szemirritációs vizsgálatok	16
3.	SAJÁT VIZSGÁLATOK.....	18
3.1.	A vizsgálatban felhasznált anyagok és módszerek.....	18
3.1.1	Az izolált csirkeszemen (ICE) végrehajtott szemirritációs teszt.....	18
3.1.2	A vizsgálatban alkalmazott anyagok jellemzése	27
3.2.	A vizsgálatok eredményei és értékelésük	30
3.2.1	Az izolált csirkeszemeken történő szemirritációs tesztből származó eredmények	30
3.2.2	Az <i>in vivo</i> és az <i>in vitro</i> eredmények összehasonlítása	33
4.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	35
5.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	37
6.	IRODALOMJEGYZÉK.....	38

1. BEVEZETÉS

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

Mahatma Gandhi

A kártékony szervezet kémiai vagy biológiai eszközökkel történő elpusztítására, ártalmatlanná tételére, tevékenységében való megakadályozására, elrettentésére vagy más módon történő korlátozására alkalmas szerformák (biocid termékek) pontos toxikológiai minősítése rendkívül fontos feladat, hiszen a termék potenciális veszélyeiről csak így kaphatunk teljes képet.

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 szemkorróziós 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 vizsgálatára vonatkozó útmutató már tartalmaz egy kiegészítést, melyben az *in vitro* tesztekkel kapott eredmények elfogadhatók, amennyiben szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt jeleznek. Ilyen *in vitro* alkalmazható eljárások közé tartoznak az izolált szerveken végrehajtott tesztek.

Vizsgálatomban biocid termékek szemirritatív hatását vizsgáltam az izolált csirkeszemen alapuló *in vitro* eljárással (ICE teszt), a vegyi anyagot közvetlenül a csirkeszem szaruhártyájára helyezve, a tapasztalt elváltozásokból (szaruhártya duzzadás és homály, fluoreszcein megtartás, egyéb megfigyelések) határoztam meg a biocid termékek irritációs potenciálját. Az *in vitro* irritációs indexeket összehasonlítottam a termék gyártója által közölt, biztonsági adatlapon szereplő irritációs kategóriával.

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 bemutattva) használható-e az izolált csirkeszemen alapuló eljárás a biocid termékek irritációs potenciáljának meghatározására.

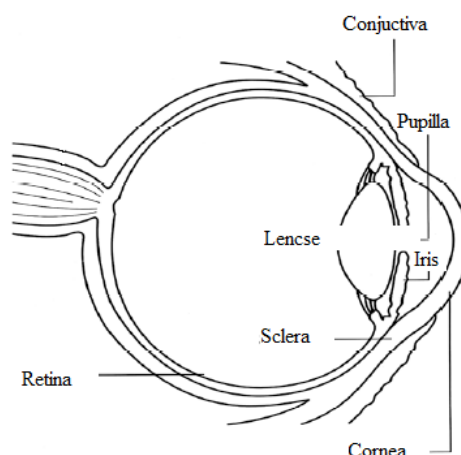
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

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 foto-receptorokat 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).

A madarak szemgolyóját, mely a szaruhártya nagyobb domborulata miatt tompa kúphoz hasonlít, a nagyobb alsó és a kisebb felső szemhéj, valamint a harmadik szemhéj, a pislogóhártya védi, melynek könnymirigye erősen fejlett. A pillaszőrök hiányoznak, helyettük a szemhéj szélén finom tollacskák találhatók (MÉSZÁROS, 1976).

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	Termékcsoportok
1. Fertőtlenítőszer és általánosan használt biocid termékek	1. Humán egészségügyi biocid termékek
	2. Fertőtlenítőszer és egyéb biocid termékek
	3. Állat-egészségügyi biocid termékek
	4. Élelmiszer és takarmány fertőtlenítő szerek
	5. Ivóvíz fertőtlenítő szerek
2. Tartósítószer	6. Tartósítószer tartályban forgalomba hozott készítményekre.
	7. Bevonatvédő szerek
	8. Faanyagvédő szerek
	9. Rost, bőr, gumi és polimerizált anyagok konzerválószer
	10. Falazási anyagok konzerválószer
	11. Konzerválószer hűtőfolyadékokhoz és technológiai eljárásokhoz
	12. Nyálkásodásgátló szerek
	13. Fémmegmunkáló folyadékok tartósítószer
3. Károsító 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 szavató 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%), kutyákat (1%) és nagyon ritkán főemlősöket (> 1%) használnak fel (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2005).

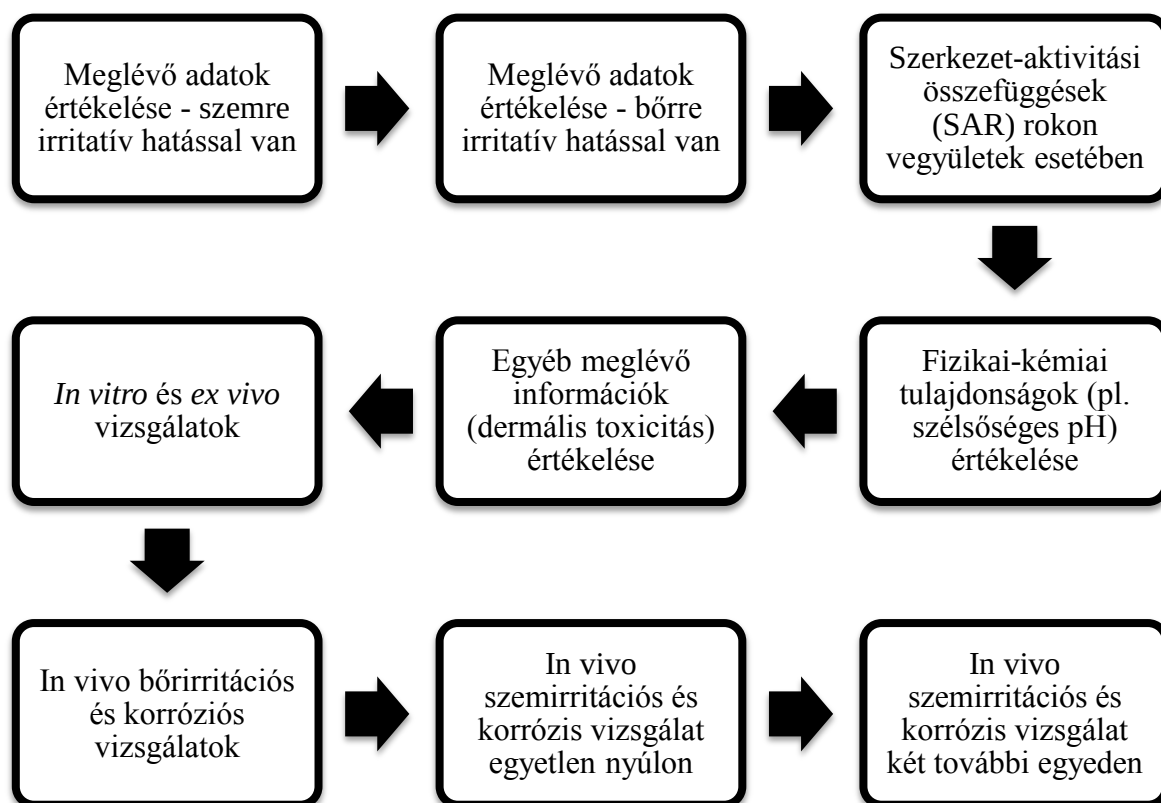
2.2.1 A hagyományos és az alternatív akut szemirritációs vizsgálatok

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 nyúlszem 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 transzkután 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 sejtéletképességet 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).

Az emberi szaruhártya hámszövetének modellezésén alapuló szemirritációs vizsgálatok:

Az emberi szem szaruhártyájának hámszövetét (*epithelium*) modellező vizsgálatok közé tartozik az EpiOcular™ 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).

A szemirritáció toxikológiai vizsgálata organotipikus módszerekkel:

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).

A harmadik chorioallantois membránt felhasználó eljárás a HET-CAM (Hen's Egg Test on the Chorio-allantoic Membrane) teszt, amelyet LUEPKE 1987-ben fejlesztett 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 specifitását, magas érzékenységet és közepes pontosságát értékelték.

BENDER és mtsai. (2011) gyógyászati készítmény gyulladáskeltő hatását kívánták jellemezni, és ehhez ideális módszernek tartották a tyúktörzs 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.

Sejtszintű, citotoxicitási vizsgálatokon alapuló szemirritációs tesztek:

A sejthalapú 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 említtem 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-foszfátáz, 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 utánózni 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 izolált szerveken alapuló módszereket, azaz pl. az izolált csirkeszemet 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, e vizsgálatok száma azonban 2003-ra mindössze 1100-ra csökkent (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2005).

2.3. Izolált szerveken történő szemirritációs vizsgálatok

Az izolált szerveken történő vizsgálatok alapja az, hogy a vegyi anyagot *in vitro/ex vivo* módon a borjú, sertés, csirke vagy nyúl izolált szaruhártyáján tesztelik. A frissen kinyert szemek, szaruhártyák, lencsék vágóhídról vagy a toxikológiai kísérletekben felhasznált állatokból származnak. Ezeket azután speciális (szuperfúziós) berendezésbe helyezik, ami lehetővé teszi a rendszer fenntarthatóságát a vizsgálat során. Számtalan eszköz áll rendelkezésre a szaruhártya opacitásának, permeabilitásának vagy hidratációjának mérésére. Nagy előnye, hogy a szaruhártya valamennyi rétege vizsgálható, továbbá ezek az eljárások a vegyi anyagok széles skálájával alkalmazhatók (WHITTLE et al., 1992).

Az OECD 437. számú tesztleírása a szarvasmarha szaruhártya opacitás és permeabilitás (Bovine Cornea Opacity Permeability, BCOP) *in vitro* 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).

A nyúl izolált szeme (Isolated Rabbit Eye, IRE) is felhasználható vegyi anyagok szemkorrozíós hatásának vizsgálatára. Az *in vitro* módszer esetében a kíméletesen elpusztított állatok szemeit eltávolítják, majd a szaruhártya vastagodásából (Draize teszthez hasonlóan), és a fluoreszcein visszatartó képességből következtetnek az irritációs tulajdonságra (WHITTLE et al., 1992).

Ugyancsak *in vitro* az izolált csirkeszemén végzett (Isolated Chicken Eye, ICE, vagy Chicken Enucleated Eye Test, CEET) irritáció vizsgálat (OECD TG 438). A módszert PRINSEN és KOËTER fejlesztették ki 1993-ban (PRINSEN - KOËTER, 1993). Az eljárás az izolált nyúl szemét felhasználó teszten alapul (BURTON et al., 1971).

A módszer validálása során a Draize teszt és az ICE teszt kritikus értékei összehasonlításakor 0,82-0,91 közötti korreláció mutatkozott (PRINSEN, 1996).

A teszt során a vizsgálandó vegyület által a csirkeszem-szaruhártyán okozott károsodás mértékét a szaruhártya megduzzadásának mértékéből, az opacitásból és a fluoreszcein visszatartó 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) mérik a 3 vizsgálandó paramétert, majd az eredményekből irritációs értékeket képeznek (PRINSEN - KOËTER, 1993).

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK

3.1. A vizsgálatban felhasznált anyagok és módszerek

3.1.1 Az izolált csirkeszemen (ICE) végrehajtott szemirritációs teszt

Az izolált csirkeszemen végrehajtott szemirritációs teszt a Toxi-Coop Zrt. balatonfüredi laboratóriumában került végrehajtásra.

A szükséges csirkefejek a vágóhídról, a vizsgálat napján feldolgozott állatokról, fiziológiás sóoldattal megnedvesített papírt tartalmazó műanyag dobozban kerültek a laboratóriumba. Az OECD 438 irányelv alapján, a szemek a vágástól számított két órán belül a teszthez szükséges szuperfúziós készülékbe kerültek.

A szemhéj eltávolítását követően, a szabadabbá váló szaruhártya felszínére 2 V/V%-os fluoreszcein oldatot cseppentettem, amelyet néhány másodperc elteltével 20 ml fiziológiás sóoldattal leöblítettem. Ezt követően réslámpával bizonyosodtam meg arról, hogy a szaruhártya felszíne sérüléstől mentes. Amennyiben a fluoreszcein megtartás megfelelő volt ($\leq 0,5$), a szemet eltávolítottam a szemüregből.

A pislogóhártya kifelé húzása közben, a szemüreg és a szemgolyó között keletkező résen át elvágtam a szemizmokat. A látóideg néhány milliméteres darabján kívül a felesleges szöveteket eltávolítottam.

Valamennyi vizsgálathoz 7 db szemet használtam fel, tesztanyagonként 3 db-ot, pozitív kontrollként szintén 3 db-ot, valamint 1 db negatív kontroll szem volt szükséges valamennyi értékelendő biocid termék esetén.

A már ismertetett módon előkészített szemet, a szaruhártya függőleges helyzetének biztosításával behelyeztem a készülék rozsdamentes acélbilincskébe. A továbbiakban, a szemet tartalmazó acélbilincset beállítottam a szuperfúziós készülék egyik kamrájába. A berendezésben a szaruhártya folyamatosan nedvesítve volt izotóniás sóoldattal.

Az akklimatizáció előtt újból elvégeztem a szemek fluoreszcein megtartásának vizsgálatát, kizárandó az eddig bekövetkezett sérüléseket, majd meghatároztam a szemek szaruhártya homályának mértékét. Amennyiben a fluoreszcein megtartás és a szaruhártya homály kellően alacsonynak bizonyult ($\leq 0,5$), akkor megmértem a szaruhártya vastagságát is. Ha a vastagságok közötti eltérés az átlaghoz viszonyítva 10%-on belüli érték volt minden szem esetén, úgy megkezdtam a csirkeszemek 45-60 perces akklimatizációját, 32 °C hőmérsékleten.

Az akklimatizációs idő lejártá után újból megmértem a szemek szaruhártya vastagságát, fluoreszcein megtartó képességét, valamint a szaruhártya homály mértékét. A szaruhártya vastagságának változása nem térhet el túlságosan az akklimatizációs idő előtt regisztráltaktól ($\pm 5-7\%$).

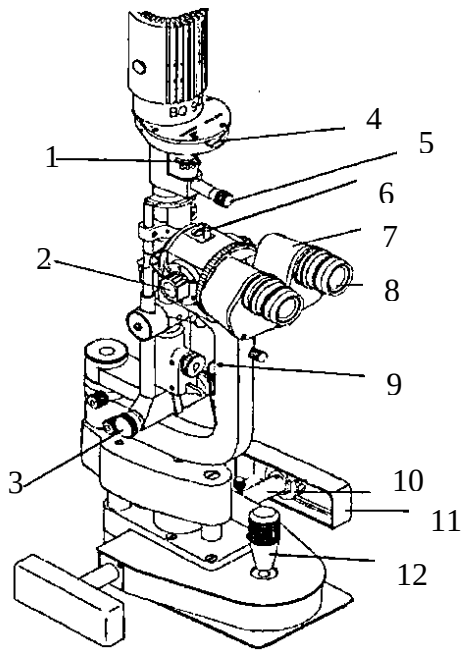
A referenciamérések után az első szemet kivettem a kamrájából. A 30 μ l mennyiségű hígítatlan vizsgálati anyagot mikropipettával a szaruhártya felszínére juttattam. Az expozíciós idő minden esetben 10 másodperc volt, amelynek lejártá után a tesztanyagot 20 ml szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldattal eltávolítottam a szaruhártya felszínéről. Hasonló módon jártam el a negatív (fiziológiás sóoldat) és pozitív kontroll [triklórecetsav 30 (w/v)%] szemek kezelése során is. Ezután a szemet a tartójával együtt visszahelyeztem a szuperfúziós készülékbe.

A továbbiakban a kontroll és a biocid termékkel kezelt szemek esetén is a vizsgálandó készítmény lemosását követő 30, 75, 120, 180 és 240 perc múlva vizsgáltam a szaruhártya vastagságát, illetve a szaruhártya homály mértékét. A fluoreszcein megtartó képességet csak a kezelés előtt, illetve az expozíciós időt lezáró mosást követő 30. percben határoztam meg.

A szemirritációs potenciált jellemző szaruhártya elváltozások vizsgálatát a következő alpontokban részletesebben ismertetem.

A szaruhártya vastagság mérése

A szaruhártya vastagságának mérése előtt a fókusz távolságot úgy állítottam be, hogy a szaruhártyán lefolyó fiziológiás sóoldatot élesen láthassam. Ezt követően a réslámpa (Haag-Streit BQ 900) sztereomikroszkóp (3. ábra) részét fixen tartva kimozdítottam a réslámpa fényforrást biztosító részét balra úgy, hogy közben a mikroszkóp rész a helyén maradt.



- 1: Kar a szűrő kiválasztásához
- 2: Nagyítás beállítására szolgáló gomb
- 3: Résszélesség állító gomb
- 4: Blende pozícióját jelző skála
- 5: A blende beállítására szolgáló kar
- 6: Fém tűske a vastagságmérő egység rögzítéséhez
- 7: Sztereomikroszkóp
- 8: Cserélhető okulár
- 9: A sztereomikroszkópot tartó mozgatható állvány
- 10: A réslámpa mozgását biztosító edzett acélrúd
- 11: Fogaslécet védő burkolat
- 12: A réslámpa mozgására szolgáló kar

3. ábra: A sztereomikroszkóp sematikus rajza

A sztereomikroszkóp felső részén található fém tűskére helyeztem rá a szaruhártya vastagság mérésére szolgáló skálázott egységet. A mikroszkóp jobb oldali okulárját kicseréltem a vizsgálathoz felhasználható vékony nyílással ellátott osztott lencsét. A lencse segítségével a szaruhártya felszínén egy vonal látható. Ezt a vonalat vízszintes helyzetbe állítottam, majd a szaruhártya felszínét megvilágító fényt szűkítettem mindaddig, míg a réslámpa bal oldalán található gomb skálája a $9\frac{1}{2}$ -es pozícióba nem került, ami 0,095 mm résszélességnek felel meg.

Amennyiben a szaruhártya vastagság mérésére szolgáló skála értéke 0, akkor az osztólencsén keresztül látható fénysáv megszakítás és torzulás nélküli. A skálát elmozdítva a fény megtörik, és a törésvonal mentén vízszintesen elmozdul. Amikor a látható fénysávok már nem fedik egymást, de a szélük még összeér, a skáláról leolvasott érték a szaruhártya vastagságának felel meg.

A szaruhártya vastagságát mértem az akklimatizáció előtt, így biztosítottam, hogy a szemek közötti eltérés 10%-on belüli értéken maradjon. A referencia érték ($t=0$) az akklimatizáció végeztével, viszont a kezelést megelőző szaruhártya vastagság volt. A biocid

termékekkel történő kezelés után 30, 75, 120, 180 és 240 perccel újból meghatároztam a vastagságokat.

A következő képletekből, a mért szaruhártya-vastagságok felhasználásával számítottam ki a duzzadás százalékos értékét:

$$SZD = \frac{SZV_t - SZV_r}{SZV_r} \times 100$$

ahol SZD = szaruhártya duzzadás mértéke (%); SZV_t = szaruhártya vastagság adott időpontban (30., 75., 120., 180., 240. perccel a biocid termék szemről történő leöblítése után); SZV_r = szaruhártya vastagság referencia értéke ($t=0$)

1. egyenlet: A szaruhártya duzzadás százalékos értékének egyenlete

$$\overline{SZD} = \frac{SZD_1 + SZD_2 + SZD_3}{3}$$

Ahol $\overline{SZD}$ = a szaruhártya-duzzadás középértéke a kezelés utáni mosást követő adott t ($t = 30., 75., 120., 180., 240.$ percben) időpontban; SZD_1 = ugyanazon tesztelt biocid termék első ismételtsében tesztelt szem szaruhártya duzzadása; SZD_2 = második szem szaruhártya duzzadása; SZD_3 = harmadik szem szaruhártya duzzadása

2. egyenlet: A szaruhártya duzzadás középértékének kiszámítása

A 0-tól 5-ig terjedő kis értékeket a szaruhártya-vastagság esetében nullának tekintettem az értékelés során. Nagy negatív számok esetében (> -12) viszont, ha ahhoz egyéb súlyos tünetek is társultak, akkor azt súlyos hatásnak tekintettem és a IV kategóriába soroltam.

A százalékos értékek 2. táblázat szerint történő kategorizálása alapján kapjuk meg a kívánt végpontot.

2. táblázat: A szaruhártya-vastagság besorolási kritériumai a vizsgálatban

Szaruhártya torzulás (%)	Kategória
0-5	I (nincs torzulás)
5-12	II (enyhe torzulás)
12-18 (több mint 75 perccel a kezelés után)	II (enyhe torzulás)
12-18 (kevesebb, mint 75 perccel a kezelés után)	III (jól definiálható torzulás)
18-26	III (jól definiálható torzulás)
26-32 (több mint 75 perccel a kezelés után)	III (jól definiálható torzulás)
26-32 (kevesebb, mint 75 perccel a kezelés után)	IV (súlyos torzulás)
>32	IV (súlyos torzulás)

A szaruhártya homály vizsgálata

A szaruhártya homály mérése során is a réslámpát a szemem lefolyó fiziológiás sóoldatra fókuszáltam, hiszen ebben az esetben jól megfigyelhető a hártán látható sérülés és torzulás. Ezt követően a fókusz távolságot az írisz vizsgálhatóságára élesítettem. A szaruhártya homályának mértéke annál nagyobb, minél kevésbé látható az írisz.

A szaruhártya-homály referencia értéke ($t=0$) közvetlenül az akklimatizációs idő után mért érték volt. Ezután meghatároztam a homály mértékét az expozíciót követő mosás utáni 30., 75., 120., 180. és 240. percben is. Továbbá meghatároztam a kezelés utáni mosást követő 30., 75., 120., 180. és 240. percben. A szaruhártya-homály mértékét a 3. táblázat pontrendszer alapján értékeltem.

3. táblázat: A szaruhártya homály mértékének meghatározása

Szaruhártya homály mértéke	Pontérték
Nincs homály	0
Nagyon halvány homály	0,5
Szórt vagy zavaros területek; az írisz részletei tisztán kivehetőek	1
Könnyen észrevehető áttetsző terület; az írisz részletei kissé elmosódottak	2
Súlyos szaruhártya-homály; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki, a pupilla mérete alig érzékelhető	3
A szaruhártya teljes homálya; az írisz nem látható	4

A meghatározott időpontokban tapasztalt szaruhártya-homály értékekből határoztam meg a homály tényleges mértékét:

$$\Delta SZH_t = SZH_t - SZH_r$$

ahol ΔSZH_t = a szaruhártya homály tényleges értéke adott időpontban (30., 75., 120., 180., 240. percben); SZH_t = a szaruhártya-homály mértéke a kezelés utáni mosást követő adott (30., 75., 120., 180., 240. perc) időpontban; SZH_r = az adott szem szaruhártya-homályához tartozó referencia érték ($t=0$)

3. egyenlet: A referencia értékkel korrigált szaruhártya homály mértékének kiszámítása

$$\overline{SZH} = \frac{\Delta SZH_{t1} + \Delta SZH_{t2} + \Delta SZH_{t3}}{3}$$

ahol $\overline{SZH}$ = A szaruhártya-homály középértéke a kezelés utáni mosást követő adott t ($t = 30., 75., 120., 180., 240.$ perc) időpontban; ΔSZH_{t1} = első szem szaruhártya-homálya a referencia értékkel korrigálva; ΔSZH_{t2} = második szem szaruhártya-homálya a referencia értékkel korrigálva; ΔSZH_{t3} = harmadik szem szaruhártya-homálya a referencia értékkel korrigálva

4. egyenlet: A szaruhártya-homály középértékének egyenlete

A szaruhártya-homályra kapott legnagyobb számérték 4. táblázat szerinti kategorizálása alapján kapjuk meg a szükséges végpontot.

4. táblázat: A szaruhártya-homály besorolási kritériumai

A homály tényleges mértéke	Kategória
0,0 – 0,5	I (nincs homály)
0,6 – 1,5	II (enyhe homály)
1,6 – 2,5	III (jól definiálható homály)
2,6 – 4,0	IV (teljes homály)

A fluoreszcein megtartó képesség vizsgálata

Az előre elkészített 2 V/V%-os fluoreszcein-oldatból egy cseppet a kamra ablakának eltávolítása után a szaruhártya felszínére jutattam, amelyet néhány másodperc elteltével 20 ml fiziológiás sóoldattal lemostam.

A réslámpa blendéjének állításával elérhető, hogy kék fénnel (UV tartomány) világítsa meg a szaruhártya felszínét. A kék fénnel megfigyelhető a koncentrált fluoreszcein oldat, mely a sérülések helyét jelzi.

A fluoreszcein-megtartó képességet közvetlenül az akklimatizációs idő végén és a kezelés utáni mosástól számított 30. percben határoztam meg.

A fluoreszcein-megtartás mértékét az 5. táblázat szerinti pontrendszer alapján értékeltem.

5. táblázat: A fluoreszcein megtartás mértékének pontrendszere

Fluoreszcein megtartás mértéke	Pontérték
Nincs fluoreszcein megtartás	0
Igen csekély mértékű, egysejtes foltosodás	0,5
Egysejtes foltosodás elszórtan a szaruhártya kezelt felületén	1
Fokális vagy egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás	2
A szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint	3

A fluoreszcein-megtartó képesség meghatározása a meghatározott időpontokban felvett értékekből a következő összefüggéssel lehetséges:

$$\Delta FM_t = FM_t - FM_r$$

$$\overline{FM} = \frac{\Delta FM_1 + \Delta FM_2 + \Delta FM_3}{3}$$

ahol ΔFM_t = a fluoreszcein-megtartás mértéke a kezelés utáni mosást követő adott t (t = 30., 75., 120., 180., 240. perc) időpontban a referencia értékkel korrigálva (t=0); FM_t = a fluoreszcein-megtartás mértéke a kezelés utáni mosást követő adott t (t = 30., 75., 120., 180., 240. perc) időpontban; FM_r = az adott szaruhártya fluoreszcein megtartásához tartozó

referencia érték; $\overline{FM}$ = a fluoreszcein-megtartás középértéke; ΔFM_1 = az első szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva a 30. percben; ΔFM_2 = a második szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva a 30. percben; ΔFM_3 = a harmadik szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva a 30. percben

5. egyenlet: A fluoreszcein megtartó képesség meghatározásának egyenlete

A fluoreszcein-megtartásra kapott számértéket a 6. táblázat alapján kategorizálhatjuk, a keresett végpont ez alapján megadható.

6. táblázat: A fluoreszcein megtartó képesség kategorizálása

A tényleges fluoreszcein-megtartó képesség	Kategória
0,0 – 0,5	I (nincs fluoreszcein megtartás)
0,6 – 1,5	II (enyhe fluoreszcein megtartás)
1,6 – 2,5	III (jól definiálható fluoreszcein megtartás)
2,6 – 3,0	IV (nagyértékű fluoreszcein megtartás)

A három végpontból képezhető irritációs kategóriák

A három végpont kombinációjából lehet meghatározni a vizsgált anyag szemirritációs potenciálját. A lehetséges variációkat, illetve a besorolási kategóriákat a 7. táblázat szemlélteti. Abban az esetben, ha az anyag súlyos szemirritációt/szemkorróziót okoz, lehetséges az anyag osztályba sorolása. Minden egyéb, a végpontok kombinációja alapján kapott eredmény révén javasolható egy szemirritációs kategória, de az anyag tényleges irritációs fokának megállapításához, illetve osztályba sorolásához szükséges elvégezni az *in vivo* nyúl, illetve egyéb kiegészítő *in vitro* vizsgálatot.

7. táblázat: Az izolált csirkeszemen alapuló szemirritációs vizsgálat alapján létrehozott irritációs kategóriák

Besorolás	A három végpont kombinációja
Nem irritáló hatású anyag	3×I 2×I, 1×II 2×II, 1×I ³
Enyhén irritáló hatású anyag	3×II 2×II, 1×III 1×I, 1×II, 1×III ¹
Közepesen irritáló hatású anyag	3×III 2×III, 1×II 2×I, 1×IV ¹ 2×III, 1×IV ² 2×III, 1×I 2×II, 1×IV ¹ 1×II, 1×III, 1×IV ¹
Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag	3×IV 2×IV, 1×III 2×IV, 1×II ¹ 2×IV, 1×I ¹ 30 percnél a szaruhártya homálya legalább 3 (legalább két szem esetében). Bármely időpontban a szaruhártya homálya 4 (legalább két szem esetében). A felhám súlyos fellazulása (legalább egy szem esetében).

1: kis valószínűséggel előforduló kombináció

2: a mérsékelt és a súlyos irritáció határán lévő

3: a nem irritáló és az enyhén irritáló határán lévő

3.1.2 A vizsgálatban alkalmazott anyagok jellemzése

A nátrium-klorid kristályból ultra tiszta víz segítségével állítottuk elő a vizsgálatához szükséges fiziológiás sóoldatot. A tesztekhez 9 g nátrium-kloridot 1 literre hígítottunk ultra tiszta vízzel. Az így előállított fiziológiás sóoldatot használtam a szaruhártyák nedvesítésére, lemosására, oldatkészítésre és negatív kontrollként a vizsgálatok során.

A pozitív kontrollként használandó szilárd és nagytisztaságú triklórecetsav (BioXtra) 0,3 g-ját 1-ml-re hígítottam fiziológiás sóoldattal. Az így kapott 30 (w/v)%-os oldatot alkalmaztam.

A vizsgálatához szükséges 2 (V/V)% Fluoreszcein (Novartis) oldatot, az eredeti oldat 5 ml (100 mg/ml) fiziológiás sóoldattal történő hígításával állítottam elő, úgy hogy az 5 ml eredeti oldatot 25 ml-re hígítottuk a fiziológiás sóoldat segítségével. Az így készült 2 (V/V)% oldatot használtam a fluoreszcein-megtartás meghatározása során.

A kísérletben három rovarirtószer (inszekticid) és egy háztartási penészgomba eltávolító készítmény szemirritációs potenciálját vizsgáltam (8. táblázat). A kísérleti anyagokat a tesztekben 100 %-os töménységben alkalmaztam.

8. táblázat: A vizsgálatban felhasznált biocid termékek

Tesztanyag	Hatóanyag	LD ₅₀ mg/ttkg	Irritáció (szem)
Actibiol EC 50	alfa-cipermetrin	< 7000 mg/kg (orális patkányon)	enyhén irritatív
Mellerud penészölőszér	nátrium-hipoklorid	1100 mg/kg (orális patkányon)	súlyosan irritatív
PESTSTOP-B 10 EC	d-tetrametrin	> 5000 mg/kg (orális patkányon)	enyhén irritatív
PESTSTOP COMBI 8 CS	cipermetrin, permetrin	> 2000 mg/kg (orális nyúlön)	nem irritatív

Az Actibiol EC 50 5,52 % alfa-cipermetrin hatóanyagot tartalmazó II. forgalmazási kategóriába tartozó biocid termék, rovarirtó koncentrátum. Felhasználható legyek (házi légy

(*Musca domestica*), szuronyos istállólégy (*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. Fizikai-kémiai tulajdonságait a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat: Az Actibiol EC 50 rovarirtó koncentrátum fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	folyékony
. Szín:	sárgás
Szag:	aromás illatú
Vízoldékonyság:	nem vízoldékony
Oldékonyság szerves oldószerekben	oldódik

A Mellerud penészölőszer 43 g/l nátrium-hipoklorid biocid hatóanyagot tartalmazó, a háztartásokban a mosható felületek penészmentesítésére alkalmazható készítmény. Fizikai-kémiai tulajdonságait a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: A Mellerud penészölőszer fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot	folyékony
Szín	enyhén sárga
Szag	klórra emlékeztető
Oldékonyság	vízzel korlátlanul

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 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: A PESTSTOP-B 10 EC rovarirtó koncentrátum fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	flyékony
Szín:	halványsárga
Sűrűség:	0,82 g/cm ³ (20 °C)
Vízben való oldhatóság:	oldódik
pH:	6,4

A Peststop Combi 8 CS 2,6 % cipermetrin és 5,9 % permetrin 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 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat: A Peststop Combi 8 CS rovarirtó koncentrátum fizikai és kémiai tulajdonságai

Halmazállapot:	flyadék
Szag:	fehér
Szín:	jellegzetes
Sűrűség (20 °C-on)	1,04 kg/l

3.2. A vizsgálatok eredményei és értékelésük

3.2.1 Az izolált csirkeszemeken történő szemirritációs tesztből származó eredmények

A biocid készítményeket közvetlenül az eltávolított csirkeszemekre csöppentettem, a kezelés utáni lemosást követően a vizsgálat során megfigyelt tünetek (szaruhártya fellazulása - torzulása, opacitása, fluoreszcein megtartó képesség változása) megjelenését és mértékét lejegyeztem. A korábban ismertetett határértékek révén értékeltem az elváltozások súlyosságát. A végpontok kombinációja révén állapítottam meg a termék szemirritációs potenciálját.

Az Actibiol EC 50 rovarirtó koncentrátum vizsgálati eredményeit a 13. táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy a jól definiálható fluoreszcein megtartás, az enyhe homály és szaruhártya torzulás miatt a termék enyhén szemirritatívnek bizonyult.

13. táblázat: Az Actibiol EC 50 biocid termék ICE teszttel meghatározott szemirritációs paraméterei

Actibiol EC 50 – enyhén irritáló

Megfigyelések	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	3%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	6%	II
A legnagyobb opacitás középérték	0.7	II
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	1.8	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
Összesített in vitro irritációs besorolás	2xII, 1xIII	

Az Mellerud penészgomba eltávolító készítmény vizsgálati eredményeit a 14. táblázat tartalmazza. Látható, hogy a jól definiálható fluoreszcein megtartás, az enyhe homály és a jól definiálható szaruhártya torzulás miatt a termék egyébként közepesen irritatívnek minősülne, azonban a felhám két szem esetén súlyosan fellazult, ezért a biocid termék szemkorróziót / súlyos szemirritációt okozott a teszt során.

14. táblázat: A Mellerud penészölőszert ICE teszttel meghatározott szemirritációs paraméterei

Mellerud penészölőszert – szemkorrózió / súlyos szemirritáció

Megfigyelések	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	1%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	20%	III
A legnagyobb opacitás középérték	0.7	II
A legnagyobb fluoreszcencia megtartás középérték	2.8	IV
Egyéb megfigyelések	A felhám súlyos fellazulása két szem esetében.	
Összesített in vitro irritációs besorolás	1xII, 1xIII, 1xIV	

A Peststop-B 10 EC rovarirtó koncentrátum vizsgálati eredményei a 15. táblázatban olvashatók. Elmondható, hogy nagymértékű fluoreszcencia megtartás mellett, szaruhártya homály nem volt tapasztalható, a torzulást enyhének találtam, azonban a felhám két szem esetén súlyosan fellazult, ezért a biocid termék szemkorróziót / súlyos szemirritációt okozott a teszt során.

15. táblázat: A Peststop-B 10 EC ICE teszttel meghatározott szemirritációs paraméterei

Peststop-B 10 EC – szemkorrózió / súlyos szemirritáció

Megfigyelések	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	5 %	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	8 %	II
A legnagyobb opacitás középérték	0.2	I
A legnagyobb fluoreszcencia megtartás középérték	2.7	IV
Egyéb megfigyelések	A felhám (epithelium) súlyos fellazulása két szem esetében	
Összesített in vitro irritációs besorolás	1xI, 1xII, 1xIV	

A Peststop Combi 8 CS rovarirtó koncentrátum vizsgálati eredményei a 16. táblázatban láthatók. Ez a biocid termék nem minősült szemirritatívnak az ICE teszt során.

16. táblázat: A Peststop Combi 8 CS ICE tesztel meghatározott szemirritációs paraméterei

Peststop Combi 8 CS – nem irritáló

Megfigyelések	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	1%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	3%	I
A legnagyobb opacitás középérték	0.2	I
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	0.7	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
Összesített in vitro irritációs besorolás	2xI,1xII,	

A négy kísérleti anyagot két mérési sorozatban vizsgáltam, a 17. táblázat adataiból megállapítható, hogy az izolált csirkeszemeken szemkorróziót okozott a pozitív kontroll anyag, a teljes szaruhártya homály mindkét esetben jelentkezett.

17. táblázat: A pozitív kontroll ICE tesztel meghatározott szemirritációs paraméterei

Pozitív kontroll (10%-os ecetsav) – szemkorrózió / súlyos szemirritáció

Megfigyelések 1. mérési sorozat	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	6%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	15%	II
A legnagyobb opacitás középérték	3.8	IV
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	0.2	I
Egyéb megfigyelések	30 percnél a szaruhártya opacitása mindhárom kezelt szem esetében 4-es.	
Összesített in vitro irritációs besorolás	1xI, 1xII, 1xIV	
Megfigyelések 2. mérési sorozat	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	14 %	III
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	23 %	III
A legnagyobb opacitás középérték	4.0	IV
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	0.7	II
Egyéb megfigyelések	30 percnél a szaruhártya opacitása két kezelt szem esetében 4-es.	
Összesített in vitro irritációs besorolás	1xII, 1xIII, 1xIV	

A 18. táblázatban olvasható, hogy a mérési sorozatokban a negatív kontroll anyag nem bizonyult szemirritatívnak.

18. táblázat: A negatív kontroll ICE teszttel meghatározott szemirritációs paraméterei

Negatív kontroll (fiziológiás sóoldat) – nem irritáló

Megfigyelések 1. mérési sorozat	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	0%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	0%	I
A legnagyobb opacitás középérték	0.0	II
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	0.0	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
Összesített in vitro irritációs besorolás	3xII	
Megfigyelések 2. mérési sorozat	Érték	ICE besorolás
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 75 percig	2%	I
A maximális szaruhártya fellazulás középértéke 240 percig	2%	I
A legnagyobb opacitás középérték	0.0	II
A legnagyobb fluoreszcein megtartás középérték	0.0	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
Összesített in vitro irritációs besorolás	3xII	

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

A biocid készítményekkel folytatott irritációs vizsgálatok eredményeit a 19. táblázat tartalmazza. A kísérleteim során alkalmazott 4 biocid termék közül az Actibiol EC 50, a Mellerud penészölőszer és a Peststop Combi 8 CS esetében megegyezett az *in vitro* ICE tesztből és a gyártó által közölt adatokból (*in vivo*) származó irritációs potenciál. A Peststop-B 10 EC készítménynél az *in vitro* teszt során erősebb irritáció mutatkozott. A Mellerud penészölőszer súlyosan irritatív keverék, összetevői a nátrium-hipoklorid szemkorrozív, a nátrium-hidroxid maró vegyi anyagok. E termék esetén az irritációs potenciál meghatározására alkalmas lett volna az izolált csirkeszemen alapuló szemirritatív vizsgálat eredménye, amit munkámmal megerősíthettem.

19. táblázat: A gyártók által közölt és az ICE teszttel meghatározott szemirritációs potenciál összehasonlítása

Vizsgálati anyag	Gyártó által közölt adatok	Eredmény az ICE tesztből
Actibiol EC 50	Enyhén irritatív	Enyhén irritatív
Mellerud penészölőszér	Súlyosan irritatív	Súlyosan irritatív
Peststop-B 10 EC	Enyhén irritatív	Súlyosan irritatív
Peststop Combi 8 CS	Nem irritatív	Nem irritatív

Fontos kiemelni, hogy gyengébb irritációt egyik esetben sem jelzett az ICE teszt, mint ami a biztonsági adatlapokon feltüntetésre került. A toxikológiai vizsgálatok egyik célja, hogy a lehető legérzékenyebb tesztobjektumokat használja fel, így biztosítva, hogy a humán felhasználók közötti különbségek révén, az érzékenyebb emberek is a kockázatok ismeretében, kellő biztonsággal alkalmazhassák a veszélyes anyagokat.

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A primer szemirritáció vizsgálatára javasolt perspektivikus alternatív módszerek közé tartoznak az izolált szerveken alapuló *in vitro* kísérleti módszerek, köztük az ICE teszt. Az ICE 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 frissen vágott csirkékből izolált szemeket használ, ezáltal a szemirritációs kísérletekben felhasznált emlőszállatok száma jelentősen csökkenthető.

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 az ICE teszt elővizsgálati módszerként javasolható a biocid készítmények szemirritációs tulajdonságainak vizsgálatára. Így az ICE 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.

Az izolált csirkeszemen végrehajtott *in vitro* vizsgálat csak pozitív (korrozív, súlyosan irritáló) eredmény esetén alkalmas a vegyi anyagok GHS szerinti 1. kategóriájába történő besorolására, így a kapott eredmények alapján meghatározott irritációs hatás csak tájékoztató jellegű és nem alkalmas a készítmények korrozívnál enyhébb irritációs potenciáljának meghatározására. Ennek a legfőbb oka, hogy a módszer nem alkalmas a tapasztalt irritációs hatás reverzibilitásának vizsgálatára, hiszen az izolált rendszer korlátozott ideig tartható fenn. Az általam korábban elvégzett vizsgálatokból kitűnik a Peststop-B 10 EC biocid termék esetén, hogy a Draize teszt során a kezdeti erős kötőhártya tünetek a 7. napra megszűntek, az állatok tünetmentessé váltak.

Tehát korrozívnál gyengébb irritációt mutató ICE tesztek után a végső besoroláshoz el kell végezni az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs tesztet vagy más az engedélyező hatóságok által részben elfogadott *in vitro* vizsgálatot. Ez az oka, hogy önmagában az izolált

csirkeszemen alapuló szemirritációs vizsgálat önmagában nem képes kiváltani a Draize-féle módszert. Viszont egyéb *in vitro* eljárásokkal kombinálva (HET-CAM stb.) lehetővé válhat a hagyományos *in vivo* vizsgálat kiváltása.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A kártékony szervezet kémiai vagy biológiai eszközökkel történő elpusztítására, ártalmatlanná tételére, tevékenységében való megakadályozására, elrettentésére vagy más módon történő korlátozására alkalmas szerformák (biocid termékek) pontos toxikológiai minősítése rendkívül fontos feladat, hiszen a termék potenciális veszélyeiről csak így kaphatunk teljes képet.

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 szemkorrozíós vizsgálatokban preferált állatfaj az albínó nyúl. Az általánosan elfogadott vizsgálatot Draize és munkatársai fejlesztették ki 1944-ben.

Az utóbbi években egyre több olyan alternatív módszert dolgoztak ki, melyek egyelőre csak részben képesek kiváltani a Draize-féle tesztet. Ezen módszerek közé tartozik az izolált csirkeszemen végrehajtott *in vitro* szemirritációs eljárás (ICE).

Vizsgálatomban biocid termékek szemirritatív hatását tanulmányoztam az izolált csirkeszemen alapuló *in vitro* eljárással, a vegyi anyagot közvetlenül a csirkeszem szaruhártyájára helyezve, a tapasztalt elváltozásokból (szaruhártya duzzadás és homály, fluoreszcein megtartás, egyéb megfigyelések) határoztam meg a biocid termékek irritációs potenciálját. Az *in vitro* irritációs indexeket összehasonlítottam a termék gyártója által közölt, biztonsági adatlapon szereplő irritációs kategóriával.

A kísérleti eredményeim alapján elmondható, hogy az *in vitro* ICE teszt jól használható biocid termékek irritatív hatásainak vizsgálatára. Az *in vitro* eredmények kellően jó korrelációt mutatnak a gyártók által közölt értékekkel, így elővizsgálati célból megfelelő módszer lehet a biocid termékek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatokban. Mivel az izolált csirkeszemen végrehajtott *in vitro* vizsgálat csak pozitív (korrozív, súlyosan irritáló) eredmény esetén alkalmas a vegyi anyagok veszélyességi kategóriájába történő besorolására, ezért önmagában soha nem lesz képes teljes egészében kiváltani a Draize-féle *in vivo* módszert.

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.

- BURTON, A.B.G. /1971/: A method for the Food and Cosmetics Toxicology. 10. 209-217.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 tájékoztatási kézikönyve. 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.*

MÉSZÁROS J. /1976/: Baromfi-egészségtan. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

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.

PRINSEN, M.K. /1996/: The Chicken Enucleated Eye Test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. Food and Chemical Toxicology. 34/3. 291-296.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, valamint Buda Istvánnak a vizsgálatok kivitelezéséhez adott támogatásért.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.