

VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH BIOLOGICKÝCH MODELŮ PRO TESTOVÁNÍ OČNÍ DRÁŽDIVOSTI CHEMICKÝMI LÁTKAMI

PETRA PLODÍKOVÁ^{a,b}, JAROMÍRA CHÝLKOVÁ^b
a ONDŘEJ ČERNÍK^b

^a Výzkumný ústav organických syntéz, a.s., č.p. 296, 533 54 Rybitví, ^b Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
petra.plodikova@vuos.com

Došlo 2.1.20, přijato 28.4.20.

Klíčová slova: oční dráždivost, *in vitro* metody, biologické modely, alternativní metody, test opacity a permeability, chorioalantoidní membrána

Obsah

1. Úvod
2. Testování oční dráždivosti *in vivo*
3. Alternativní biologické modely
4. Příklady testovacích metodik využívajících různé typy alternativních modelů
 - 4.1. Zkouška na hovězích rohovkách
 - 4.2. Zkouška na rekonstruovaném 3D modelu lidské rohovky
 - 4.3. Zkouška oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně slepičího embrya
5. Výhody a nevýhody biologických modelů pro testování chemických látek
6. Závěr

1. Úvod

Chemické látky mohou při kontaktu s lidským okem vyvolat negativní reakce, které se projevují různě intenzivním podrážděním, zánětem, poškozením rohovky, zhoršením vidění až oslepnutím. S rozvojem chemické výroby od poloviny 19. století narůstal počet případů trvalého poškození zraku důsledkem nehod při manipulaci s řadou chemických látek. To vedlo k potřebě znalosti základních toxikologických vlastností používaných látek¹. Testování oční dráždivosti patřilo a patří mezi základní kroky při zjišťování negativních účinků látek na zdraví člověka. Jako první biologické modely pro cílené zkoušení oční dráždivosti byla používána zvířata, která byla (v souladu s tehdejší úrovní znalostí) považována za odpovídající model².

Cílené používání laboratorních zvířat ke zjišťování toxických účinků započalo již v 18. století³. Prvním vědec-

ky zveřejněným postupem pro testování oční dráždivosti byl Draizův test oční dráždivosti, který byl publikován v roce 1944 (cit.⁴). Tento základní *in vivo* test používal jako biologický model albinotického králíka, přesně definoval množství aplikované látky, délku expozice a metodu popisu sledovaných reakcí oka po expozici. V šedesátých letech minulého století se začala prosazovat snaha omezit používání zvířat k toxikologickým testům, popřípadě minimalizovat jejich stres. V té době byl, mimo jiné, publikován princip 3R (Reduction – snížení počtu, Refinement – zjemnění, Replacement – náhrada), který shrnuje přístupy k omezení používání laboratorních zvířat⁵. Tento princip je základem alternativních metod. Pro oční dráždivost byla vyvinuta řada vědeckých postupů využívajících buněčné, tkáňové nebo orgánové systémy. Některé z těchto metod byly mezinárodně validovány a jejich použití bylo následně zahrnuto do příslušných legislativních dokumentů, týkajících se ochrany zdraví člověka při kontaktu s chemickými látkami. *In vivo* test je v současné době nahrazován různými strategiemi toxikologického testování, které zahrnují především využití dostupných informací o chemických látkách, použití prediktivních *in silico* modelů (počítačové systémy odhadující toxicitu výpočtem na základě chemické struktury) a testování pomocí kombinace vhodných, vědecky ověřených a validovaných alternativních postupů. Takto definované strategie by měly dávat relevantní informace na stejné úrovni jako testy na zvířatech.

Cílem tohoto článku je stručně informovat o používaných alternativních biologických modelech, které postupně nahrazují testy na zvířatech, a definovat jejich výhody a nevýhody.

2. Testování oční dráždivosti *in vivo*

Draizův test na králících byl vyvinut jako reakce na četné případy poškození zraku v důsledku používání nebezpečných kosmetických přípravků³. Test byl akceptován Organizací pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) a v roce 1981 publikován v prvním souboru doporučených testovacích metod (Test Guidelines) pro testování toxicity chemických látek jako TG No. 405.

Tato metoda se stala základem pro testování oční dráždivosti pro všechny typy chemických látek, jako jsou průmyslové chemikálie, léčiva, zdravotnické prostředky, biocidní účinné látky atd. Testovaná látka je aplikována do spojivkového vaku jednoho oka (druhé oko slouží jako kontrola pro hodnocení oční reakce). V různých časových intervalech od expozice je numericky hodnocena míra poškození spojivky, rohovky a duhovky. Následně je vypočteno celkové skóre podráždění. Původní schéma testování vyvinuté Draizem a spol. bylo postupně modifiková-

no, aby se chránila zvířata a zajistila se, pokud možno, jejich pohoda (welfare). Od roku 2012 je aplikace testované látky prováděna pod mírnou sedací⁶. Výhodou tohoto testu, oproti všem publikovaným alternativním metodám, je komplexnost a systémovost odezvy živého organismu a možnost vyhodnotit reverzibilitu změn na rohovce, duhovce i spojivce. Zvířata jsou pozorována relativně dlouhou dobu po expozici, proto je možno sledovat vyhojení jednotlivých tkání, protražovaný efekt nebo nevratnost poškození. Důležitým faktorem je také možnost posouzení systémové toxicity zkoušené látky související s oční expozicí⁶. Tyto ukazatele nelze u alternativních biologických modelů vždy hodnotit. Jako nevýhody tohoto *in vivo* testu jsou, mimo etických důvodů, uváděny především subjektivnost hodnocení odezvy, anatomická odlišnost králíčího oka ve srovnání s okem člověka, nedostatečná znalost mechanismu účinku a vysoká variabilita výsledků⁷. Také metodou předepsaná aplikovaná dávka je příliš vysoká oproti reálné možnosti expozice lidí^{3,8}. Jako sporná se ukazuje ekonomická výhodnost alternativ, protože některé používané biologické *in vitro* modely (např. komerčně vyráběné 3D tkáňové modely) jsou relativně drahé a výsledná cena za test je vyšší než původní Draizův test. Nicméně především etické hledisko vedlo k mezinárodní validaci vybraných alternativních zkoušek a následně k jejich začlenění do příslušných legislativ pro chemické látky, léčiva aj. V oblasti kosmetiky došlo k úplnému zákazu testování těchto produktů a jejich komponent na zvířatech⁷.

3. Alternativní biologické modely

Při testování toxicity chemických látek se v oblasti oční leptavosti a dráždivosti využívají testovací systémy buněčné, organotypické nebo orgánové. Jako první možností se ukázalo využití očí zvířat používaných pro jiné vědecké účely nebo jatečných zvířat, jako modelu velmi blízkého králíčímu oku^{9,10}.

Orgány jatečných zvířat, které jsou *de facto* odpadním materiálem, byly použity při vývoji celé skupiny alternativních metod, které se řadí mezi *ex vivo* metody. Tyto metody používají izolované orgány, které si uchovávají některé biologické funkce a vlastnosti živých organismů po několik hodin od utracení jatečného zvířete^{3,11}. V oblasti oční dráždivosti se jako alternativní biologické modely pro rohovku používají celé králíčí a kuřecí oči nebo izolované hovězí či prasečí rohovky. Oči nebo oční rohovky jsou umístěny do specializovaných držáků, které umožňují zachovat jejich biologické vlastnosti po celou dobu testu. Principem všech těchto zkoušek je sledování změn opacity (zákalu) a permeability (propustnosti) rohovky po kontaktu s testovanou látkou. Jedná se o modely pouze pro rohovku bez možnosti sledovat reverzibilitu lézí a systémového účinku po oční expozici⁶. Metody využívající celé kuřecí oko a izolovanou hovězí rohovku byly, na základě doporučení Vědeckého výboru Evropského střediska pro validaci alternativních metod ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Met-

hods), zařazeny mezi OECD testovací postupy^{12,13}.

Relativně novým typem alternativních biologických modelů pro testování oční dráždivosti jsou tkáňové 3D modely. V této oblasti byli velmi aktivní výrobci kosmetických přípravků, kteří iniciovali výzkum a vývoj *in vitro* očních modelů, jako reakci na společenský a následně také legislativní tlak na omezení používání zvířat v kosmetickém průmyslu. Několik firem (MatTek, USA; SkinEthic, Francie) se specializovalo na vývoj těchto modelů, a to nejen tkání oční rohovky, ale také epitelu kůže, tkáně slizniční, plicní a jiné, které jsou široce využívány při vývoji nových farmaceutických látek¹⁴. Jejich 3D tkáňové modely oční rohovky byly základem pro celou skupinu alternativních metod vhodných pro chemické látky s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Rekonstruované trojrozměrné modely lidské rohovky strukturálně odpovídají epitelálnímu povrchu rohovky. Kontakt této vrstvy s testovanou látkou se může projevit snížením životnosti buněk modelové tkáně. Tento efekt je kvantitativně dobře stanovitelný pomocí speciálního barviva, které se aktivuje důsledkem metabolické aktivity živých buněk. U buněk poškozených kontaktem se zkoušenou látkou nedochází ke změně zbarvení nebo jen v malé míře. Intenzita zbarvení měřená spektrofotometricky je tedy nepřímou úměrná toxicitě. Další schopností těchto biologických modelů je uvolňování protizánětlivých mediátorů jako reakce na testovanou toxickou látku nebo možnost stanovení míry propustnosti tkáně po aplikaci látky. Vědecké studie považují tyto modely za dostatečně citlivé i pro testování látek s mírným dráždivým potenciálem¹⁵. Několik těchto metod bylo validováno na úrovni ECVAM a následně zařazeno jako OECD testovací postup č. 492, který umožňuje použití řady komerčních tkáňových modelů¹⁶.

Posledním uváděným typem biologických modelů, které jsou využívány v rámci alternativních metod oční dráždivosti, jsou vybrané buněčné linie, které napodobují epitel vnější vrstvy rohovky. Tyto 2D modely byly používány mezi prvními, ale dnes jsou postupně nahrazovány jinými biologickými systémy, které svou stavbou a citlivostí více odpovídají reálné odpovědi lidského nebo zvířecího oka. Metodiky jsou založeny na klasických principech detekce cytotoxicity např. pomocí neutrální červeně. Měření prostupu fluoresceinu přes buněčnou vrstvu lze současně hodnotit narušení vazeb mezi buňkami buněčné kultury jako reakci na kontakt s toxickou/dráždivou látkou¹⁷. Jedinou OECD doporučenou metodou pro tento typ biologického modelu je fluoresceinový test propustnosti (Fluorescein Leakage Test) pro identifikaci leptavých a silně dráždivých chemických látek (OECD TG. No. 460) z roku 2017 (cit.¹⁸).

Výše uvedené skupiny alternativních biologických modelů jsou modely pro oční rohovku. Další důležitou součástí oka pro posouzení míry podráždění je oční spojivka. Na rozdíl od rohovky je oční spojivka a její cévní struktura jako funkční celek komplikovanější, proto bylo obtížnější najít příslušný alternativní biologický model. Zatím jediným vědecky ověřeným modelem je chorioanlotoidní membrána (CAM) oplozených ptačích vajec, která

v určité fázi vývoje zárodku strukturou připomíná cévní řečiště spojivky savců^{19,20}. CAM reaguje na kontakt s dráždivými látkami srovnatelně s lidskou spojivkou³. Míra poškození se stanovuje na základě rychlosti nástupu pozorovaných lézí (hemoragie, vasodilatace, vasokonstrikce, koagulace) po aplikaci testované látky.

Doposud nebyl vyvinut ani validován žádný biologický model pro lidskou duhovku. Vzhledem k tendenci podceňovat dráždivý potenciál látek působících výrazněji na duhovku nebo spojivku²¹ měl by být tento specifický účinek zohledněn také při vývoji nových strategií, které by plně nahradily komplexní *in vivo* test na králících.

4. Příklady testovacích metodik využívajících různé typy alternativních modelů

4.1. Zkouška na hovězích rohovkách

Zkouška opacity a propustnosti na hovězích rohovkách je známá pod zkratkou BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability). Byla publikována jako testovací metoda OECD v roce 2009 a následně revidována v roce 2017. Biologickým modelem je izolovaná hovězí rohovka, která si krátkodobě udržuje základní fyziologické a biochemické funkce. Oční bulvy jsou získávány z mladých jatečných zvířat, vhodných pro vstup do potravinového řetězce lidí. V laboratoři jsou z bulev vyjmuty rohovky. Nepoškozené izolované tkáně jsou po prvotní selekci na tloušťku, poškození a nízkou úroveň primárního zákalu umístěny do speciálních držáků, kde ve speciálním mediu (EMEM – Eaglovo minimální esenciální medium) vytváří model hovězího oka. Toto buněčné kultivační médium obsahuje aminokyseliny, soli, glukosu a vitaminy. Zkoušené látky se aplikují neředěné na epitelální povrch rohovky v množství plně pokrývající povrch u pevných látek nebo 750 μ l u kapalin. Principem zkoušky je změna zákalu rohovky po expozici zkoušenou látkou. Zákal se měří kvantitativně jako množství průchodu světla pomocí opacimetru. Propustnost se měří kvantitativně (spektrofotometricky) jako množství barviva fluoresceinu sodného, který projde celou tloušťkou rohovky. Toxicita látek se projevuje sníženou propustností světla (zvýšeným zákaelem) a zvýšenou propustností barviva fluoresceinu. Celkové hodnocení dráždivosti látek se stanovuje na základě vypočteného parametru IVIS (*In Vitro* Irritancy Score), který zahrnuje oba sledované ukazatele¹².

Testovací metoda OECD je použitelná pro široké spektrum chemických látek a směsí, protože předepisuje samostatný postup pro aplikaci a následnou expozici pevných látek a samostatný postup pro látky kapalné. Princip měření míry poškození je pro oba typy látek stejný. Problematické je použití této metody pro chemické látky barvené a látky vysoce viskózní. Tyto látky ulpívají po aplikaci na rohovkách a metodikou doporučený systém oplachování není dostatečný pro jejich odstranění. Výsledky měření opacity jsou v těchto případech zkreslené. Určitou možností se ukazuje použití dvofázového systému odstranění látek z rohovek za použití jemného mechanického

odstranění a oplachu polárním (např. EMEM) a nepolárním (např. rostlinný olej) činidlem²².

4.2. Zkouška na rekonstruovaném 3D modelu lidské rohovky

Zkouška byla vydána jako testovací metoda OECD v roce 2017, kdy byly doporučeny první dva tkáňové modely. V roce 2019 byla aktualizována a také byl rozšířen seznam doporučených tkáňových 3D modelů (LabCyte CORNEA-MODEL24, MCTT HCETM, EpiOcularTM OCL-200, SkinEthicTM HCE/S, LabCyte CORNEAMODEL24 a MCTT HCETM RhCE)¹⁶.

Při zkoušce se používá vícejamková mikrotitrační deska obsahující v každé jamce tkáň na živné agaróze, která udržuje fyziologické vlastnosti modelu. Kontakt modelu s toxickou látkou se projevuje snížením životaschopnosti buněk. Tkáň se dodávají chlazené a je nutné zachovávat předepsaný teplotní režim při uchování, preinkubaci a následném experimentu. Kapalně vzorky i pevné látky se aplikují přímo na tkáňové terčíky, a to v předepsaném množství 50 μ l. Délka expozice je 30 min pro kapaliny a 90 min pro pevné látky. Po expozici a následné postinkubaci jsou tkáně přeneseny do roztoku MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), kde dochází k jejich obarvení. Vitální žluté barvivo MTT je zdravými buňkami mitochondriálně přeměněno na fialový formazan ((*E,Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-difenylformazan). Pro stanovení intenzity obarvení je nutno barvivo z tkání extrahovat pomocí propan-2-olu. Intenzita zbarvení, tzv. optická hustota, je měřena spektrofotometricky. Porovnáním s hodnotami negativní kontroly je vypočtena životnost buněk. Pokles životnosti pod 60 % znamená pozitivní výsledek a látku je možno označit jako dráždivou¹⁶.

4.3. Zkouška oční dráždivosti na chorioalantoidní membráně slepičího embrya

Tato zkouška jako jediná využívá model pro oční spojivku a je známá pod zkratkou HET-CAM (Hen's Egg-Chorioallantoic Membrane Test). Metodika je popsána v ICCVAM protokolu pro zjišťování oční dráždivosti (Koordinační výbor pro validaci alternativních metod)²³. Testovacím modelem jsou oplozená slepičí vejce, která jsou vhodným organotypickým modelem pro spojivkovou tkáň oka. Používají se pouze oplozená vejce od slepic plemene Leghorn o předepsané hmotnosti. Po přepravě do laboratoře jsou vejce inkubována v definovaných teplotních a vlhkostních podmínkách za současného otáčení do devátého dne inkubace. V tento den je skořápka v oblasti nad vzduchovou bublinou odpreparována a papírová blána je zvlhčena fyziologickým roztokem (0,9 hm.% vodný roztok NaCl). Po další inkubaci je papírová membrána odstraněna a vejce je připraveno na aplikaci testované látky, kdy se umístí pod stereomikroskop s nastaveným zvětšením 100 \times . Výhodou je použití záznamového zařízení pro nahrávání průběhu reakce a času. Testované látky se aplikují neředěné přímo na chorioalantoidní membránu v množství 0,3 ml nebo 0,3 g. Ihned po aplikaci se pozorou-

jí viditelné změny na membráně. Po stanovenou dobu (obvykle nepřesáhne 300 s) je sledována přítomnost hemoragií (krvácení z cév), vaskulární léze a koagulace vaskulárních proteinů. Výpočet iritačního skóre vychází z numerických hodnot přiřazených nástupu jednotlivých lézí v pevně stanovených časových intervalech. Podle výše iritačního skóre se přiřazuje stupeň dráždivosti.

Tato zkouška patří mezi zkoušky doporučené ECVAM, ale doposud nebyla mezinárodně validována a není zařazena mezi schválené metody OECD. Nevýhodou zkoušky je subjektivnost hodnocení nástupu i intenzity sledovaných lézí. Publikovány již byly postupy navrhuující objektivní kvantitativní postupy pro vyhodnocení reakce tkáně na kontakt s testovanou látkou např. použitím barevných činidel²⁴.

5. Výhody a nevýhody biologických modelů pro testování chemických látek

Podráždění oka u lidí i zvířat se projevuje různě intenzivními změnami především na spojivce a rohovce a je doprovázeno systémovou reakcí očí jako je slzení nebo intenzivní mrkání. Také složení slz se při podráždění oka mění, např. stoupá množství obsaženého endorfinu a dalších látek tlumících bolest. Oproti komplexnosti *in vivo* modelu jsou alternativní modely cíleny pouze pro jednu část oka, a to pro rohovku nebo spojivku. Pro další *in vivo* sledovanou část oka duhovku zatím není k dispozici žádný model a ani systémovou reakci oka nelze doposud spolehlivě modelovat.

Slabé a silné stránky jednotlivých metod používajících *in vitro* biologické modely byly definovány při vývoji a následné validaci těchto metod, kdy jsou výsledky porovnávány s výsledky *in vivo* testů na králících²⁵.

Metody využívající izolované oči nebo oční rohovky jsou vhodné pro testování široké škály chemických látek bez ohledu na jejich rozpustnost. Metoda BCOP využívající hovězí rohovku je schopná s vysokou přesností identifikovat látky silně dráždivé. Mírně dráždivé látky (např. dusičnan amonný, dichlorobenzoyl-chlorid) obvykle poškozují pouze povrchový epitel. Silně dráždivé látky (např. imidazol, 30% trichloroctová kyselina) pronikají do hlubších vrstev. Mohou proniknout rohovkou a poškodit endotel²⁶. Při použití standardního testovacího postupu je proto identifikace látek mírně dráždivých obtížnější a méně přesná. Použití histologického vyšetření exponovaných rohovek může pomoci při přesnějším vyhodnocení²⁷. Nízká míra přesnosti pro oblast látek mírně dráždivých souvisí s vysokou mírou falešně pozitivních výsledků při testování alkoholů a ketonů. Při testování pevných zkušebních materiálů může docházet k mechanickému poškození povrchu rohovky, což také výrazně ovlivňuje výsledky²⁸.

Při použití prasečí rohovky není nutno ve srovnání s hovězí rohovkou řešit prevenci před encefalopatickým onemocněním (lidově nemocí šílených krav)²⁹, což je nespornou výhodou. Také anatomicky více připomíná lidskou rohovku, a to především strukturou a tloušťkou. Z tohoto důvodu jsou prasečí rohovky často používány

v oftalmologickém výzkumu³⁰. V některých publikacích je tento model považován za vhodný pro hodnocení dráždivosti očí u kapalných a ve vodě rozpustných látek²⁹. Metoda využívající tento model nebyla doposud přijata regulačními orgány, které zřejmě upřednostňují BCOP. Modely využívající izolované oči nebo oční rohovky jsou hranicí mezi *in vivo* a *in vitro* systémy a jejich výhodou je vyšší etická přijatelnost¹⁹ a nižší náklady oproti *in vivo* i většině *in vitro* modelů. Nevýhodou je opět anatomická rozdílnost od lidské rohovky, ale také mezidruhové odlišnosti jednotlivých modelů^{31,32}. V těchto studiích současně nelze vyhodnotit všechny ostatní toxikologické parametry oční dráždivosti, jako jsou zánětlivá reakce, reverzibilita změn³³ a systémové účinky látek, např. letalitu některých pesticidů²⁷. Další nevýhodou se ukazuje relativně krátká doba pro hodnocení reakce rohovky (4 h), což neumožňuje testování v prodloužených časových schématech.

Tyto nedostatky jsou společné pro všechny *ex vivo* metody využívající izolované orgány.

U testu HET-CAM většina provedených validačních studií prokázala významnou korelaci mezi tímto testem a Draizeho testem. Tato korelace *in vivo versus in vitro* prokázala dobré výsledky pro mírně dráždivé a nedráždivé chemické látky, jakož i pro povrchově aktivní látky (tenzidy)^{34–36}. Ačkoliv je zkouška HET-CAM v zásadě použitelná pro všechny typy chemikálií bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, testování pevných a nerozpustných nebo lepivých materiálů může komplikovat reprodukovatelnost výsledků zkoušek. U pigmentů a barviv může docházet k zabarvení CAM a následně tak komplikovat vyhodnocení reakce^{35,37}. Horší korelace výsledků *in vivo versus in vitro* byla pozorována u alkoholů a esterů³⁸.

Test poskytuje kvalitativní informace o možných účincích testovaných látek na spojivku, ale také je možno sledovat koagulaci bílkovin a výsledek využít pro odhad poškození rohovky²⁴, což by mohlo být jeho výraznou výhodou. Rozdílná stavba spojivkového modelu HET-CAM oproti rohovkovým modelům vyžaduje i jiné techniky vyhodnocení odezvy systému na kontakt s chemickou látkou¹¹. Obtížné je především hodnocení cévních reakcí a dalších změn na membráně³⁹. Nevýhodou se ukazuje náročnost vlastního provedení testu zahrnující řadu parametrů zhoršujících reprodukovatelnost výsledků při mezilaboratorním porovnání. Mezi tyto fáze patří subjektivní pozorování změn v membránové morfologii, průběh inkubace, původ vajec, způsob otevírání skořápky, použití pozitivních a negativních kontrol⁴⁰. Epiteliální 3D *in vitro* modely jsou oproti jiným modelům velmi křehké, což vyžaduje šetrné zacházení, aby nedošlo k vysušení a poškození tkáni. Odpojení buněk z 3D struktury v kultuře může vést k nesprávné interpretaci získaných výsledků⁴¹. Dalším omezením je modelace pouze epiteliální vrstvy, proto je nelze použít ke stanovení možných účinků látek pronikajících do stromatu a endotelu. U těchto modelů nelze sledovat reverzibilitu podráždění⁴² a lze je použít pouze pro modelaci reakce rohovky^{43–45}. Testy založené na buněčných modelech postrádají modelaci hormonálních, imunitních a nervových vlivů. Jejich výhodou je jednodu-

chost a dobrá reprodukovatelnost výsledků, ale bez zohlednění interakcí v rámci tak specializovaného orgánu, jako je oko¹¹, mají jako samostatné testy pouze omezené použití.

Tradiční buněčné *in vitro* modely pro oční dráždivost se většinou skládají z monovrstvy kultivovaných buněk a odezva těchto buněk na kontakt se zkoušenou látkou se stanovuje standardními cytotoxickými postupy. Obecně jsou měření cytotoxicity rychlá, jednoduchá a levná⁴⁶. Způsobů vyhodnocení je celá řada, což komplikuje vypracování jednotného protokolu testování a jeho následnou mezinárodní validaci. Publikovány jsou postupy hodnocení cytotoxicity pomocí zabudování thymidinu (1-[(2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5-methylpyrimidin-2,4-dion), použití různých typů barviv, měření úniku enzymu laktátdehydrogenasy (LDH) z buňky, fluoresceinové netěsnosti (FL) a další⁴⁷. Každá z těchto metod má své výhody i omezení a většinou se používá kombinace minimálně dvou.

Z 2D buněčných modelů OECD zahrnuje mezi doporučené testovací metody pouze zkoušku FL, která měří toxický účinek látek na základě zvýšené propustnosti sodné soli fluoresceinu (3',6'-dihydroxyspiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-3-on) epiteliální monovrstvou buněk. Množství prostoupeného fluoresceinu je úměrné míře poškození buněčných spojů. Metoda je vhodná pro identifikaci silně dráždivých, ve vodě rozpustných chemikálií jako součást stupňovité testovací strategie⁴⁸, která vyžaduje zapojení dalších *in vitro* nebo *in vivo* zkoušek. Tuto metodu nelze použít ke klasifikaci silných kyselin, viskózních a barevných látek⁴⁸. Buněčné kultury jsou obvykle vystaveny testovaným látkám, které byly naředěny kulturačním médiem⁴². Použití pro nerozpustné látky je z tohoto důvodu omezené⁴⁹. Standardizované laboratorní testování na buněčných kulturách je založeno na dlouhodobém použití jedné buněčné linie. Permanentní nebo imortalizované buněčné linie jsou výhodnější z hlediska dostupnosti, reprodukovatelnosti a snadné detekce poškození⁴².

6. Závěr

Z přehledu vyplývá, že nelze nahradit *in vivo* testování oční dráždivost pouze jedním alternativním testem, který by splňoval všechna sledovaná kritéria pro poškození očí a zánětlivé změny. K úplnému nahrazení *in vivo* testů oční dráždivosti je a bude nutno používat stupňovité testovací strategie využívající různé biologické modely. Bude velmi důležité tyto alternativní zkoušky dále modifikovat s cílem zlepšení způsobu vyhodnocení a predikce problematických *in vivo* koncových bodů, jako je reverzibilita, perzistence nebo mechanické podráždění.

V současné době národní a mezinárodní organizace doporučují používat pro testování chemických látek různé víceúrovňové testovací postupy obsahující kombinaci *in vitro* nebo *ex vivo* metod, s ohledem na jejich silné stránky. Mezinárodně validovány a OECD doporučeny jsou doposud pouze metody, které využívají modely oční

rohovky, což má své nevýhody. Zajímavou možností je kombinace dvou biologických modelů, jednoho pro spojivku a druhého pro rohovku. Tato kombinace se ukazuje jako jedno z perspektivních řešení, kterému zatím brání nedokončená validace zkoušky HET-CAM jak na úrovni ECVAM, tak následně v OECD.

Je nepravděpodobné, že jakýkoli jednotlivý test obsahující pouze jeden typ buněk či jeden typ tkáně bude schopen napodobit složitosti a fyziologické parametry systému *in vivo*. Oční dráždivost bude testována formou testovacích strategií využívajících stupňovitého testování. V oblasti vývoje zatím zůstává strategie rozlišující látky nedráždivé a mírně dráždivé, i když první vědecky ověřené návrhy strategií již byly publikovány. Při validaci a následném zapracování do příslušných legislativ musí být zvaženo také ekonomické hledisko, protože nové postupy by měly být dostupné, rychlé, bez nutnosti drahého vybavení testovacích laboratoří či vysokých nákladů na alternativní biologické modely.

LITERATURA

1. Wilhelmus K. R.: *Surv. Ophthalmol.* 493, 45 (2001).
2. Stephens M. L., Mak N. S., v knize: *Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing* (Allen D., Walters M., ed.), str 1. RSC, Publishing, Cambridge 2013.
3. Wilson S. L., Aherne M., Hopkinson A.: *Toxicology* 327, 32 (2015).
4. Draize J. H., Woodward G., Clavery H. O.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377 (1944).
5. Russell W. M. S.: *ALTA* 23, 298 (1995).
6. Nařízení komise (EU) č. 1152/2010 ze dne 8. prosince 2010, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku nařízení (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH).
7. EC Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 Amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, *Official Journal of the European Communities*, L66, 26-35, (2003).
8. Freeberg F., Nixon G., Reer P., Weaver J., Bruce R., Griffith J., Sanders III L. W.: *Appl. Toxicol.* 626, 7 (1986).
9. Prinsen M. K.: *Food Chem. Toxicol.* 34, 291 (1996).
10. Burton A. B. G., York M., Lawrence R. S.: *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 471 (1981).
11. Barile F. A.: *Pharm. Toxicol. Methods* 61, 136 (1986).
12. OECD (2018), Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 438: Isolated chicken eye test method for identifying I) chemicals inducing serious eye damage and II) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo 10. 11. 2019.
13. OECD (2017), Guidelines for the Testing of Chemi-

- cals Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo 1. 11. 2019.
14. <http://www.mattek.com>, staženo 1. 3. 2020.
 15. Maurer J. K., Parker R. D., Jester J. V.: *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106 (2002).
 16. OECD (2019): Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 438: Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (Rhce) Test Method For Identifying Chemicals Not Requiring Classification And Labelling For Eye Irritation Or Serious Eye Damage. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo 10. 11. 2019.
 17. Babich H., Borenfreund E.: *ATLA* 18, 129 (1990).
 18. OECD (2017): Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo 10. 11. 2019.
 19. Luepke N.: *Food Chem. Toxicol.* 23, 287 (1985).
 20. Luepke N., Kemper F.: *Food Chem. Toxicol.* 495, 24 (1986).
 21. Casterton P. L., Potts L. F., Klein B. D.: *J. Toxicol., Cutaneous Ocul. Toxicol.* 15(2), 147 (1996).
 22. Plodíková P., Pouzar M., Rösslerová Z., Prokopcová J.: *Toxicol. In Vitro* 29, 1389 (2015).
 23. ICCVAM – Recommended Test Method Protocol: Hen’s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET – CAM) test Method. Published 2010. (<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>), staženo 10. 11. 2019.
 24. NICEATM, 2006. In: D.o.H.a.H. Services (ed.), Current Status of in Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen’s Egg Test – Chorioallantoic Membrane Test Method. ICCVAM Publication, NIEHS Publication, North Carolina.
 25. Bagley D. M., Casterton P. L., Dressler W. E., Edelhauser H. F., Kruszewski F. H., McCulley J. P., Nussenblatt R. B., Osborne R., Rothenstein A., Stitzel K. A.: *Regul. Toxicol. Pharm.* 45, 206 (2006).
 26. Jester J. V., Li L., Molai A., Maurer J. K.: *Toxicol. In Vitro* 15, 115 (2001).
 27. OECD, 2009a. Test No. 438: Isolated chicken eye test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo 10. 11. 2019.
 28. Prinsen M. K.: *Toxicol. In Vitro* 20, 78 (2006).
 29. Van den Berghe C., Guillet M., Compan D.: *Toxicol. In Vitro* 19, 823 (2005).
 30. Lynch A. P., Ahearne M.: *Exp. Eye Res.* 108, 42 (2003).
 31. Reichl S., Bednarz J., Muller-Goymann C. C.: *Br. J. Ophthalmol.* 88, 560 (2004).
 32. Reichl S., Muller-Goymann C. C.: *Int. J. Pharm.* 250, 191 (2003).
 33. Guo X., Yang X. F., Yang Y., Hans R., Cai J. H., Xue J. Y., Tan X. H., Xie X. P., Xiong X. K., Huang J. M.: *Biomed. Environ. Sci.* 25, 359 (2012).
 34. Rougier A., Cottin M., DeSilva O., Roguet R., Catroux P., Tougic A., Dossou K.: *Lens Eye Toxic. Res.* 9(3-4), 229 (1992).
 35. Spielmann H., v knize: *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research* (Castell, Gomez-Lechon, ed.), str. 265. Academic Press, London 1997.
 36. Steiling W.: INVITTOX Protocol 96, 1994.
 37. Hagino S., Kinoshita S., Tani N., Nakamura T., Ono N., Konishi K., Iimura H., Kojima H., Ohno Y.: *Toxicol. In Vitro* 13(1), 99 (1999).
 38. Balls M. a 12 spoluařu: The report and recommendations of ECVAM workshop 34; Alternatives to laboratory animals, *ATLA*, 27, str. 53, 1999.
 39. Curren R. D., Harbell J. W.: *Altern. Lab. Anim.* 30, 69 (2002).
 40. Vinardell M., Mitjans M.: *J. Pharm. Sci.* 97, 46 (2008).
 41. Davila J. C., Rodriguez R. J., Melchert R. B., Acosta Jr. S. L.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 63 (1998).
 42. Reader S. J., Blackwell V., O’Hara R., Clothier R. H., Griffin G., Balls M.: *Toxicol. In Vitro* 4, 264 (1990).
 43. McLaughlin C. R., Tsai R. J. F., Latorre M. A., Griffith M.: *Front Biosci.* 14, 3326 (2009).
 44. Wilson S. E., Liu J. J., Mohan R. R.: *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 293 (1999).
 45. Wilson S. L., Yang Y., El Haj A. J.: *Tissue Eng., Part A* 20, 225 (2004).
 46. Takahashi Y., Koike M., Honda H., Ito Y., Sakaguchi H., Suzuki H., Nishiyama N.: *Toxicol. In Vitro* 22, 760 (2008).
 47. Huhtala A., v knize: *Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices. Biomaterials and Tissue Engineering Group*, (Ashammakhi N., ed.), http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_multifunctional/index.html, staženo 10. 11. 2019.
 48. OECD, 2012c. Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/>, staženo dne 10. 11. 2019.
 49. Van Goethem F., Adriaens E., Alepee N., Straube F., De Wever B., Cappadoro M., Catoire S., Hansen E., Wolf A., Vanparys P.: *Toxicol. In Vitro* 20, 1 (2006).

P. Plodíková^{a,b}, J. Chýlková^b, and O. Černík^b
^aResearch Institute of Organic Synthesis, Rybitví,
^bFaculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice): **Use of Alternative Biological Models for Eye Irritation Testing by Chemical Substances**

Chemicals may cause eye irritation or damage and the knowledge of this potential is mandated by the chemical legislation. The article provides an overview of alternative

biological models used in *ex vivo* and *in vitro* eye irritation testing, which is gradually replacing animal tests. Advantages and disadvantages in laboratory use are defined for the models and compared to the classical model *in vivo*. Organotypic models using isolated eyes of farm animals or fertilized eggs have proved to be very promising. Alternative models use only one part of the eye and therefore are not able to yield the same response as an *in vivo* test.

Keywords: eye irritation, *in vitro* methods, biological models, alternative methods, opacity and permeability test, chorioallantoic membrane