

NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK PRIMER SZEMIRRITÁCIÓS VIZSGÁLATA EPIOCLAR™ SZÖVETMODELL ALKALMAZÁSÁVAL

Buda István^{1} - Lehel József² - Szabó Rita¹ - Budai Péter¹*

¹MATE, Növényvédelmi Intézet Növényvédelmi Tanszék

²Állatorvostudományi Egyetem, Élelmiszer-higiéniai Tanszék

*istvan.buda@toxicoop.com

Összefoglalás

A jelenleg is még széles körben alkalmazott OECD 405 iránymutatást, amelynek alapja a Draize-féle primer szemirritációs teszt, nagyon sok kritika éri az eredmények szubjektív értékelése, de legfőképp a vizsgálatok során felhasznált állatok szenvedése miatt. Napjainkban számos *in vitro* módszer elérhető, melyek a körülményektől függően részben vagy akár teljes mértékben képesek kiváltani ezt az *in vivo* technikát. Ezen módszerek közé tartozik a rekonstruált emberi szaruhártyaszerű hámszöveten (EpiOcular™ szövet) végzett vizsgálat. A vizsgálatokba bevont öt különböző növényvédő szer irritáló hatásának elbírálása az alapján történt, hogy az expozíciós idő alatt milyen mértékben csökkent a sejtek életképessége, amelyet MTT teszttel határoztunk meg. Az öt vizsgált növényvédő szer közül négy mutatkozott irritáló tulajdonságúnak, míg egy vizsgálati anyag esetében nem volt megfigyelhető irritatív hatás az alkalmazott *in vitro* módszer alapján. A vizsgálati anyagok biztonsági adatlapján meglévő *in vivo* eredményekkel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az összes vizsgált anyag esetében a saját *in vitro* és az *in vivo* eredmények megegyeztek.

Kulcsszavak: szemirritáció, *in vitro*, Draize teszt, MTT módszer, EpiOcular™ szövet

Abstract

The *in vivo* Draize-test, which is based on the OECD 405 guideline, is one of the most criticized *in vivo* methods, because of the subjective nature of the clinical observations and injuries of the test animals. Nowadays, several *in vitro* tests are available which can be partly or totally replaced the *in vivo* eye irritation testing depending on the circumstances. The EpiOcular™ model is one of these alternative methods. Five different agrochemicals were examined with this method and the irritation potential of the test items were predicted by measurement of their cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay, on the EpiOcular™ tissue. Four test items showed irritation potential and one test item did not show irritation potential out of five examined test items. Compared these results with the available information about *in vivo* data of the tested agrochemicals, all test items are corresponded to them.

Keywords: eye irritation, *in vitro*, Draize test, MTT assay, EpiOcular™ tissue

Bevezetés

A növekvő társadalmi nyomás hatására sürgetővé vált olyan alternatív módszerek kifejlesztése, amelyek képesek kiváltani a Draize-féle szemirritációs vizsgálati módszert. Ezen alternatív módszerek közé tartoznak azok az *in vitro* technikák is, ahol szövettenyészetet használva váltják ki a kísérleti állatok felhasználását a toxikológiai vizsgálatokban. Azonban ezek az eljárások jelen formájukban csak bizonyos feltételek mellett alkalmasak az *in vivo* Draize-féle szemirritációs teszt teljes mértékű kiváltására, melynek legfőbb oka, hogy ezen *in vitro* vizsgálati rendszerek viszonylag rövid ideig tarthatók fenn (pár órától maximum pár napig). Így

nem tanulmányozhatók velük megbízhatóan a kémiai irritáció eredményeként jelentkező szövetkárosodások reverzibilitása, mely fontos szempont az irritatív hatás értékelésénél. Ezen hiányosságuk következtében önmagukban jelenleg nem alkalmasak az enyhe és a mérsékelt irritációs potenciálok tanulmányozására. Kísérleteink során öt különböző növényvédőszer irritatív hatását tanulmányoztuk a rekonstruált emberi szaruhártyaszerű hámszöveten (OECD 492, 2019). Vizsgálatunk során célul tűztük ki mind az öt vizsgálati anyag irritációs potenciáljának meghatározását az alkalmazott *in vitro* módszerrel, valamint ezek összehasonlítását a rendelkezésre álló *in vivo* eredményekkel azért, hogy az *in vitro* teszt jövőbeni alkalmazhatóságát is értékelni tudjuk.

Anyag és módszer

A vizsgálatok során a következő növényvédő szerek kerültek felhasználásra: Amega Up, Movento, Orius 20 EW, Systhane 20 EW és Topas 100 EC. A kísérleti anyagokat hígítás nélkül alkalmaztuk. Az EpiOcular™ szöveteken végrehajtott vizsgálatainkat az OECD 492 irányelv alapján végeztük. Az egyéjszakás előinkubációt követően előnedvesítettük az egységek felszínét Dulbecco foszfát pufferelt sóoldattal (DPBS) (20 µl/hámszövet), amit egy fél órán át tartó előinkubáció követett a standard inkubálási körülmények között (37±2 °C, 5±1% CO₂ és ≥95% páratartalom). Ezután történt a kezelés, ahol a vizsgált növényvédő szereket (50 µl/hámszövet) egy pipetta segítségével juttattuk a hámszövet felszínére. Az expozíciós idő minden esetben 30±2 perc volt, amelynek végén a tesztanyagot lemostuk. Első lépésben a hámszövet felszínéről leöntöttük a növényvédő szert, majd ezt követően egy kb. 150 ml DPBS oldatot tartalmazó pohárba merítettük az egységet és körkörös mozgással mostuk. A mosást követően történt az utóáztatás, ahol az egységeket tápközeggel töltött üregekbe helyeztük és 12±2 percen keresztül tartottuk abban. Ezt követően az egységeket friss és előmelegített tápközeggel tartalmazó üregekbe helyeztük és két órán át inkubáltuk standard körülmények

között. Az utóinkubációt követően az egységeket a 3- (4, 5-dimetil-tiazol-2-il) -2, 5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) oldatot tartalmazó üregekbe helyeztük és három órán keresztül standard körülmények között, fénytől védve inkubáltuk. Az élő sejtekben lévő dehidrogenáz enzim hatására a sárga színű MTT átalakul formazánná. A felhámshövet lilás, kékes elszíneződése a képződő formazán csapadéknak volt köszönhető. Az MTT oldattal történő inkubációt követően az egységeket áthelyeztük izopropanollal feltöltött üregekbe, majd az egységeket tartalmazó lemezeket parafilmmel légmentesen lezártuk és 2-3 órán át rázattuk. A rázatást követően az egységeket eltávolítottuk az izopropanolos oldatból. Az egységek eltávolítása után visszamaradt formazán oldatot tartalmazó üregek mindegyikéből $2 \times 200 \mu\text{l}$ -t egy 96 lemez üregeibe pipettáztunk. A kapott minták abszorbanciáját (OD) spektrofotométerrel 570 nm hullámhosszon megmértük az izopropanolt használva vakként ($8 \times 200 \mu\text{l}$). A kapott eredmények értékelését Microsoft Excel program segítségével végeztük el az OECD 492 irányelvben, illetve a módszerhez tartozó szabvány műveleti előírásban szereplő algoritmus alapján. Az EpiOcular™ szöveteken végrehajtott vizsgálati módszer esetében a sejtek átlagos százalékban kifejezett életképességét határozzuk meg a negatív kontrollhoz viszonyítva. Ha a kapott százalékos életképesség a vizsgált vegyi anyag esetében a meghatározott 60%-os küszöbérték vagy annál nagyobb, a vizsgálati anyag nem rendelkezik szemirritációs potenciállal. Azonban, ha a kapott átlagos százalékban kifejezett életképesség a küszöbérték (60%) alatt van, az anyag szemirritálónak tekinthető. Ennek alapján ezzel a módszerrel abban az esetben, ha nem kerül kategóriába (nem kategorizálható), lehetséges a vegyi anyag osztályba sorolása, mint szemirritációs hatást nem okozó anyag. Minden egyéb esetben további *in vivo*, illetve *in vitro* vizsgálatok szükségesek a végső osztályba soroláshoz. A vizsgálatok során párhuzamosan pozitív és negatív kontroll egységeket is alkalmaztunk. A kontroll egységek használata (inkubáció, kezelés, mosás stb.) megegyezett a vizsgálati anyag esetében leírtakkal. A vizsgálatok során alkalmazott pozitív (metil-acetát) és negatív (steril desztillált víz) kontroll

anyagok minden esetben a várt eredményt hozták. Így az elvégzett vizsgálatok érvényesnek tekinthetők.

Eredmények

Az *in vitro* kísérleteink során az EpiOcular™ módszerrel meghatározott átlagos relatív életképesség az Orius 20 EW, a Systhane 20 EW és Topas 100 EC esetében volt a legalacsonyabb. Az Amega Up esetében az *in vitro* EpiOcular™ módszerrel meghatározott átlagos relatív életképesség bár magasabb volt az Orius 20 EW, a Systhane 20 EW és Topas 100 EC esetében mértekhez képest, de mivel nem érte el a küszöbértéket, így az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az Amega Up, az Orius 20 EW, a Systhane 20 EW és a Topas 100 EC irritáló tulajdonságúak (1. táblázat). A Movento növényvédő szer esetében az *in vitro* EpiOcular™ módszerrel meghatározott átlagos relatív életképesség jelentősen meghaladta a küszöbértéket, így arra az eredményre jutottunk, hogy a Movento inszekticid nem rendelkezik irritatív hatással (1. táblázat).

1. táblázat A vizsgált növényvédő szerek vizsgálata során az EpiOcular™ módszerrel meghatározott átlagos relatív életképességek, valamint az *in vitro* és *in vivo* irritációs potenciálok

Tesztanyag	EpiOcular™ módszerrel	<i>in vitro</i> irritációs potenciál	<i>in vivo</i> irritációs potenciál*
	meghatározott átlagos relatív életképesség (%)		
Amega Up	16	Irritatív	Irritatív
Orius 20 EW	4	Irritatív	Irritatív
Systhane 20 EW	2	Irritatív	Irritatív
Topas 100 EC	4	Irritatív	Irritatív
Movento	97	Nem irritatív	Nem irritatív

* a biztonsági adatlapok alapján

Eredmények értékelése

Az *in vitro* EpiOcular™ módszerrel kapott kísérleti eredményeinket összehasonlítva a biztonsági adatlapokról elérhető *in vivo* irritációs eredményekkel azt tapasztaltuk, hogy mind az öt növényvédő szer esetében egyezés mutatkozott az *in vitro* és *in vivo* eredmények között, ez 100%-os pontosságot jelent. Az *in vivo* és *in vitro* irritációs eredmények megegyeztek az irritatív és a nem irritatív növényvédő szerek esetében is, így az érzékenység 100%. A vizsgálatba vont növényvédő szerek közül egy (Movento) nem rendelkezett szemirritációs potenciállal az *in vivo* eredmények alapján és négy (Amega Up, Orius 20 EW, Systhane 20 EW, Topas 100 EC) növényvédő szer rendelkezett irritációs potenciállal, amely mind a tévesen pozitív, mind a tévesen negatív eredmény esetében 0%-ot eredményezett (1. táblázat). Ezen összehasonlító eredmények alapján az *in vitro* EpiOcular™ módszer alkalmasnak mutatkozik a folyékony halmazállapotú növényvédő szerek irritációs potenciáljának meghatározására bizonyos korlátok figyelembevételével. Az irritatív hatás esetében ezen *in vitro* módszer nem alkalmas az irritáció súlyosságának (enyhe, mérsékelt, súlyos) megítélésére jelen vizsgálati körülmények között. Kolle és mtsai (2015) 97 db folyékony halmazállapotú mezőgazdasági kémiai anyag irritatív hatását tanulmányozták az *in vitro* BCOP és az EpiOcular™ módszerekkel. Az *in vitro* eredményeik *in vivo* eredményekkel történő összehasonlítása során megállapították, hogy a nem irritatív vegyi anyagok esetében az EpiOcular™ teszttel meghatározott *in vitro* eredmények esetében az érzékenység 91%-os, a specifitás 72%-os és a pontosság 82% volt. Ezek alapján megállapították, hogy az *in vitro* EpiOcular™ teszt jól alkalmazható az ilyen típusú kémiai vegyületek irritatív hatásának vizsgálatára. Az *in vitro* EpiOcular™ teszt elővizsgálati módszerként alkalmas az emlős kísérleti állatok számának csökkentésére. Más szerzők (Budai és mtsai, 2021; Tavaszai és mtsai, 2008) véleményével összhangban elmondhatjuk, hogy az EpiOcular™ teszt további alternatív tesztekkel (HET-

CAM teszt, ICE teszt) kombinálva egy *in vitro* tesztrendszer formájában képesek az *in vivo* teszt teljes irritációs potenciálját lefedő kiváltásra.

Irodalom

Budai, P., Kormos, É., Buda, I., Somody, G. and Lehel, J. 2021. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. *Toxicology in Vitro*. **47**. 105150.

Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. 2015. The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for the *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular Eye Irritation Test and BCOP Test Data According to the UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA Classification Schemes. *ATLA*. **43**. 181–198.

OECD 405, 2012. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, No. 405, „Acute Eye Irritation/Corrosion” 02 October 2012.

OECD 492, 2019. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, No. 492, “Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage” 18 June 2019.

EpiOcular™ Eye Irritation Test (OCL-200-EIT) SOP; For the prediction of acute ocular irritation of chemicals. For use with MatTek Corporation’s Reconstructed Human EpiOcular™ Model (02 February 2021).

Tavaszi, J., Budai, P., Pálovics, A. and Kismányoki, A. 2008. An alternative test battery in detecting ocular irritancy of agrochemicals. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. **73**(4). 891-895.