

## **IN VITRO TECHNIKÁK A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK SZEMIRRITÁCIÓS TULAJDONSÁGÁNAK VIZSGÁLATÁRA**

*Buda István<sup>1\*</sup> - Lehel József<sup>2</sup> - Nadhirah Binti Saidon<sup>1</sup> - Szabó Rita<sup>1</sup> - Budai*

*Péter<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>MATE Növényvédelmi Intézet, Növényvédelmi Tanszék*

*<sup>2</sup>Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszer-higiéniai Tanszék*

\*istvan.buda@toxicoop.com

### **Összefoglalás**

A Draize-féle primer szemirritációs tesztet nagyon sok kritika éri az eredmények szubjektív értékelése, de legfőképp a vizsgálatok során felhasznált állatok szenvedése miatt. A napjainkban elérhető alternatív módszerek a körülményektől függően részben vagy akár teljes mértékben képesek kiváltani ezt az *in vivo* tesztet. Ezek közé tartozik a rekonstruált emberi szaruhártyaszerű hámszöveten (EpiOcular<sup>TM</sup> szövet) végzett vizsgálat, valamint az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló szemirritációs teszt. A vizsgálatokba bevont növényvédő szerek szemirritáló hatásának meghatározása az EpiOcular<sup>TM</sup> szövet modell esetében a sejtek életképességének csökkenésén alapult a negatív kontrollhoz viszonyítva, a sejtek életképességét MTT teszttel határoztuk meg. Az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló szemirritációs teszt elvégzése során a kezelést követően a szaruhártya-duzzadás, -homály és -károsodás mértékét az alap értékhez viszonyítva határoztuk meg és az így kapott végpontok kombinációjából következtettünk a vizsgálat anyag szemirritációs potenciáljára. A vizsgált növényvédő szerek szemirritáló tulajdonságúak voltak az alkalmazott *in vitro* módszerek

alapján. A rendelkezésre álló *in vivo* eredményekkel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az összes vizsgált anyag esetében a saját *in vitro* és az *in vivo* eredmények megegyeztek.

Kulcsszavak: szemirritáció, izolált csirkeszem, *in vitro*, MTT módszer, EpiOcular™ szövet

### Abstract

The *in vivo* Draize-test 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 alternative tests are available which can be partly or totally replaced the *in vivo* eye irritation testing depending on the circumstances. The EpiOcular™ model and the Isolated Chicken Eye Test (ICET) are part of these alternative methods. Four different pesticides were examined with these *in vitro* methods. The eye irritation potential of the test items in the EpiOcular™ model were predicted by measurement of their cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay. In the Isolated Chicken Eye Test the eye irritation potential of the test item was predicted based on the combination of the three endpoints: corneal swelling, corneal opacity and fluorescein retention. The based on the determination of each endpoint was the differences between values of the base line measurement and the values of any observation time points after the post-treatment rinse. Each test items showed irritation potential in both models. Compared these results with the available information about *in vivo* data of the tested pesticides, all test items are corresponded to them.

Keywords: eye irritation, Isolated Chicken Eye, *in vitro*, MTT assay, EpiOcular™ tissue

### Bevezetés

Napjainkra számtalan alternatív módszert dolgoztak ki a Draize-féle teszt kiváltására, melyek közé tartoznak azok az *in vitro* technikák is, ahol szövettenyészetet, illetve izolált szerveket használnak. Ezek az eljárások azonban 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. Ezáltal nem tanulmányozhatók velük megbízhatóan a kémiai irritáció eredményeként jelentkező szövetkárosodások reverzibilitása. Ezen hiányosságuk következtében önmagukban jelenleg nem alkalmasak az enyhe és a mérsékelt irritációs potenciálok tanulmányozására. Kísérleteink során a Nurelle D 50/500 EC, Pyninex 48 EC, Mystic 250 EW és a Systhane 20 EW növényvédő szerek irritatív hatását tanulmányoztuk a két *in vitro* modell segítségével. Vizsgálatunk célja annak megválaszolása volt, hogy az izolált csirkeszemen alapuló, valamint az EpiOcular™ modellen végrehajtott *in vitro* tesztek eredményei milyen mértékben korrelálnak egymással, és alkalmasak-e a Draize-féle *in vivo* primer szemirritációs teszt részleges kiváltására növényvédő szerek szemirritációs tulajdonságainak vizsgálata során.

### Anyag és módszer

A kísérleteinkben alkalmazott növényvédő szerek a Nurelle D 50/500 EC, Pyninex 48 EC, Mystic 250 EW és a Systhane 20 EW voltak. Az izolált csirkeszemen végrehajtott teszt során közvetlenül a kezelés előtt referencia értéként megmértük a vágóhídról származó csirkeszemek szaruhártya-vastagságát, ill. meghatároztuk a szaruhártyahomály és a fluoreszcein-megtartás mértékét. A referencia értékekhez viszonyítva határozzuk meg a három vizsgálatvégpont (szaruhártyahomály, vastagság és fluoreszcein-megtartás) esetében bekövetkező változás mértékét. A tapasztalt különbségek kiértékelése a módszerleírásban (OECD Guideline 438, 2018) található táblázatok használatával történt. Az EpiOcular™

szöveteken végrehajtott vizsgálatainkat az OECD 492 (2019) irányelv alapján végeztük. 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 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.

### Eredmények

A vizsgált növényvédő szerek izolált csirkeszemen végrehajtott tesztekben kapott *in vitro* szemirritációs kategóriáit az 1. táblázat, míg az EpiOcular™ szövet konstrukcióval végzett tesztkben meghatározott *in vitro* irritációs potenciáljait a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A vizsgált növényvédő szerek izolált csirkeszemen végrehajtott tesztből származó *in vitro* irritációs kategóriái

Növényvédő szer	A három végpont kombinációja	GHS Kat.
Nurelle D 50/500 EC	1xII, 2xIII	Kat.2
Pyrinex 48 EC	1xIII, 2xIV	Kat.1
Mystic 250 EW	1xII, 1xIII, 1xIV	Kat.2
Sythane 20 EW	2xI, 1xIII	Kat.2

2. táblázat A vizsgált növényvédő szerek EpiOcular™ szövet konstrukcióval végzett vizsgálatban meghatározott *in vitro* irritációs potenciáljai

Növényvédő szer	Relatív Életképesség (%)	Irritációs potenciál
Nurelle D 50/500 EC	6	Irritáló
Pyrinex 48 EC	11	Irritáló
Mystic 25 0EW	2	Irritáló
Sythane 20 EW	2	Irritáló

### Eredmények értékelése

Az izolált csirkeszemen végrehajtott teszt eredményei alapján a Pyrinex 48 EC súlyosan irritáló tulajdonságú, a Nurelle D 50/500 EC, Mystic 250 EW és a Systhane 20 EW pedig irritáló tulajdonságúak. Ezen eredmények megfelelnek a vizsgált készítményekről rendelkezése álló irodalmi adatoknak. Az EpiOcular™ szövetkonstrukcióval végzett tesztek eredményei alapján a Nurelle D 50/500 EC, Pyrinex 48 EC, Mystic 250 EW és a Systhane 20 EW szemirritálónak mutatkoztak, amelyek megfelelnek a vizsgált készítményekről rendelkezése álló irodalmi adatoknak.

3. táblázat A vizsgált növényvédő szerek *in vitro* tesztekben kapott *in vitro* irritációs kategóriái és a biztonsági adatlapokon szereplő *in vivo* szemirritációs kategóriák

Növényvédő szer	GHS kategória az izolált csirkeszemes teszt alapján	Irritációs potenciál az EpiOcular™ teszt alapján	<i>In vivo</i> eredmények GHS kategória
Nurelle D 50/500 EC	Kategória 2	Irritáló	Kategória 2
Pyrinex 48 EC	Kategória 1	Irritáló	Kategória 1
Mystic 25 0EW	Kategória 2	Irritáló	Kategória 2
Systhane 20 EW	Kategória 2	Irritáló	Kategória 2

Az *in vitro* tesztekkel kapott eredményeinket összehasonlítva a biztonsági adatlapokról elérhető *in vivo* irritációs eredményekkel (3. táblázat) azt tapasztaltuk, hogy mind a négy 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 súlyosan irritatív növényvédő szerek esetében is, így az érzékenység 100%. A vizsgálatba vont növényvédő szerek közül a Pyrinex 48 EC rendelkezik súlyos szemirritációs potenciállal az *in vivo* eredmények alapján. A Nurelle D 50/500 EC, a Mystic 250 EW és a Systhane 20 EW növényvédő szerek irritációs potenciállal rendelkeznek, amely mind a tévesen pozitív, mind a tévesen negatív eredmény esetében 0%-ot eredményezett. Eredményeink alapján mindkét vizsgálati módszer alkalmas a folyékony halmazállapotú növényvédő szerek irritációs potenciáljának meghatározására bizonyos korlátok figyelembevételével. Az irritatív hatás

esetében sem az izolált csirkeszemes módszer (Adriaens és mtsai., 2014), sem az EpiOcular™ szövetmodellt alkalmazó teszt önmagában nem alkalmas az irritáció súlyosságának megítélésére (Kolle és mtsai., 2015). Más szerzők (Budai és mtsai., 2021) véleményével összhangban elmondhatjuk, hogy az EpiOcular™ valamint az izolált csirkeszemes teszt további alternatív tesztekkel kombinálva egy *in vitro* tesztrendszer formájában képesek az *in vivo* teszt teljes szemirritációs potenciálját lefedő kiváltásra.

### Irodalom

Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M. and Zuang, V. 2014. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the *in vivo* endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of *in vitro* test methods. *Archives of Toxicology* 88. 701-723.

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* 74. 105150

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).

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 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.

OECD (Organisation for Economical Cooperation and Development) guideline 438 (2018): 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 guideline for testing of chemicals 438 (25 June 2018).