

## Peszticidek szemirritációs vizsgálata EpiOcular™ szövet modell alkalmazásával

**Buda István<sup>1\*</sup>, Lehel József<sup>2</sup> és Budai Péter<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Toxi-Coop Zrt, 8230 Balatonfüred Arácsi út 97-99.

<sup>2</sup>Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszer - higiéniai Tanszék, 1078 Budapest, István u. 2.

<sup>3</sup>Pannon Egyetem Georgikon Kar Növényvédelmi Intézet, 8360 Keszthely, Deák F. u. 16.

\*e-mail: 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. Napjainkban számos *in vitro* módszer elérhető, melyek részben vagy a körülményektől függően akár teljes mértékben képesek kiváltani ezt a technikát. Ezen módszerek közé tartozik a rekonstruált emberi szaruhártyaszerű hámszöveten (EpiOcular™ szövet) végzett vizsgálat. A vizsgálatokba bevont hét különböző peszticid irritáló hatásának elbírálása az alapján történt, hogy az expozíciós idő alatt milyen mértékben csökkent a sejtek életképessége, amelyet MTT teszttel határoztunk meg.

A hét vizsgált peszticid közül négy mutatkozott irritáló tulajdonságúnak, míg három vizsgálati anyag esetében nem volt megfigyelhető irritáló hatás az alkalmazott *in vitro* módszer alapján. A vizsgálati anyagok biztonsági adatlapján meglévő *in vivo* eredményekkel összehasonlítva a kapott *in vitro* eredményeinket azt tapasztaltuk, hogy két peszticid mutatkozott tévesen pozitívnak, míg a további vizsgálati anyagok esetében a kapott *in vitro* eredmények megegyeztek az *in vivo* eredményekkel. A tévesen pozitív eredmény ezen módszer esetében nem számít kritikusnak, mivel minden pozitív eredmény esetén további *in vitro* vizsgálat(ok) szükségesek a végső besoroláshoz.

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

### Abstract

*Draize*-test is one of the most criticized *in vivo* methods, because of the injuries of the test animals and subjective nature of the test in recording the results. 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 part of these alternative methods. Seven different pesticides were examined with this method and the irritation potential of the test item may be predicted by measurement of its cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay, on the EpiOcular™ tissue.

Four test items showed irritation potential and three test items did not show irritation potential out of seven examined test items. Compared to the results of these *in vitro* eye irritation studies with the available information about *in vivo* data of the tested pesticides, five test items are corresponded to them. However, two test items showed false positive result based on the data performed on experimental animals.

However, false positive results in this context are not critical, because all test chemicals that come out positive would be subsequently tested with other adequately validated *in vitro* method(s) for the determination of final classification.

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

### Bevezetés

A fokozódó társadalmi nyomás hatására sürgetővé vált olyan alternatív módszerek kifejlesztése, melyek részben vagy egészben képesek kiváltani a Draize-féle szemirritációs vizsgálati módszert. Ezekhez az úgynevezett alternatív módszerekhez tartoznak az *in vitro* technikák, amelyek szövettényészetet vagy például vágóhídon leölt állat valamely szervét alkalmazva váltják ki a kísérleti állatok felhasználását a toxikológiai vizsgálatokban.

Azonban jelenleg ezen eljárások egyike sem alkalmas önmagában az *in vivo* Draize-féle 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 okán önmagukban jelenleg nem alkalmasak az enyhe és a mérsékelt irritációs potenciálok tanulmányozására.

Kísérleteink során hét különböző, már használatban lévő peszticid vizsgálatát végeztük el rekonstruált emberi szaruhártyaszerű hámszöveten (OECD 492, 2019). Ezek során célul tűztük ki mind a hét vizsgálati anyag irritációs potenciáljának meghatározását az alkalmazott *in vitro* módszerrel.

### Anyag és módszer

A vizsgálatok során a következő peszticidek kerültek felhasználásra: Movento (100 g/l spirotramat), Chess 50 WG (50% pimetrozin), Ridomil Gold MZ 68 WG (38,8 g/kg metalaxil-M + 64% mankoceb), Karate Zeon 5 CS (50 g/l lambda-cihalotrin), Amistar Top (200 g/l azoxistrobin + 125 g/l difenokonazol), Champion WG (76.7% réz(II)-hidroxid), Folicur Solo (250 g/l tebukonazol). A kísérleti anyagokat hígítás nélkül alkalmaztuk.

Az EpiOcular™ szöveteken végrehajtott vizsgálataink alapja az OECD 492 irányelv. Az egyéjszakás előinkubációt követően előnedvesítettük az egységek felszínét DPBS oldattal (20 µl/hámszövet), amit egy fél órán át tartó előinkubáció követett a standard inkubálási körülmények között (37±2 °C, 5±1% CO<sub>2</sub> és ≥95% páratartalom). Ezután történt a kezelés, ahol a vizsgált peszticidet (50 µl/hámszövet) egy pipetta segítségével juttattuk a hámszövet felszínére. Az expozíciós idő minden esetben 30±2 perc volt, melynek végét a tesztanyag lemosása jelentette. Első lépésben a hámszövet felszínéről leöntöttük a peszticidet, majd ezt követően egy kb. 150 ml DPBS oldatot tartalmazó pohárba merítettük az egységet és körkörös mozgással mostuk. A mosás során tesztegységenként három poharat alkalmaztunk és mindegyik pohárban háromszor ismételtük meg a mosási folyamatot. A mosást követően történt az utóáztatás, ahol az egységeket médiummal töltött üregekbe helyeztük és 12±2 percen keresztül tartottuk. Majd ezt követően az egységeket friss és előmelegített médiumot tartalmazó üregekbe helyeztük és két órán át inkubáltuk standard körülmények között. Az utóinkubációt követően az egységeket MTT oldatot tartalmazó üregekbe helyeztük és három órán keresztül standard körülmények között fénytől védve inkubáltuk. Az élő sejtek dehidrogenáz enzimjeinek hatására a sárga színű MTT átalakul formazánná. A felhámszövet 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 ráztattuk. A rázatást követően az egységeket eltávolítottuk az izopropanolos oldatból. A visszamaradt oldatból üregenként 2×200 µl-t egy 96 lemez üregeibe pipettáztunk. A kapott minták abszorbanciáját (OD) spektrofotométerrel 570 nm hullámhosszon megmértük, az izopropanolt használva vakként (8×200 µl).

A kapott eredmények értékelését Microsoft Excel program segítségével végeztük el az OECD 492 irányelvben 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 (No Category), 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

A vizsgálatba vont hét peszticid közül négy vizsgálati anyag mutatkozott irritáló tulajdonságúnak, míg három vizsgálati anyag esetében irritáló hatás nem volt (1. táblázat).

A Champion WG, Folicur Solo, Ridomil Gold MZ 68 WG és a Chess 50 WG esetében az eredmények arra utalnak, hogy ezen vizsgálati anyagok irritáló vagy súlyosan irritáló tulajdonságúak (1. táblázat). Azonban a Ridomil Gold MZ 68 WG és a Chess 50 WG esetében az eredmények ellent mondanak a vizsgálati anyagokhoz tartozó biztonsági adatlapon szereplő *in vivo* eredményeknek, mely szerint ezen anyagok nem rendelkeznek szemirritáló tulajdonsággal az elérhető *in vivo* vizsgálati eredmények szerint (1. táblázat).

A Movento, Amistar Top, és a Karate Zeon 5 CS vegyi anyagok esetében az eredmények értékelése alapján nem irritáló tulajdonságúnak mutatkoztak (1. táblázat).

1. táblázat. A vizsgált peszticidek irritációs potenciáljai

Tesztanyag	EpiOcular™ módszerrel meghatározott átlagos relatív életképesség (%)	<i>In Vivo</i> irritációs potenciál a biztonsági adatlapok alapján (GHS)	Eltérés az <i>In Vitro</i> és <i>In Vivo</i> eredmények között
Amistar Top	82	nem irritáló (Nincs kategória)	azonos
Movento	108	nem irritáló (Nincs kategória)	azonos
Karate Zeon 5 CS	102	nem irritáló (Nincs kategória)	azonos
<b>Ridomil Gold MZ 68 WG</b>	<b>4</b>	<b>nem irritáló (Nincs kategória)</b>	<b>tévesen pozitív</b>
Champion WG	1	Súlyosan irritáló (Kategória 1)	azonos
Folicur Solo	6	Súlyosan irritáló (Kategória 1)	azonos
<b>Chess 50 WG</b>	<b>3</b>	<b>nem irritáló (Nincs kategória)</b>	<b>tévesen pozitív</b>

GHS: (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) a vegyi anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó globálisan harmonizált rendszer

### Megvitatás

A kapott eredményeinket összehasonlítva a biztonsági adatlapokról elérhető *in vivo* eredményekkel azt tapasztaltuk, hogy a hét vizsgált anyag közül öt anyag esetében mutatkozott egyezés az *in vitro* és *in vivo* eredmények között, ez 71%-os pontosságot jelent. A vizsgált anyagok közül öt nem rendelkezett szemirritációs potenciállal az *in vivo* eredmények szerint, ebből 2 tévesen pozitívnak mutatkozott, mely 40% tévesen pozitív eredménynek felel meg (1. táblázat). Két olyan vizsgálati anyag volt mely rendelkezett valamilyen mértékű irritációs potenciállal az *in vivo* eredmények szerint (1. táblázat). Ebből mindkettő peszticid esetében egyezés mutatkozott az *in vitro* eredményekkel, ami 0% tévesen negatív eredménynek felel meg (1. táblázat). Végül öt olyan vizsgálati anyag volt, amely nem rendelkezett irritációs potenciállal

az *in vivo* tesztek alapján (1. táblázat), ebből 3 peszticid esetében az *in vitro* teszt is egyezést mutatott, ami 60% érzékenységet jelent a nem irritáló hatás kimutatása tekintetében. Míg a két irritáló vizsgálati anyag esetében egyezés volt az *in vivo* és *in vitro* eredmények között, ami 100% érzékenységet jelent az irritáló hatás kimutatása tekintetében. Ezen eredmények alapján az általunk alkalmazott *in vitro* vizsgálati módszer alkalmasnak mutatkozik a peszticidek irritációs potenciáljának előrejelzésében, bizonyos korlátok figyelembevételével. Az irritatív hatás esetében nem alkalmas annak súlyosságának (enyhe, mérsékelt, súlyos) megítélésére jelen vizsgálati körülmények között.

Eredményeink megerősítik egy olyan vizsgálati sorozat eredményeit, melynek keretében 97 db agrokemikáliát vizsgáltak az általunk is alkalmazott *in vitro* módszerrel. (Susanne N. Kolle és mtsai., 2015). A 97 db vizsgálati anyagból 80 db készítmény esetében volt egyezés az *in vitro* és az *in vivo* módszerrel kapott eredmények között, ami 83% pontosságot jelent (2. táblázat). A vizsgálatba vont készítmények közül 43 db nem rendelkezett szemirritációs potenciállal az *in vivo* eredmények szerint, ebből 12 db tévesen pozitívnak mutatkozott, mely 28% tévesen pozitív eredménynek felel meg (2. táblázat). 54 db olyan vizsgálati anyag volt mely rendelkezett valamilyen mértékű irritációs potenciállal az *in vivo* eredmények szerint (2. táblázat). Ebből 49 db készítmény esetében mutatkozott egyezés az *in vitro* eredményekkel, ami 9% tévesen negatív eredménynek felel meg (2. táblázat). Végül 43 db olyan vizsgálati anyag volt, amely nem rendelkezett irritációs potenciállal az *in vivo* tesztek alapján (2. táblázat), ebből 31 db készítmény esetében az *in vitro* teszt is egyezést mutatott, ami 72% érzékenységet jelent a nem irritáló hatás kimutatása tekintetében. Míg az 54 db irritáló vizsgálati anyag esetében 49 db készítmény esetében volt egyezés az *in vivo* és *in vitro* eredmények között, ami 91% érzékenységet jelent az irritáló hatás kimutatása tekintetében.

2. táblázat. A vizsgált peszticidek *in vitro* és *in vivo* eredményeinek összehasonlítása (Forrás: Susanne N. Kolle és mtsai., 2015. 194 oldal 6-os táblázat)

		<i>In vivo</i>				
		No Cat.	Cat. 2B	Cat. 2A	Cat. 1	
EpiOcular-EIT	Rel. viability > 60%	31	1	4	0	36
	Rel. viability ≤ 60%	12	13	15	21	61
		43	14	19	21	97

EpiOcular-ETI: EpiOcular™ modellen végrehajtott *in vitro* szem irritációs teszt

Rel. Viability: Relatív életképesség a negatív kontrollhoz viszonyítva

### Hivatkozások

N. Kolle Susanne, Cecila Rey Morento Maria, Mayer Winfried, van Cott Andrew, van Ravenzwaay Bennard and Landsiedel Robert 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

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.