

Alternatywne metody *in vitro*

Badania podrażnienia oka

Część I

Joanna Organiściak-Plachta
Salt City Pharma Center

Jednym z elementów oceny bezpieczeństwa wielu rodzajów produktów jest ocena prawdopodobieństwa spowodowania podrażnienia, bądź uszkodzenia oka.



Do niedawna standardową metodą oceny potencjału drażniącego/ uszkodzającego substancji był opracowany w 1944 roku, test Draize podrażnienia oka królika.

Badanie to jednak w coraz większym stopniu krytykowano za brak powtarzalności wyników, przeszacowanie reakcji człowieka oraz okrucieństwo wobec zwierząt.

Niedawno wprowadzona Siódma poprawka Dyrektywy Kosmetycznej oraz europejskie przepisy REACH zwiększyły zapotrzebowanie na rozwój badań podrażnienia oka metodami *in vitro*. Zmiany ustawodawstwa oraz rosnąca presja organizacji broniących praw zwierząt stopniowo eliminują z użycia metody testowania składników kosmetyków na zwierzętach.

Do częściowego lub całkowitego zastąpienia zwierząt w eksperymentach toksykologicznych mogą być stosowane następujące systemy:

- metody *in vitro*: hodowle komórkowe, zrekonstruowane tkanki, systemy co-cultur
- *ex vivo*: wyizolowane zwierzęce tkanki i organy,
- *in silico*: symulacje komputerowe i modele matematyczne, np. QSAR

Idealnie byłoby zastąpić tradycyjną metodę badania na zwierzęciu jedną metodą alternatywną *in vitro*, co pozwoliłoby utrzymać prosty i ekonomiczny reżim testowania, oczywiście przy założeniu, że nowa metoda *in vitro* dostarczy danych równie dobrych lub lepszej jakości niż tradycyjne badania *in vivo*. Sprawa nie jest jednak taka prosta. Ogólnie badania *in vitro* zostały zaprojektowane do modelowania tylko jednej lub tylko kilku tkanek oka, ale

nie całego oka. Jest to bardzo przydatne w uzyskaniu bardziej szczegółowych danych mechanicznych procesu podrażnienia oka. Jednakże finalnie zmusza do zastąpienia jednego doświadczenia na zwierzętach kilkoma badaniami *in vitro*. Nie jest to bynajmniej niepożądane. Wykorzystanie kilku testów *in vitro* dokładnie obrazujących mechaniczne aspekty uszkodzenia oka, pozwoli nam prawdopodobnie dowiedzieć się więcej o faktycznym ryzyku stosowania chemikaliów przez ludzi.

Według Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych ECVAM, w przypadku podrażnienia oka ogólnie przyjmuje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości, żadne pojedyncze badanie podrażnienia oka *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić metody Draize, w przewidzeniu pełnego zakresu podrażnienia dla związków różnych klas chemicznych. Dopiero strategiczna kombinacja kilku alternatywnych metod badawczych (strategia wielopoziomowa) w obrębie jednej strategii badania mogłaby zastąpić badanie podrażnienia oka metodą Draize.

Definicje

Podrażnienie oka jest zdefiniowane jako spowodowanie zmian w oku, w następstwie zastosowania badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni od zastosowania.

Uszkodzenie oka (poważne uszkodzenie oka) jest zdefiniowane jako spowodowanie uszkodzenia tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia, w następstwie nałożenia badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie jest całkowicie odwracalne w ciągu 21 dni od zastosowania.



Oko

Aby zrozumieć interpretację wyników badania toksykologicznego, należy przybliżyć podstawową wiedzę z zakresu badanego narządu a przynajmniej zrozumieć jego morfologię, skład komórkowy oraz fizjologiczne funkcjonowanie – to pozwala określić, czy wystąpiły uszkodzenia i jakie są jego następstwa.

Oko jest bardzo skomplikowanym narządem, składającym się z wielu tkanek, z których każda inaczej reaguje na urazy. Być może najważniejszą tkanką oka jest rogówka. Zwykle przejrzysta rogówka pozwala światłu swobodnie wpadać do oka i ostatecznie skupić się na siatkówce. Jeśli rogówka jest mętna (nieprzezroczysta), co może się zdarzyć po przypadkowym narażeniu na działanie silnie drażniących substancji chemicznych – światło nie może już łatwo przenikać przez oko a widzenie jest zaburzone lub nawet całkowicie zablokowane. Choć powieki stanowią pewną ochronę dla rogówki, jest ona nadal bardzo narażona na uszkodzenie.

Okolo 80% struktury rogówki stanowi zrąb – regularnie uszeregowane makrocząsteczki, przez które światło może łatwo przenikać w wyniku wysokiego stopnia uporządkowania zrębu i właściwemu poziomowi nawilżenia.

Utrzymanie tego ważnego poziomu nawilżenia (75-80% wody) jest obowiązkiem dwóch aktywnych warstw komórkowych:

- jednokomórkowa warstwa śródbłonna (endothelium), pokrywająca powierzchnię wewnętrzną rogówki,
- i znacznie grubszy nabłonek (epithelium), który pokrywa powierzchnię zewnętrzną rogówki.

Te warstwy komórek współpracują razem, aby zapobiec przedostawaniu się dodatkowej ilości wody do rogówki, co mogłoby spowodować obrzęk i zmętnienie. Nabłonek ma również drugą funkcję, gdyż stanowi fizyczną barierę przed przedostawaniem się ciał obcych. Jeśli nabłonek jest uszkodzony, może doprowadzić do zmętnienia rogówki. Jednak drobne zmętnienia często są odwracalne, ponieważ nabłonek może ulec samoregeneracji poprzez ruch otaczających komórek na pokrycie rany lub przez wymianę uszkodzonej tkanki na komórki z nowego podziału. Natomiast śródbłonek nie jest na ogół zdolny do samoregeneracji. Dlatego też, jeśli komórki te ulegną cytotoksycznemu uszkodzeniu, konsekwencje mogą być znaczące, np. trwała ślepota. Tak wygląda zależność pomiędzy indukcją uszkodzenia komórek a rezultatem w postaci podrażnienia oka lub innego rodzaju uszkodzenia, co jest podstawą badań podrażnienia gałki ocznej *in vitro*.

Inną delikatną tkanką oka jest spojówka, niezrogowaciały nabłonek płaski, który wypełnia wewnętrzne powierzchnie powiek i większość zewnętrznej powierzchni gałki ocznej (stanowi ciągłość z rogówką). Spojówka jest silnie unaczyniona i może reagować stanem zapalnym po kontakcie z drażniącymi substancjami. Łagodnie drażniące chemikalia lub inne produkty często powodują zapalenie spojówek bez żadnych towarzyszących uszkodzeń rogówki.

Trzecią ważną tkanką oka jest tęczówka (kolorowa część oka), która przez zwężenie lub rozszerzenie, kontroluje ilość światła wpadającego do oka i ostatecznie skupiającego się na siatkówce. Tęczówka znajduje się pod rogówką w cieczy wodnistej. W niektórych przypadkach ciała obce przenikają całkowicie przez rogówkę i wchodzi w interakcję z tęczówką. Tęczówka może reagować stanem zapalnym i utracić zdolność do reagowania na światło, poważnie uszkadzając zdolność widzenia.

Obserwacje stopnia uszkodzenia każdej z tych tkanek w modelu zwierzęcym, zostały włączone jako część systemu oceny większości popularnych protokołów podrażnienia oka.

Generalnie proces testowania substancji składa się z kilku etapów:

- Pierwszy etap - określenie maksymalnego potencjalnego zagrożenia składnika lub preparatu dla tkanek oka.
- Drugi etap - biorący pod uwagę rzeczywiste wykorzystanie produktu oraz oszacowanie prawdopodobieństwa, że produkt może niechcący dostać się do oka.
- Trzeci etap - ostateczna ocena bezpieczeństwa, bierze pod uwagę korzyści, ryzyko i wpływ zastosowania instrukcji, które zazwyczaj towarzyszą produktowi.

Choć cały proces jest ważny, to pierwszy etap całego procesu - ogólnie nazywany identyfikacją zagrożeń - i rozwój udoskonalonych układów *in vitro* do wykrywania takich zagrożeń, są ważne.

Badanie Draize

W metodzie Draize chemikalia, mieszaniny oraz preparaty wprowadzane są bezpośrednio do worka spojówkowego oka królika. Drugie oko służy jako kontrola negatywna, a reakcja zwierząt jest monitorowana za pomocą ujednoliconego systemu punktacji uszkodzeń rogówki, spojówki i tęczówki. Odpowiedź oka jest kontrolowana po 1, 24, 48 i 72 godzinach. Zwierzęta są obserwowane do momentu oceny pełnej wielkości urazu oka i jego odwracalności – przez okres do 21 dni.

Miejscowe stosowanie środków chemicznych może powodować podrażnienie i / lub uszkodzenie rogówki poprzez:

- liżę błon (np. środki powierzchniowo czynne, rozpuszczalniki organiczne),
- denaturację białek (np. środki powierzchniowo czynne, rozpuszczalniki organiczne, alkalia i kwasy);
- zmydlanie lipidów (np. alkalia) oraz
- alkilowanie lub inne kowalencyjne interakcje z makrocząsteczkami (np. wybielacze, nadtlutki);

Odwracalność urazu oka jest ważnym elementem w klasyfikacji substancji jako drażniącej dla oka w porównaniu z uszkadzającą oko.

Znany od 1944 Test Draize podrażnienia oka królika wykorzystuje skomplikowany system punktacji, który odzwierciedla stopień uszkodzenia trzech głównych tkanek oka. Ponadto, oceniane są odwracalność oraz nasilenie objawów.

Zmodyfikowaną metodą Draize jest Low Volume Eye Test (LVET), która wykorzystuje jedną dziesiątą materiału zwykle aplikowanego do oka królika. LVET pozwala lepiej przewidzieć reakcję oka ludzkiego i jest bezpieczniejsza dla zwierząt.

Retrospektywne badanie walidacyjne udoskonalonego/zredukowanego badania LVET – metody stosowanej w zakresie detergentów gospodarstwa domowego i środków czystości, jak również głównych składników ich klas, miało miejsce w latach 2006 i 2009.

Po recenzjach, LVET nie jest zalecany do przyszłego wykorzystania, w celu wygenerowania nowych danych, ale zostało zasugerowane, że istniejące dane LVET z ograniczonego obszaru stosowania detergentów gospodarstwa domowego i środków czystości, jak również głównych składników ich klas, mogą być wykorzystywane do celów klasyfikacji i decyzji dotyczących etykietowania. Ponadto ECVAM zaleciło, aby istniejące dane LVET w tym ograniczonym obszarze stosowania, były użyte jako dane uzupełniające dla przyszłych badań walidacyjnych. Żadne dodatkowe badania nie powinny być wykonywane w celu dalszego rozwój lub potwierdzenia testu LVET (ESAC, 2009).

Dlaczego nie królik

Oprócz oczywistych względów etycznych nakazujących zaprzestania testowania kosmetyków na zwierzętach, ocenna jest również jakość i prawidłowość otrzymanych tą metodą wyników.

Historycznie, królik albinos został wybrany do testowania potencjalnego działania drażniącego oczu, przede wszystkim z powodu rozmiaru oka, który ułatwia rozpoznanie uszkodzenia oraz rozmiaru worka spojówkowego (uwycdatniony przez luźne powieki), z łatwością utrzymującego badany materiał w oku.

Jednak z powodu kilku rażących różnic, królik jest daleki od idealnego modelu dla ludzi. Oto one:

- trzecia powieka, która przesuwana się bocznie po całym oku, prawdopodobnie powodując usuwanie części badanego materiału, co odróżnia od człowieka,
- worek spojówkowy – znacznie większy niż u ludzi, co oznacza, że w oku królika może być umieszczona większa ilość materiału [100 µl płynu lub 100 mg substancji stałej], aniżeli taka która może przez przypadek dostać się do oka człowieka,

- rogówka - rogówka królik jest dużo cieńsza niż ludzi,
- produkcja łez – królik wytwarza mniejszą ilość łez,
- częstotliwość mrugania,
- powierzchnia oka.

Z tych i innych powodów, królik jest powszechnie uważany za zbyt wrażliwy wzór człowieka, co można uznać za pozytywny aspekt, ponieważ dodaje to margines bezpieczeństwa w ocenie ryzyka, jednak przedstawia problem niewłaściwej oceny zagrożenia i sugeruje, że lepiej przewidywany model byłoby korzystny.

W kolejnej części Artykułu zostaną omówione zwalidowane dotychczas przez ECVAM metody alternatywne.

Źródła

1. „A Summary Report of the COLIPA International Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test.” *Toxicology in vitro* 11 (1997) 141-179
2. „Evaluation of the EpiOcular™ Tissue Model as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test” M. Stern, M. Klausner, R. Alvarado, K. Renskers and M. Dickens.
3. „Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation” Yulia Kaluzhny, Helena Kandárová, Patrick Hayden, Joseph Kubilus, Laurence d'Argembeau-Thornton1 and Mitchell Klausner.
4. „Update on the COLIPA research programme for development of *in vitro* alternative methods for eye irritation” Pauline McNamee1 (Chairperson), Lieve Declercq, Ann De Smedt, Bart De Wever, Claudine Faller, John Harbel, Penny Jones, Monique Marrec-Fairley, Wolfgang Pape, Uwe Pfannenbecker, Klaus Schroeder, Magalie Tailhardat, Christine Van den Berghe and Freddy Van Goethem.
5. „In Alternatives for Ocular Irritation” Rodger D. Curren and John W. Harbell
6. ALLTOX - <http://alttox.org/>
7. COLIPA - <http://www.colipa.eu/>
8. MatTek web - <http://www.mattek.com/pages/abstracts/searchresults/>
9. IIVS - <http://www.iivs.org/>
10. TSAR - <http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>



REKLAMA



Alglycera

(INCI: Allantoin Glycyrrhetic acid)

Substancja czynna pochodząca z korzenia lukrecji o unikalnej kompozycji allantoiny i kwasu glicyretynowego (18β-glycyrrhetic acid). Alglycera wspomaga odnowę naskórka, łagodzi podrażnienia i zaczerwienienia skóry, chroni ją przed zanieczyszczeniami środowiska. Wykazuje silne działanie wybielające i stymuluje proces odbudowy naskórka. W kosmetykach rekomendowane użycie to 0.1-0.5% w produktach do skóry suchej, wrażliwej i atopowej. W produktach dermatologicznych proponujemy 0.5-1%.

Więcej informacji udziela firma:

Pol-Nil S.A., Warszawa, tel. +22 814 20 00, www.pol-nil.com.pl
m.kedzierska@pol-nil.com.pl



POL-NIL S.A.