

STANISŁAW MOSKALEWSKI, EWA T. MYSTKOWSKA, EWA KISS*

TEST DRAIZE'A I ALTERNATYWNE METODY OCENY DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

DRAIZE TEST AND ALTERNATIVE METHODS FOR THE EVALUATION OF IRRITANCY OF CHEMICAL SUBSTANCES

Z Zakładu Histologii i Embriologii AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. S. Moskalewski

* Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

Potencjał właściwości drażniących substancji chemicznych jest obecnie oceniany zdolnością do wywoływania podrażnienia oka królika (test Draize'a). Ze względów humanitarnych zaleca się zastąpienie tego testu testami alternatywnymi. Niniejszy artykuł jest przeglądem testów alternatywnych do testu Draize'a, wykonywanych w laboratoriach krajów Wspólnoty Europejskiej, jednocześnie jest dyskutowana czułość metod oraz ich powtarzalność.

Pod wpływem organizacji broniących praw zwierząt zrodziło się poczucie, że szereg testów wykonywanych na zwierzętach może i powinno zostać zaniechanych i zastąpionych testami bardziej humanitarnymi, nie narażającymi zwierząt na nieuzasadnione cierpienia [19, 37]. Niestety, opracowanie testów alternatywnych napotyka na poważne trudności. Problemy związane z regulacją prawną testów przeprowadzanych na zwierzętach i prowadzeniem testów alternatywnych w przypadku kosmetyków i ich składników są omawiane w artykule redakcyjnym ATLA [4]. W skrócie z artykułu wynika, że jeśli nie zostanie osiągnięty należyty postęp w opracowywaniu testów zastępujących badania na zwierzętach to w terminie do 1 stycznia 1997 Komisja EC zaproponuje przełożenie wprowadzenia zakazu wykonywania testów na zwierzętach na co najmniej dwa lata.

Testem, którego zaniechanie wydaje się szczególnie istotne w najbliższych latach jest test podrażnienia oka (test *Draize'a*) [11]. Test ten jest wykonywany w celu oceny stopnia ryzyka stosowania określonej substancji wprowadzanej w obręb worka spojówkowego lub stosowanej w pobliżu gałki ocznej. Wprowadzonego materiału nie wypłukuje się, a intensywność reakcji ocenia się po 24, 48 i 72 godzinach, a niekiedy nawet po 21 dniach. Wprowadzenie substancji w obręb worka spojówkowego może wywołać reakcję ze strony nabłonka rogówki i/lub spojówki a niekiedy także ich zrębu oraz naczyń występujących w zrębie spojówki i wokół rogówki. Wykazanie nieszkodliwości niektórych leków, kosmetyków, środków czyszczących itp. za pomocą testu *Draize'a* stanowi w wielu krajach warunek dopuszczenia ich do sprzedaży [1, 2, 3]. Mimo to jest on krytykowany nie tylko ze względów humanitarnych ale

również dlatego, że wyniki uzyskiwane przez różne laboratoria niekiedy różnią się pomiędzy sobą a galka oczna królika wydaje się być bardziej wrażliwa niż ludzka, co może doprowadzić do zdyskwalifikowania użytecznych substancji [36]. Reakcje zachodzące w oku mogą mieć charakter cytotoksyczny, zapalny lub immunologiczny w mniej lub bardziej złożonej formie. Organizacje takie jak FDA, CPSC i EPA w USA oraz EEC oceniają podrażnienie różnych części galki ocznej poszczególnych zwierząt. Ocenia się zmętnienie rogówki, zapalenie tęczęwki, zaczerwienienie i obrzęk spojówki, obecność wysięku oraz złuszczenie się nabłonka [40]. Zsumowanie zapisu cyfrowego wyniku oceny zaczerwienienia, obrzęku i wysięku daje wynik całkowity [11]. Opracowano również dokładny ośmiostopniowy system cyfrowej klasyfikacji intensywności podrażnienia [21]. Zapis cyfrowy nie wyeliminował jednak międzylaboratoryjnych różnic w ocenie badanych substancji [9].

Od 1964 roku test *Draize'a* stanowi oficjalną metodę badania właściwości potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia substancji [13]. Wydano również ilustrowany przewodnik ułatwiający ocenę testu [12]. Zmodyfikowany sposób przeprowadzania testu *Draize'a* wprowadziła także Narodowa Akademia Nauk Stanów Zjednoczonych [29]. Dokładny opis zmian histopatologicznych zachodzących po wprowadzaniu substancji chemicznych do worka spojówkowego królika zawarty jest w pracy *Parisha* [39].

Dodatkową komplikację we wprowadzaniu alternatywnych w stosunku do testu *Draize'a* metod stanowi używanie kilku jego modyfikacji. Ponieważ stopień szkodliwości substancji określane na podstawie różnych wersji testu różni się, powstaje problem, z którymi wynikami należy porównywać wyniki testów alternatywnych.

W jednej z modyfikacji testu *Draize'a* nie wprowadza się, jak w metodzie klasycznej, 0,1 ml badanego płynu lub 0,1 g substancji suchej do worka spojówkowego, ale umieszcza się 0,01 ml badanego roztworu lub 0,01 g substancji bezpośrednio na rogówce [18, 23]. Metoda ta jest zalecana przez IRAG w przypadku badania substancji, które podejrzewa się o silne działanie drażniące. W przypadku odpowiedzi ze strony galki ocznej substancję klasyfikuje się jako drażniącą, natomiast jeśli nie wywoła zmian, należy przeprowadzić test z pełną dawką [23].

Amerykańska firma *Procter and Gamble* [42] stosuje procedurę, w której wprowadza się do oka tylko 3 mg badanej substancji. Jest to spowodowane obserwacją, że test *Draize'a* w formie zalecanej w Stanach Zjednoczonych przez FHSA [10], wykazuje znacznie silniejsze podrażnienie niż to, które występuje w oku człowieka po przypadkowym wprowadzeniu danej substancji. Ponadto, metoda FHSA powoduje tak silne podrażnienie, że uniemożliwia rozróżnienie pomiędzy różnymi modyfikacjami składu produktu.

Dyskutowana jest również kwestia liczby zwierząt potrzebnych do przeprowadzenia testu. W Stanach Zjednoczonych używa się 6 królików dla oznaczenia właściwości jednej substancji. Uznaje się ją za drażniącą, jeśli co najmniej 4 spośród 6 królików wykazują objawy podrażnienia. Test w tej postaci cechuje wysoki stopień precyzji, wynoszący co najmniej 99%. Wyniki przeprowadzone na niższej liczbie zwierząt są często fałszywie dodatnie [40].

Dotychczasowe obserwacje wskazują, że ze względu na różnorodność objawów obserwowanych w teście *Draize'a* zastąpienie go pojedynczym testem wykonywanym np. w hodowli tkanek może okazać się niemożliwe i będzie wymagać stosowania kilku testów aby odtworzyć reakcje mogące wystąpić pod wpływem podrażnienia galki ocznej.

Wydaje się również, że różne testy mogą być przydatne do oceny działania różnych typów substancji w zależności od ich rozpuszczalności (woda, alkohol, DMSO, inne rozpuszczalniki organiczne) oraz natury chemicznej. Odmienne testy może wymagać ocena detergentów używanych w mydle lub szamponach a innych ocena np. rozpuszczalników organicznych używanych do czyszczenia garderoby.

Konieczne jest również rozróżnienie testów wstępnych, o charakterze skrinin-gowym oraz testów zastępczych, które całkowicie eliminowałyby konieczność przeprowadzenia testu *Draize'a*.

Sformułowano szereg kryteriów, które powinien spełniać test *in vitro* aby mógł zostać uznany za właściwy substytut testu *in vivo*. Przytaczamy je za *Greenem i wsp.* [17].

1. Uzasadnienie: należy uzasadnić na jakiej podstawie dokonano wyboru danego a nie innego testu.

2. Znaczenie: końcowy punkt odczytu testu *in vitro* powinien wyraźnie odpowiadać biologicznemu lub fizjopatologicznemu efektowi wywołanemu *in vivo*.

3. Sprawdzenie:

a) Wymaga opracowania standardowego protokołu przeprowadzenia testu

b) Wymaga wewnątrz- i międzylaboratoryjnej powtarzalności wyników osiągniętych przy stosowaniu standardowego protokołu

4. Aspekt jakościowy: udziela odpowiedzi na pytanie, czy układ *in vitro* reaguje w ten sam sposób co test *in vivo*.

5. Aspekt ilościowy: czy nasilenie odczynu mierzonego testem alternatywnym jest takie samo jak mierzone *in vivo*.

Metody oceny *in vitro* nie muszą być uniwersalne. Można stosować je do oceny wybranych kategorii substancji. Powinno porównywać się je z systemem oceny i klasyfikacji stosowanym przez odpowiednie agencje rządowe.

Sposoby przeprowadzenia wewnątrz- i międzylaboratoryjnej oceny powtarzalności wyników oraz definicje licznych terminów związanych z tym zagadnieniem zawiera raport z konferencji poświęconej weryfikacji procedur testowania toksyczności [5, 6].

W lutym 1993 roku opublikowano podsumowanie konferencji poświęconej omówieniu wartości testów *in vitro* i możliwości zastąpienia nimi testu *Draize'a*. W przybliżeniu połowa uczestników sądziła, że testy *in vitro* mogą być przydatne jako testy skrinin-gowe, natomiast nikt nie uznał, że mogą stanowić test zastępczy.

Obecnie najczęściej stosowane w badaniach *in vitro* są dwa testy. Jeden z nich ocenia w jakim stopniu pod wpływem badanej substancji ulega zahamowaniu pochłanianie przez komórki czerwieni obojętnej [8, 14, 39, 41]. W drugim teście określa się wpływ badanej substancji na błonę kosmówkowo-omoczniovą zarodków kurcząt [14, 24, 27, 39, 41]. Wynik testu odczytuje się w ciągu kilku minut i jest podawany w zapisie cyfrowym (wartości od 0–21) co umożliwia klasyfikację potencjału testowanej substancji do wywołania podrażnienia. Kilkudniowy test nie daje dobrych wyników [32].

Grupa badaczy niemieckich z różnych ośrodków określiła wewnątrz- i międzylaboratoryjną ocenę błędu powstającego przy stosowaniu powyższych metod i porównała ich wyniki z wynikami testu *Draize'a* [39]. Test cytotoksyczny z czerwienią obojętną był lepiej powtarzalny, natomiast test przeprowadzony na błonie kosmówkowo-omocznioviej dawał mniej fałszywie ujemnych wyników w porównaniu z testem ocznym niż test cytotoksyczny. Badacze niemieccy opracowują obecnie obszerną bazę danych dotyczących właściwości toksycznych substancji określanych wspomnianymi

metodami i zamierzają porównać uzyskane wyniki z danymi z systemu komputerowego (TOPKAT) i utworzonego w USA i określającego zależność pomiędzy strukturą związku chemicznego i jego właściwościami drażniącymi (SAR, structure-activity relationship), [39].

Bank danych dotyczących właściwości toksycznych związków chemicznych określanych metodami *in vitro* powstał również we Włoszech [25, 26].

Metodą, która wydaje się być najbardziej obiecującą jest testowanie własności drażniących substancji chemicznych na galkach ocznych martwych zwierząt. Początkowo stosowano w tym celu galki oczne królików, obecnie używa się galek bydłęcych. Wyniki uzyskiwane w tym systemie są dość zbliżone do wyników uzyskiwanych *in vivo* [32]. Bydłce galki oczne poddaje się działaniu substancji testowanych płynnych lub rozpuszczonych w płynie hodowlanym (MEM). Rogówki są inkubowane w płynie przez 10 minut. Po upływie tego czasu nabłonek jest trzykrotnie przepłukiwany a następnie dokonuje się pierwszego pomiaru jego przejrzystości. Następnego pomiaru dokonuje się po 2 godzinnej inkubacji w medium hodowlanym. Substancje stałe są przygotowywane w postaci 20% roztworów lub zawiesin w MEM. Substancje są testowane na 15 rogówkach w tym 3 służą jako kontrolne. Zmiany w przejrzystości są rejestrowane za pomocą przyrządu skalowanego (skala od 0 do 150) (Electro-Design, Riom, France), który daje wyniki cyfrowe. Następnym etapem wykonywanego testu jest pomiar optycznej gęstości (optical density O.D.) płynu, w którym rogówki były hodowane przez 90 minut. Gęstość optyczną płynu oznacza się spektrofotometrycznie. Porównano wartości testu właściwości drażniących określonych substancji otrzymane tą metodą w 12 różnych laboratoriach [15]. Okazało się że 82,7% substancji testowanych było klasyfikowane tak samo we wszystkich laboratoriach.

Do zastąpienia testu *Draize'a* może okazać się również przydatna metoda EYTEX. EYTEX jest to syntetyczna macierz białek roślinnych, która pod wpływem drażniących substancji ulega zmętnieniu podobnie jak to się dzieje z rogówką. System EYTEX został wprowadzony i opatentowany przez Robak Europe (Gennevillers, Francja) i jest polecany jako test skринingowy dla określania toksyczności substancji chemicznych [33].

Poza testami wspomnianymi powyżej opisano liczne inne przeprowadzane zazwyczaj w hodowli tkanek, nie znalazły one jednak szerszego zastosowania [22, 28, 30, 34, 35, 38]. *Jackson i Rutty* [20] zaproponowali „piętrowy” system oceny szkodliwości preparatów, polegający na tym że początkowo ocenia się właściwości fizyko-chemiczne danej substancji, następnie cytotoksyczność *in vitro*, wynik testu skórniego u królików i wreszcie test *Draize'a*. Przeprowadzanie testu przerywa się po stwierdzeniu szkodliwego działania substancji na którymś z etapów. Metoda ta jednak nie została rozpowszechniona.

Niezależnie od prób zastąpienia testu *Draize'a* podrażnienia oka trwają również prace nad wyeliminowaniem testów wykonywanych w celu określenia zachodzącego pod ich wpływem podrażnienia lub uszkodzenia skóry [7, 16, 31].

Skróty nazw organizacji zajmujących się określaniem właściwości drażniących substancji chemicznych i regulacją prawną związaną z zezwoleniem na dopuszczenie substancji chemicznych do produkcji kosmetyków, środków czyszczących itd.

ACT = Americal College of Toxicology; BTS = British Toxicology Society; CAAT = The John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing; CPSC = US

Consumer Product Safety Commission; ECE-TOC = European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre; EEC = European Economic Community; EPA = US Environmental Protection Agency; ERGATT = European Research Group for Alternatives to Animal Testing; FDA = US Food and Drug Administration; FHSA = Federal Hazardous Substances Act; FRAME = Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments; IRAG = Interagency Regulatory Alternatives Group; OECD = Organisation for Economic Cooperation and Development; OSHA = US Occupational Safety and Health Administration; SCC = Scientific Committee on Cosmetology; SOPT = Society of Toxicology.

S. Moskalewski, E.T. Mystkowska, E. Kiss

DRAIZE TEST AND ALTERNATIVE METHODS FOR THE EVALUATION OF IRRITANCY OF CHEMICAL SUBSTANCES

Summary

The eye irritation test in rabbits (*Draize test*) is currently the method used to evaluate the hazard or safety of chemical substances. To reduce the need for animal testing some new procedures as alternative were elaborated. We present a review of method used as well as evaluation of sensitivity and repeatability of alternative tests applied in laboratories of European Economic Communities.

PIŚMIENNICTWO

1. *Anon.*: Primary eye irritation; health effects test guidelines, PB82-232984. 1982, Washington D.C.: US Environmental Protection Agency. (Cyt. za *J-F. Regnier i wsp.* 1994). – 2. *Anon.*: Acute eye irritation/corrosion. 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 405, 17 July 1992. Paris: OECD. – 3. *Anon.*: Annex of Council Directive 92/69/EEC of 31 July 1992 amending for the 17th time Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packing and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities L383, 1992, 127. (Cyt. za *J-F. Regnier*, 1994). – 4. *Anon.*: Cosmetics testing in the EEC. ATLA, 1993, 21, 404. – 5. *Balls M., Blaauboer B., Brusick D. i wsp.*: Report and Recommendations of the CAAT¹/ERGATT² workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 1990, 18, 313. – 6. *Balls M., Horner S.A.*: The FRAME interlaboratory programme on in vitro cytotoxicology. Ed Chem. Toxic., 1985, 23, 209. – 7. *Bartnik F.G., Pittermann W.F., Mendorf N. i wsp.*: Skin organ culture for the study of skin irritancy. Toxic. in Vitro, 1990, 4, 293. – 8. *Borenfreund E., Puerner J.A.*: Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 1985, 24, 119. – 9. *Bosshard E.*: Review on skin and mucous-membrane irritation tests and their application. Fd Chem. Toxic., 1985, 23, 149. – 10. CPSC. CFR Title 16, Subchapter IIC – Federal Hazardous Substances Act Regulation. 1981, Secs. 150040, 1541, 1500, 42. (Cyt. za *W. Gfeller i wsp.* 1985). – 11. *Draize J.H., Woodard G., Calvery H.O.*: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1944, 82, 377. (Cyt. za *W. Gfeller i wsp.* 1985). – 12. FDA.: Illustrated Guide for Grading Eye Irritation by Hazardous Substances. 1965. Government Printing Office, Washington D.C. (Cyt. za *E. Bosshard*, 1985). – 13. Federal Register. Federal Hazardous Substance Act. 1964. CRF Title 21, 13009-191.12, test for eye irritants. (Cyt. za *E. Bosshard*, 1985). – 14. *Friedhelm G., Bartnik F.G., Kästner W. i wsp.*: Evaluation of the local compatibility of surfactants by in vitro methods. Henkel-Referate 1988, 24, 101. – 15. *Gautheron P., Giroux J., Corrin M. i wsp.*: Interlaboratory assessment of the bovine corneal

opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxic. in Vitro*. 1994, 8, 3, 381. – 16. *Gfeller W., Kobel W., Seifert G.*: Overview of animal test methods for skin irritation. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 165. – 17. *Green S., Chambers W.A., Gupta K.C. i wsp.*: Criteria for *in vitro* alternatives for the eye irritation test. *Fd Chem. Toxic.*, 1993, 31, 81. – 18. *Griffith J.F., Nixon G.A., Bruce R.D. i wsp.*: Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. *Toxic. Appl. Pharmac.*, 1980, 55, 501. (Cyt. za *A.P. Walker*, 1985). – 19. *Hampson J.E., Silcock S.R.*: Animal protection and toxicity testing regulations. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 183. – 20. *Jackson J., Ruddy D.A.*: Ocular tolerance assessment – integrated tier policy. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 309.

21. *Kay J.H., Calandra J.C.*: Interpretation of eye irritation tests. *J. Soc. cosmet. Chem.*, 1962, 13, 281. (Cyt. za *J-F. Regnier i wsp.* 1994). – 22. *Kemp R.B., Meredith R.W.J., Gamble S.H.*: Toxicity of commercial products on cells in suspension culture: a possible screen for the Draize eye irritation test. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 267. – 23. *Lambert L.A., Chambers W.A., Green S. i wsp.*: The use of low-volume dosing in the eye irritation test. *Fd Chem. Toxic.* 1993, 31, 99. – 24. *Leighton J., Nassauer J. i Tchao R.*: The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food Chem. Toxic.*, 1985, 23, 293. – 25. *Loprieno N., Boncristiani G., Bosco E. i wsp.*: The Galileo Data Bank on toxicity testing with *in vitro* alternative methods. ATLA, 1994, 22, 20. – 26. *Loprieno N., Boncristiani G., Bosco E. i wsp.*: The Galileo Data Bank on toxicity testing with *in vitro* alternative methods. II. Toxicology profiles of 20 chemicals. ATLA, 1994, 22, 82. – 27. *Luepke N.P.*: Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 287. – 28. *Mohr U., Emura M.*: The use of cell and organ culture from the respiratory tract for testing chemicals. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 233. – 29. NAS-NRC. Dermal and eye toxicity tests. In Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances. 1977, NAS Publ. no. 1138, p. 23, NAS, Washington D.C. (Cyt. za *W. Gfeller i wsp.* 1985). – 30. *North-Root H., Yackovivh F., Demetrius J. i wsp.*: Prediction of the eye irritation potential of shampoos using the *in vitro* SIRC cell toxicity test. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 271.

31. *Oliver G.J.A., Pemberton M.A.*: An *in vitro* epidermal slice technique for identifying chemicals with potential for severe cutaneous effects. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 229. – 32. *Parish W.E.*: Ability of *in vitro* (corneal injury – eye organ- and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 215. – 33. *Regnier J-F., Imbert Ch., Boutonnet J.-Ch.*: Evaluation of the EYTEX system as a screening method for the ocular irritancy of chemical products. ATLA, 1994, 22, 32. – 34. *Reinhardt Ch.A., Pelli D.A., Zbinden G.*: Interpretation of cell toxicity data for the estimation of potential irritation. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 247. – 35. *Scaife M.C.*: An *in vitro* cytotoxicity test to predict the ocular irritation potential of detergents and detergent products. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 253. – 36. *Schlatter Ch., Reinhardt Ch.A.*: Acute irritation tests in risk assessment. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 145. – 37. *Sharpe R.*: The Draize test – motivations for change. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 139. – 38. *Shopsis C., Borenfreund E., Walberg J. i wsp.*: A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 259. (Cyt. za *W. Sterzel i wsp.* 1990). – 39. *Spielman H., Gerner I., Kalweit S. i wsp.*: Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. *Toxic. in Vitro*, 1991, 5, 539. (Cyt. za *P. Gautheron i wsp.* 1994). – 40. *Springer J.A., Chambers W.A., Green S. i wsp.*: Number of animals for sequential testing. *Fd Chem. Toxic.*, 1993, 31, 105.

41. *Sterzel W., Bartnik F.G., Matthies M. i wsp.*: Comparison of two *in vitro* and two *in vivo* methods for the measurement of irritancy. *Toxic. in Vitro*, 1990, 4, 698. – 42. *Walker A.P.*: A more realistic animal technique for predicting human eye response. *Fd Chem. Toxic.*, 1985, 23, 175.

Dn. 1994.11.28.

02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5