



**Pannon Egyetem Georgikon Kar**  
**Festetics Doktori Iskola**

**Iskolavezető:**

**Dr. habil. Anda Angéla**  
egyetemi tanár, az MTA doktora

**Témavezető:**

**Dr. Budai Péter**  
egyetemi docens

**Agrokemikáliák irritatív hatásainak toxikológiai**  
**vizsgálata *in vitro* rendszerekben**

DOI:10.18136/PE.2017.667

**Doktori (PhD) értekezés**

**Készítette:**

**Kormos Éva**

**Készthely**

**2017**

**Agrokemikáliák irritatív hatásainak toxikológiai vizsgálata *in vitro* rendszerekben**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem Fesztetics

Doktori Iskolája keretében

Környezettudományok tudományágban

Írta: Kormos Éva

Témavezető: Dr. Budai Péter

Elfogadásra javaslom (igen/nem)

.....

témavezető

A jelölt a doktori szigorlaton ..... %-ot ért el

Keszthely, .....

.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: ..... igen/nem

.....

bíráló

Bíráló neve: ..... igen/nem

.....

bíráló

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ..... %-ot ért el.

Keszthely, .....

.....

a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése: .....

Keszthely, .....

.....

az EDHT elnöke

# TARTALOMJEGYZÉK

1. KIVONATOK.....	6
1.1 Magyar nyelvű kivonat.....	6
1.2 Angol nyelvű kivonat .....	7
1.3 Német nyelvű kivonat.....	7
2. BEVEZETÉS .....	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
3.1. A szem felépítése.....	10
3.2. Az <i>in vivo</i> szemirritációs vizsgálat .....	13
3.3. A szemirritáció vizsgálatára alkalmas alternatív módszerek.....	20
3.3.1 Izolált szemek felhasználása .....	23
3.3.2 A chorioallantois membránt felhasználó organotipikus tesztek .....	26
3.3.3 Citotoxicitási tesztek.....	32
3.3.4 Más alternatívák.....	34
4. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	36
4.1. Vizsgálati anyagok .....	36
4.2. Vizsgálati módszerek.....	46
4.2.1. HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantois Membrane) teszt.....	46
4.2.2. ICE (Isolated Chicken Eye) teszt .....	51
4.2.2.1 A csirkeszemek előkészítése .....	51
4.2.2.2 A csirkeszemek kezelése .....	53
4.2.2.3 A csirkeszemek elváltozásainak értékelése .....	55
4.2.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) vizsgálat.....	64
4.2.3.1 Az állat előkészítése, műtétje .....	65
4.2.3.2 A májsejtek kinyerése, tisztítása, sejt kultúra készítése .....	67
4.2.3.3 A kísérleti metódus.....	67
4.3 Alkalmazott statisztikai módszerek.....	70
4.3.1 Kendall-féle gamma.....	70
4.3.2 Cohen-féle kappá .....	71
4.4 Eredmények.....	72
4.4.1 A HET-CAM tesztből származó eredmények .....	72
4.4.2 Az ICE tesztből származó eredmények .....	76
4.4.3 Az MTT tesztből származó eredmények .....	85

4.5	Eredmények értékelése és javaslatok .....	88
4.5.1	A HET-CAM tesztből származó eredmények összehasonlítása az <i>in vivo</i> adatokkal .....	88
4.5.2	Az ICE tesztből származó eredmények összehasonlítása az <i>in vivo</i> adatokkal .....	89
4.5.3	Az ICE és HET-CAM tesztből származó eredmények összehasonlítása .....	90
4.5.4	Az MTT tesztből származó eredmények összehasonlítása az <i>in vivo</i> adatokkal ...	91
4.5.5	Az eredmények statisztikai elemzése .....	92
4.5.6	Következtetések és javaslatok .....	94
5	ÖSSZEFOGLALÁS .....	98
6	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	101
7	IRODALOMJEGYZÉK .....	102
8	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	113
8.1	Tézispontok magyarul .....	113
8.2	Tézispontok angolul .....	116
9	MELLÉKLETEK .....	119

# 1. KIVONATOK

## 1.1 Magyar nyelvű kivonat

A szerző a kísérletei során növényvédő szerek irritációs potenciálját vizsgálta az *in vitro* HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) teszttel, ICE (Isolated Chicken Eye) teszttel és MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) vizsgálattal. A kapott eredményeket az *in vivo* szemirritációs teszt adataival vetette össze.

Az irodalomból származó *in vivo* adatok és az *in vitro* tesztek eredményeinek összehasonlításával próbált további adatokat szolgáltatni arról, hogy az *in vitro* módszerek együttesen vagy külön-külön alkalmasak-e az agrokemikáliák irritatív potenciáljának meghatározására, valamint, alkalmasak lehetnek-e az *in vivo* szemirritációs teszt kiváltására.

A HET-CAM tesztet az Invitox Protocol 47. száma alapján végezte el. A tyúktojások chorioallantois membránjára a keltetés 10. napján vizsgálati anyagokat juttatott, majd 5 percig figyelte az érrendszerben bekövetkező esetleges károsodásokat. Algoritmus segítségével kapott eredmények alapján irritációs kategóriákba sorolta a növényvédő szereket.

Az ICE tesztet az OECD 438. leírása szerint végezte. A vágóhídról származó csirkeszemek állapotát szuperfúziós készülékben fenntartva vizsgálta a szaruhártya esetleges vastagodását, homályát, illetve fluoreszcein-megtartását. A megfigyelések értékelésével három végpontot állapított meg, amelyek kombinációi alapján irritációs kategóriákba sorolta a vizsgált anyagokat.

Az MTT vizsgálat során a sejtek életképességét - a mitokondrium roncsolódásának mértékével lineárisan növekvő - MTT felvételét követő lila formazán kristályok által okozott színváltozás alapján határozta meg spektrofotométerrel 540 nm hullámhosszon.

Az *in vivo* szemirritációs vizsgálatot, a 3R szabályt szem előtt tartva, nem végezte el, hanem a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal által rendelkezésére bocsátott toxikológiai értékelő jelentésekből származó adatokat alkalmazta összehasonlító szándékkal.

A kísérletbe vont növényvédő szerek *in vivo* és *in vitro* eredményeinek összehasonlításából, és a nemzetközi szakirodalomban található hasonló témájú kutatások eredményeiből a szerző megállapította, hogy a HET-CAM teszt, az ICE teszt és az MTT vizsgálat egy teszrendszer részeként alkalmas az *in vivo* primer szemirritációs vizsgálat teljes egészében történő kiváltására.

## **1.2 Angol nyelvű kivonat**

### **Toxicological examination of irritant effects of agrochemicals in *in vitro* systems**

The author examined three alternative methods (Hen's Egg Test – Chorioallantois Membrane, Isolated Chicken Eye Test and MTT Assay) of Draize Primary Eye Irritation Test with a comparative intent on plant protection products.

Based on the results obtained, it can be concluded that the alternative methods can be used to completely replace the *in vivo* test as part of the test system.

## **1.3 Német nyelvű kivonat**

### **Toxikologische Untersuchung der Reizwirkung von Agrochemikalien in *in vitro*-Systemen**

Der Autor hat drei alternative Methoden (Hen's Egg Test – Chorioallantois Membrane, Isolated Chicken Eye Test and MTT Assay) von Draize Primary Eye Irritation Test mit einer vergleichenden Absicht auf Pflanzenschutzmittel.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen kann man feststellen, dass die alternative Methoden als Pre-Test-Verfahren verwendet werden kann.

## 2. BEVEZETÉS

A megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszerek előállításában - a világ rohamosan növekvő népességének egyre nagyobb élelmiszerigénye mellett – a növényvédő szerek okszerű felhasználásának jelentős szerepe van, hiszen a kultúrnövényeket károsító szervezetek átlagosan 35% termésvesztést okozhatnak (ebből 14%-ot állati kártevők, 12%-ot mikroorganizmusok, 9%-ot pedig a gyomnövények tesznek ki). A modernebb, hatásosabb szerek felhasználásával évről-évre csökken a területre kijuttatandó hatóanyag mennyisége, illetve a természetstechnológiai elvek miatt is egyre kevesebb növényvédő szert használunk fel. Fokozatosan nagyobb szerepet kap a fenntartható gazdálkodás, az integrált növényvédelem (Gáborjányi és mtsai, 1995).

A kémiai növényvédelem mellett kiemeltebb szerepet kap a biológiai és fizikai növényvédelem, mert a termésvesztést okozó károsítók ellen a környezet kímélése érdekében lépünk fel. A növényvédő szerek, bár szükséges anyagok, potenciális mérgek, ezért kedvező hatásaik mellett esetleges káros hatásokkal is számolnunk kell. Ezek a káros hatások az élő szervezetekre sokféleképpen érvényesülhetnek. Mivel a környezetbe juttatjuk ki a peszticideket, mérgeződik a környezet (talaj, víz, levegő), illetve az itt élő nem-célszervezetek (méh, hal, vad, rovar, háziállat), valamint a táplálékláncban feldúsulva végső fogyasztóként az ember is. Felhasználás során szintén mérgeződik az ember, mint aki kijuttatja, alkalmazza a szereket. A kijuttatást végző személy testfelszínére kerülve helyi, illetve általános mérgezés alakulhat ki. A szerek különböző mértékű szem- és bőrkárosodást okozhatnak irritatív hatásuktól függően. A szembe jutott mérgező anyagok az enyhe, reverzibilis kötőhártya gyulladástól kezdve súlyos és maradandó szemkárosodást, szaruhártyahomályt, végső esetben vaktságot és egyéb életveszélyes károsodást is okozhatnak (Bordás, 1971).

Magyarországon vegyi anyagot forgalmazni és felhasználni csak engedélyokirat birtokában lehet. A növényvédő szer kizárólag abban az esetben kaphat engedélyt és kerülhet forgalomba, illetve felhasználásra, ha a biztonságos felhasználás ténye bizonyított mind humán-, mind környezet-egészségügyi szempontból, tehát feltétlenül szükséges az adott szer élő szervezetre gyakorolt hatásainak ismerete.

A növényvédő szerek engedélyezési eljárása során rendkívül fontos szerepet töltenek be az állatkísérleti vizsgálatok. Ezek segítségével van mód arra, hogy megismerjük egy-egy készítmény vagy hatóanyag toxikológiai tulajdonságait (EC, 2013a; EC, 2013b), valamint így nyílik lehetőség az agrokemikáliák felhasználási feltételeinek pontos meghatározására és a



humán-egészségügyi kockázatok csökkentésére. A vegyi anyagok szemre gyakorolt hatásának vizsgálata további segítséget nyújt a felhasználáshoz előírt védőeszközök ki- és továbbfejlesztéséhez is.

Az állatkísérletek során leggyakrabban alkalmazott eljárások az *in vivo* metodikák közé tartoznak. A szemirritáció vizsgálata a nyúlön végzett *in vivo* szemirritációs teszttel történik. Ennek segítségével van mód megbecsülni az emberi felhasználás során esetlegesen előforduló expozíció következményeit. A vizsgálat során a nyulak kötőhártyaszájába cseppentik a vizsgálni kívánt vegyi anyagot, majd megfigyelik annak esetleges károsító hatásait. Ez az eljárás igen fájdalmas lehet a kísérleti állatra nézve, etikailag erősen megkérdőjelezett az állatvédelmi szervezetek által, így már különböző alternatív módszerek vannak az engedélyeztetés folyamatában. Ilyen alternatív módszerek az *in vitro* technikák, melyek közé tartoznak a tyúktojás chorioallantois membránját (CAM) felhasználó tesztek (Walum és mtsai, 1992), az izolált szemet alkalmazó eljárások - a vágóhídról származó izolált csirkeszemet felhasználó (ICE) és a szarvasmarha szemet felhasználó (BCOP) teszt -, valamint a citotoxicitási vizsgálatok.

Jelenleg az *in vivo* szemirritációs teszttel kapott eredmények az általánosan elfogadottak a növényvédő szerek engedélyezési folyamata során. A háztartási és ipari vegyszerekkel végzett alternatív kísérletek megfelelő eredményt nyújtottak, így a fent említett alternatívák mentén érdemes kísérleteket folytatni a növényvédő szerekkel is, hiszen az ICE és BCOP tesztet az OECD is elfogadja már azonosítási célra.

Célom az volt a vizsgálataim során, hogy Magyarországon Budai (2002) és Tavaszi (2012) után újabb növényvédő szerekkel és módszerekkel bővítssem ki a különböző *in vitro* vizsgálatok összehasonlítását a primer szemirritációban elismert *in vivo* teszttel, valamint, hogy megállapíthassam az alternatív módszerek együttes vagy külön-külön való alkalmazhatóságát elővizsgálati vagy kiváltási módszerként. Célom elérése érdekében 25 (MTT-nél 15) növényvédő szer irritációs potenciálját határoztam meg a HET-CAM, az MTT és az ICE teszttel, majd vettem őket össze az *in vivo* teszt irodalomból (toxikológiai értékelő jelentések) származó adataival. A következtetések levonásával arra kerestem a választ, hogy az általam elvégzett *in vitro* technikák alkalmasak lehetnek-e önmagukban vagy egymással kombinálva az *in vivo* szemirritációs vizsgálat kiváltására, ezáltal elősegítve a jövőben a felhasznált kísérleti állatlétszám csökkentését.

## 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 3.1. A szem felépítése

A szem a fény érzékelésére szolgál. A gerinces állatoknál a csontos szemüregben helyezkedik el, amely a külső fizikai behatásoktól védi a szemet. A szem védelmét látja el továbbá a szemhéj, a szempilla és a kötőhártya is. A szemgolyó falát három burok adja, melyen belül a szemgolyó magja, a szemcsarnokok, a szemlencse és az üvegtest foglalnak helyet (Szentágothai és Réthelyi, 2014).

A külső burok hátulsó része az ínhártya (sclera), elülső része pedig a szaruhártya (cornea). Az ínhártya egy rostos kötőszövetből álló burok, ami a szem fehér színét adja, áttűnve a kötőhártyán. A szaruhártya gazdag beidegzésű, 5 rétegből tevődik össze:

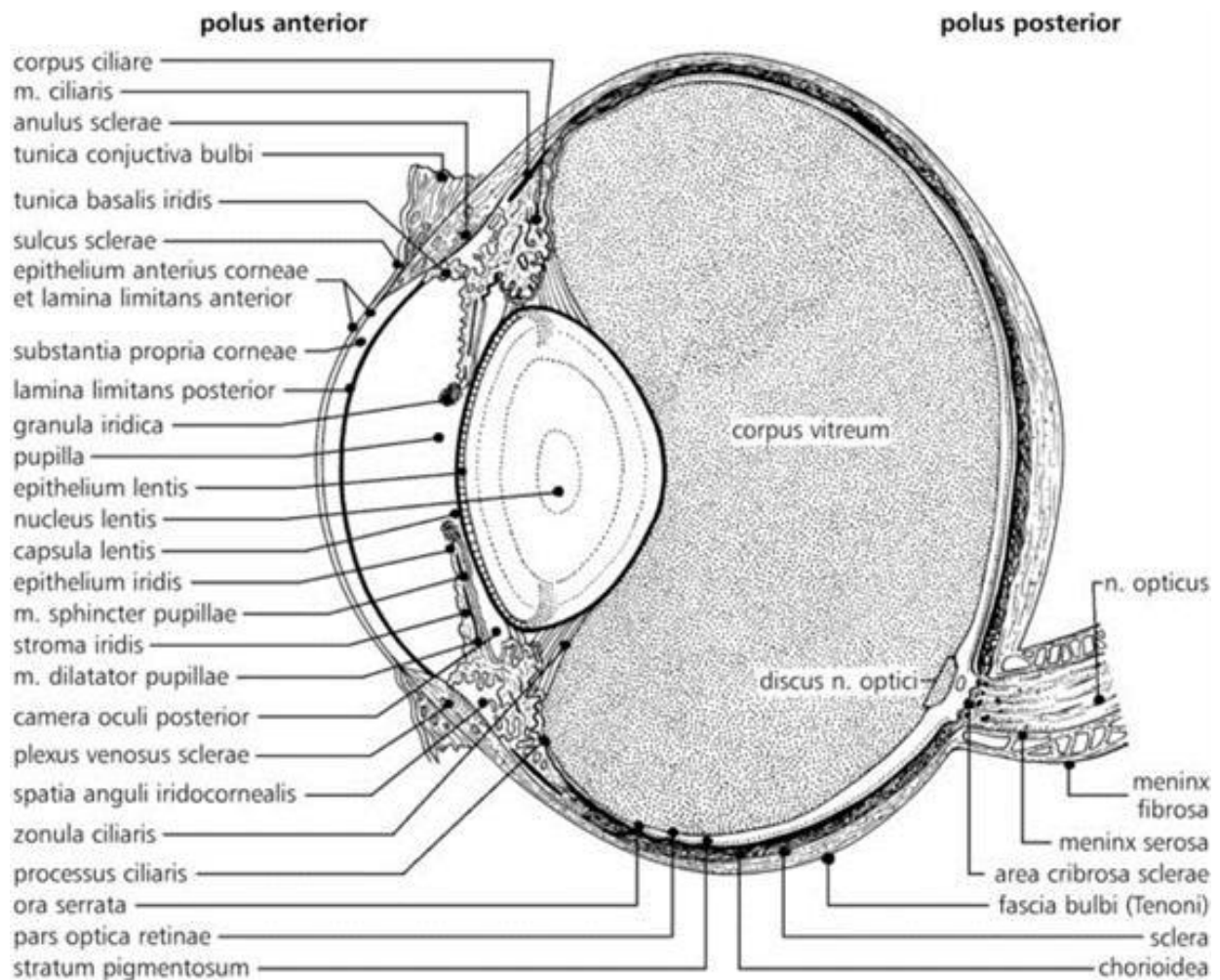
- a felületi epitheliumból,
- a Bowman-membránból,
- a stroma-ból,
- a Descemet-membránból
- és az endotheliumból (Huhtala és mtsai., 2008).

Az epithelium 5-6 soros, el nem szarusodó laphám, amelynek vastagsága 50 mikron. A Bowman-membrán felé eső, legalsó sejtréteg a basalis sejtek rétege. A Bowman-membrán biztosítja a cornea szilárdságát, szerepe van a cornea hegesedési folyamataiban. A stroma alkotja az egész cornea vastagságának kilenczöred részét. A Descemet-membrán nem valódi membrán, az endothelsejtek bazálmembránja, mintegy 10 mikron vastag. Az endotheliumot egyrétegű, lapos, hatszög alakú sejtek alkotják (Süveges, 2015).

A középső burok az érhártyát (choridea), a sugártestet (corpus ciliare) és a szivárványhártyát foglalja magában. Az érhártya a szem hátulsó 2/3 részét adja, az ínhártyáról leválasztható, erekkel gazdagon átszőtt. A sugártest az érhártya folytatása, kezdetben attól alig tér el, majd ráfekszik az ínhártya belső felületére. A sugártest leglényegesebb része a sugárizom (musculus ciliaris). A szivárványhártya egy gyűrű alakú lemez, amely követi a lencse görbületét. Ennek közepén a fényre szűkülő nyílás, a pupilla helyezkedik el (1. ábra).

A belső burok az ideghártya (retina). Az ideghártya külső rétege pigmenthámréteggé alakult, belső rétege a szem hátsó részében tölt be idegszervi funkciót.

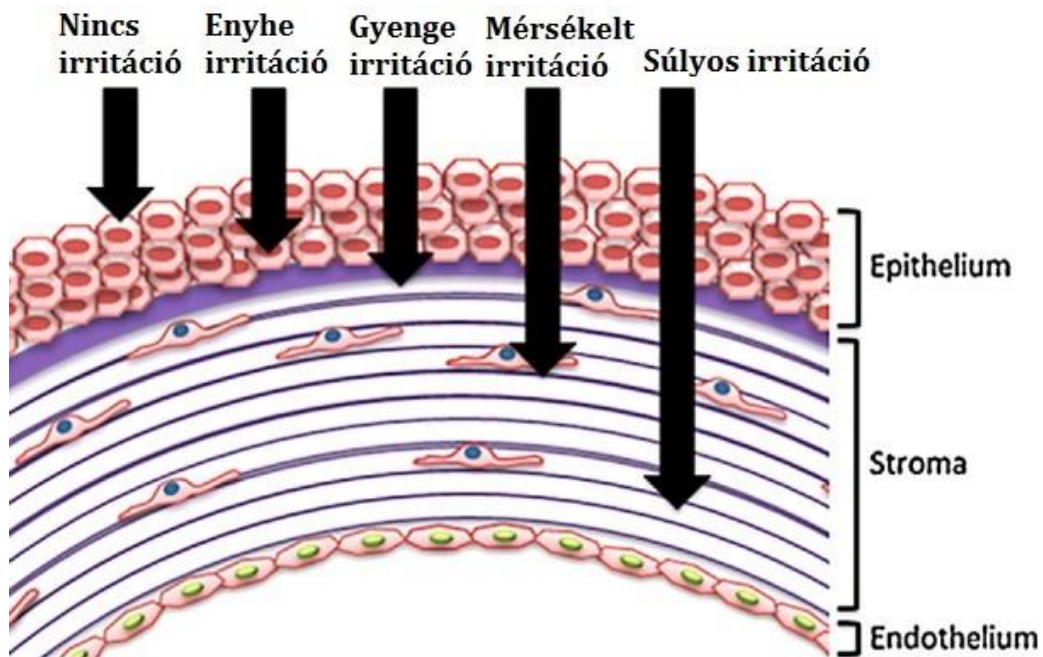
A szemgolyó vérellátását három érrendszer adja, az ideghártyához térő retinális, az érhártyát ellátó ciliaris és az episcleralis - conjunctivalis érrendszer. Külső (mechanikai, kémiai) inger hatására vagy pedig gyulladásos állapotban az erek kitágulnak (Fehér, 1989).



1. ábra: A szem felépítése (Fehér, 2004)

A szem felépítéséből adódóan a szemben megfigyelhető irritáció több régiót is érinthet. Általában először a legkülső réteg, a szaruhártya sérül, de erősebb irritáció, vagy korrozív természetű anyag hatására a szem mélyebben fekvő rétegei is károsodhatnak (Kiss, 1997). Általánosságban az enyhén irritatív vegyi anyagok csak a szaruhártya felületén okoznak károsodást, a gyengén és mérsékelten irritatív anyagok főként az epithéliumon és a stroma felületén, míg a súlyosan irritatív anyagok a stroma mélyebb részeit is károsítják, akár a stroma egész mélysége érintett lehet (2. ábra) (Maurer és mtsai., 2002). A szaruhártya sebgyógyulása különbözik a szervezet többi szövetétől. Ennek oka nem csak az, hogy nem tartalmaz ereket,

hanem az is, hogy anyagcseréje nagyon lassú (Süveges, 2015). A sérült terület reverzibilitása függ a sérülés mélységétől (Eskes és mtsai., 2005).



2. ábra: A szaruhártya érintett rétegei a szemirritáció során (Wilson és mtsai., 2015)

Maurer és munkatársai (2002) megállapították, hogy a kezelés utáni első órákban megfigyelhető cornea-károsodásból a szemirritáció mértéke és tartóssága becsülhető meg (Tavaszi, 2012).

### 3.2. Az *in vivo* szemirritációs vizsgálat

1944-ben Draize és munkatársai megjelentették „A bőr és nyálkahártya felszínére juttatott anyagok által okozott irritáció és toxicitás vizsgálati módszerei” c. cikküket, amely világszerte olyan hatással volt az állatkísérletekre, hogy a mai napig Draize neve összefonódik a szemirritációval az akut toxicitás meghatározásában. A növényvédő szerek forgalomba hozatalát megelőző toxikológiai vizsgálatok során a primer szemirritáció megállapítására mai napig a nyulakon végzett Draize-féle vizsgálatok eredményei az általánosan elfogadottak.

A vizsgálat során Új-zélandi fehér nyulakat használnak, amelyek kötőhártyaszákjába juttatják a vegyi anyagokat (3. ábra).



3. ábra: A vizsgálati anyag kötőhártyaszákba juttatása (spiegel.de)

A vizsgálni kívánt anyagok által kiváltott mérgező hatást figyelik meg a kezelés utáni 1. órában, 1., 2., 3., 4., 7., 14. és 21. napon, amely jelentkezhet a kötőhártyán, szaruhártyán, illetve a szivárványhártyán. A kötőhártyán vérbőség, duzzanat nyilvánulhat meg, a szaruhártyán a homály mértékét és kiterjedtségét, míg a szivárványhártyán az elváltozásokat állapítják meg az 1. táblázatban látható pontozási módszerrel.

1. táblázat: Az *in vivo* szemirritációs teszt pontozás értékei (OECD, 2017)

<b>I. Szaruhártya</b>	<b>Pont</b>
Homályosság: a homály mértéke (az érték megállapításához a legsűrűbb területet kell venni)	
Nem észlelhető fekélyesedés vagy homályosság	0
Szórványos vagy diffúz homályos területek, a szivárványhártya részletei tisztán láthatók	1
Könnyen kivehető áttetsző terület, a szivárványhártya részletei kissé elhomályosodottak	2
Gyöngyházfényű terület, a szivárványhártya semmilyen részlete nem látható, a pupilla mérete alig észlelhető	3
Nem átlátszó szaruhártya, a szivárványhártya egyáltalán nem látható	4
Lehetséges maximum:4	
<b>II. Szivárványhártya</b>	
Normális	0
Észrevehetően mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség a szaruhártya körül, vagy belövelltség, a szivárványhártya fényre reagál	1
Vérzés, nagymérvű roncsolódás, vagy nem reagál a fényre	2
Lehetséges maximum:2	
<b>III. Kötőhártya</b>	
Vörösödés (a szemhéjak és a szemgolyó kötőhártyájára vonatkozik)	
Normális	0
Egyes vérerek vérteltek (belövelltek)	1

Diffúz, bíborvörös szín, az egyes vérerek nehezen kivehetők	2
Diffúz erőteljes vörös	3
Lehetséges maximum:3	
<b>IV. Kötőhártya-vizenyő (chemosis)</b>	
Duzzanat (szemhéjak és/vagy pislogóhártyák esetében)	
Normális	0
A normálisnál kissé duzzadtabb	1
Nyilvánvaló duzzanat a szemhéjak részleges kifordulásával	2
Duzzanat nagyjából félig zárt szemhéjakkal	3
Duzzanat és a szemhéjak több mint félig zárva vannak	4
Lehetséges maximum: 4	

A kapott pontok összege alapján irritációs indexeket (Kay és Calandra, 1962) határoznak meg, amellyel megtörténhet a vizsgált anyag irritációs kategóriába sorolása.

A vizsgálat - az állatvédelmi mozgalmak szerinti elsődleges és legfontosabb - hátránya, hogy a kezelés fájdalmat okozhat a nyulaknak. Hátrányként említhető, hogy amennyiben a megfigyelési idő korai időszakában jelentős irritáció lép fel, az nagymértékben befolyásolja a besorolás eredményét a magas pontszámok miatt. Szintén a pontérték besorolását befolyásolja az a tény, miszerint az ember az expozíciót követően azonnali ellátást keres - és mielőbbi orvosi ellátásban részesül -, addig a nyulak nem kapnak gyógykezelést, így a kezdeti 1-2-es értékű szaruhártyahomály 3-4-es értékű pontszámhoz is vezethet. A Draize-féle tesztben alkalmanként előforduló jelenség, hogy a vegyület által okozott irritatív hatások után egy másodlagos fertőzés alakulhat ki, hiszen a nyulak viselkedése a kezelés után eltér (a mancsával vakarás/kaparás). Továbbá a tünetek súlyosságának meghatározása és ezáltal a pontozási rendszer alkalmazása is szubjektív módon történik a Draize által megállapított kategóriák szerint. Így gyakorlatilag két különböző laboratóriumban ugyanazon kísérleti anyaggal végzett vizsgálatok eredményei

eltérhetnek egymástól (Weil és Scala, 1971; Lordo és mtsai., 1999; Ohno és mtsai., 1999; Prinsen és mtsai., 2017).

Az *in vivo* vizsgálat során a nyúl szem expozíciójának mértékét befolyásolja a nyulak harmadik szemhéja (pislogóhártya), aminek expozícióra gyakorolt hatását az alternatív módszerek nem képesek modellezni, így okozva problémát azok validálásakor (Prinsen és mtsai., 2017).

Huhtala és munkatársai (2008) szerint a harmadik szemhéj mellett fontos megemlíteni azt is, hogy a nyulak szemének könnytermelése kisebb mértékű, és kevesebbszer is pislognak, így nehezebben képes megtisztulni a szaruhártya. Ezen tulajdonságokból adódóan a nyúl szemén végzett tesztek túlbecsülik a humán válaszreakciókat, és a kísérleti állatoknak is nagyobb szenvedést okoznak.

A Draize-féle teszt hátrányai ellenére, alapját képezi a napjainkban használatos szemirritációs vizsgálatoknak, amelyet az OECD 405. irányelve ír le részletesen.

Russell és Burch (1959) 3R szabálya (reduction, refinement and replacement), illetve az állatvédelmi mozgalmak az állatkísérletek alternatív módszereinek kifejlesztésére ösztökélte az állatkísérletekkel érintett kutatási területeken dolgozókat, akik több olyan módszert próbáltak bevezetni, amely állatvédelmi szempontból pozitívabb megítélésben tüntette fel a növényvédőszer engedélyezése során megkövetelt vizsgálatokat.

Maga az *in vivo* Draize-féle teszt is számos átdolgozáson esett át a 3R szabálynak köszönhetően. Ilyen a Low Volume Eye Test (LVET), amikor a klasszikus *in vivo* tesztben használt vizsgálati anyagmennyiségnek a tized részét juttatják a nyulak szemére, és nem tartják zárva az állat szemhéját a kezelés után. Továbbá a 2,0 alatti és a 11,5 fölötti pH értékű vegyi anyagok tesztelésének kivétele, az állatok számának tesztenként hatról háromra csökkentése, a tesztelés többlépcsős rendszer (4. ábra) szerinti (először egy állatot használnak, és csak akkor vonnak be további kettő állatot, ha nem jelentkezik súlyos irritáció) alkalmazása, a vizsgálati anyagok kimosása a kezeléstől számított egy óra elteltével, illetve az élő állatokat nem használó alternatív módszerek kifejlesztése és elővizsgálatként való alkalmazása. A szemirritáció pontozási rendszere (1. táblázat) viszont alapvetően azonos maradt, a besorolási osztályok (6. táblázat) különböznek jelentősen. A szemelváltozások szerint négyféle besorolás létezik: nem irritáló (nem besorolt), enyhén irritáló, irritáló és súlyosan irritáló, azonban az EU három besorolást ismer: a nem besorolt, az irritáló és a súlyosan irritáló kategóriát. Ez nem kedvez az alternatív módszerek validálásának, bár az ENSZ GHS 2007-ben az alábbi besorolási rendszert vezette be: az irritáló kategóriát (2. kategória) enyhén irritáló (2A) és irritáló (2B) kategóriákra

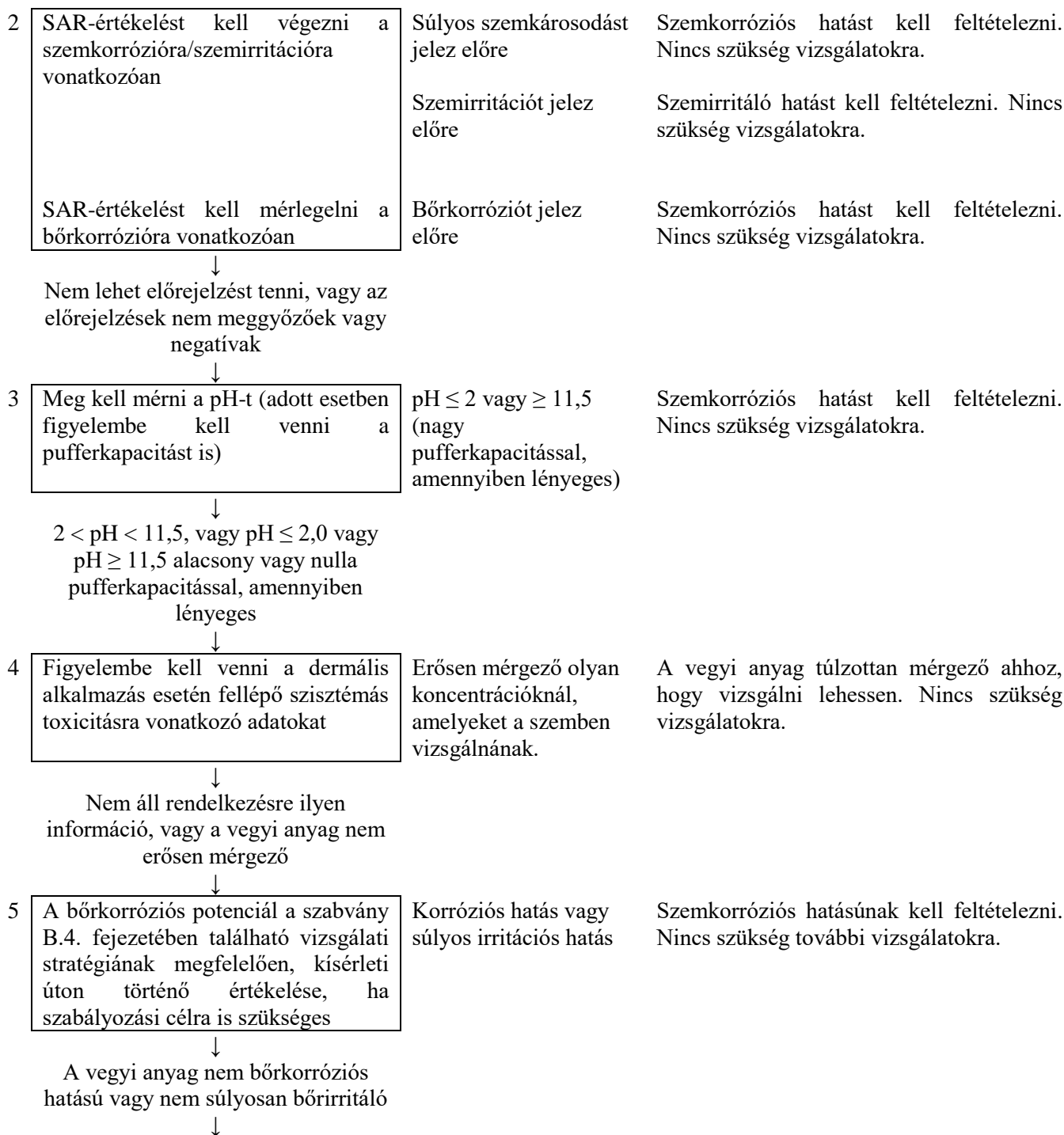


bontja fel, míg az EU csak az irritáló kategóriát (2. kategória) használja (Prinsen és mtsai, 2017).

A Draize-féle teszt több kritérium szerint értékeli az elváltozásokat a szemén, így helyettesítése egy alternatív módszerrel szinte lehetetlen. A szemirritáció teljes becslésére többszintű megközelítés szükséges az alternatív vizsgálatok terén (Hayashi és mtsai. 2012; Scott és mtsai, 2010).

A Draize-féle teszt annyi változáson esett át az OECD 405 útmutató változtatásai során, valamint a kapott pontok értékelésében, hogy a nyulakon végzett vizsgálatokat a dolgozatomban OECD 405 szabvány szerinti *in vivo* szemirritációs tesztnek fogom nevezni a továbbiakban.

	<b>Tevékenység</b>	<b>Eredmény</b>	<b>Következtetés</b>
1	<p>Szemre gyakorolt hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek <i>in vitro</i> adatai</p> <p>Bőrkorróziós hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek <i>in vitro</i> adatai</p> <p>Súlyos bőrirritáló hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek <i>in vitro</i> adatai</p>	<p>Súlyos szemkárosodás</p> <p>Szemirritáló hatású</p> <p>Nem szemkorróziós, illetve nem szemirritáló hatású</p> <p>Bőrkorróziós hatású</p> <p>Súlyosan bőrirritáló</p>	<p>Apikális végpont; szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.</p> <p>Apikális végpont; szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.</p> <p>Apikális végpont; nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.</p> <p>Szemkorróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.</p> <p>Szemirritáló hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.</p>
	↓		
	Nem áll rendelkezésre információ, illetve a rendelkezésre álló információk nem meggyőzőek		
	↓		



6	Validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> szemkorróziós vizsgálat(ok) elvégzése	Korróziós hatás vagy súlyos irritációs válasz	Szemkorróziós hatásúnak vagy súlyosan szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat alkalmazható a korróziós hatású, illetve súlyosan irritáló vegyi anyagok azonosítására, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Irritációs hatás	Szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat(ok) alkalmazható(k) a korróziós hatású, a súlyosan irritáló és az irritáló vegyi anyagok megfelelő azonosítására, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat(ok) alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Nincs irritációs hatás	Nem szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat(ok) alkalmazható(k) a nem irritáló vegyi anyagok megfelelő azonosítására, e vegyi anyagoknak a szemirritáló, súlyosan szemirritáló vagy szemkorróziós hatású vegyi anyagoktól való megfelelő megkülönböztetésére, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat(ok) alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
↓ A validált és elfogadott <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> szemvizsgálat(ok) nem alkalmazható(k) következtetés levonására			
7	Egyetlen nyúlra el kell végezni a kiindulási <i>in vivo</i> szemvizsgálatot.	Súlyos szemkárosodás	Szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
↓ Nincs súlyos károsodás vagy nincs válaszreakció			
8	Egy vagy két további állaton el kell végezni a megerősítő vizsgálatot.	Korróziós vagy irritáló hatású	Szemkorróziós vagy szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Nem korróziós vagy irritáló hatású	Nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.

4. ábra: A többlépcsős kiértékelési stratégia szemirritációs vizsgálatokhoz az OECD 405. szabvány előírása alapján (OECD, 2017)

### 3.3. A szemirritáció vizsgálatára alkalmas alternatív módszerek

Az alternatív módszer olyan kísérleti módszer és eljárás, amely képes az állatkísérleteket helyettesíteni, a kísérletben felhasznált állatok számát csökkenteni, illetve a kísérleti körülményeket finomítva a kísérleti állatok szenvedéseit mérsékelni (Nab és mtsai, 1993). Az alternatív módszerek alkalmazása elsősorban állatvédelmi okokból (3R szabály) javasolt, ezek a módszerek számos előnnyel bírnak a hagyományos *in vivo* tesztekkel szemben. Elterjedésükben az etikai szempontokon felül szerepet játszott a gazdaságos és időtakarékos kivitelezhetőség, valamint a standardizálhatóság. A költségeik alacsonyabbak, a kivitelezés egyszerűbb, a körülmények jobban befolyásolhatóak, mint élő állat esetén. Nem alkalmas azonban hosszabb távú hatás kimutatására; nem megfigyelhető a reverzibilitás.

Az alternatív módszerek közül már számos olyan létezik, amely csökkenti a kísérleti állatok felhasználását pl. az alacsonyabb rendű szervezetek vagy az *in vitro* technikák felhasználása elővizsgálati módszerként, valamint többlépcsős megközelítésként, illetve finomítva a kísérleti körülményeket csökkenti a kísérleti állatok szenvedéseit pl. a klasszikus LD<sub>50</sub> meghatározására irányuló akut toxikológiai vizsgálatokat felváltó akut alternatív módszerek, valamint a bőrirritációt felváltó *in vitro* tesztek.

A FRAME (Fund for the Replacement of Animal in Medical Experiments) brit szervezet által az alternatív módszerek a következő kategóriákba sorolhatók:

- *in vitro* technikák
- alacsonyabb rendű szervezetek használata
- immun-technikák
- minőségi szerkezet-aktivitás összefüggés analízise
- élettani folyamatok matematikai modellezése
- modellezés emberen
- más alternatív módszerek (Nab és mtsai, 1993).

#### *In vitro* technikák

Az *in vitro* módszerek csoportja olyan technikákat foglal magában, ahol sejteket, szöveteket, szerveket, szervrendszereket tartanak fenn mesterségesen laboratóriumi körülmények között, az *in vivo* élettani körülményekhez hasonlóan legalább 24 óráig.

A szövetkultúrák organotipikus kultúrákra és sejt kultúrákra oszthatók. Az organotipikus kultúrák szövet- vagy szervrészeket tartalmaznak, amelyekkel cél a sejtek és a szervek szövetei

közötti szerkezeti és funkcionális kapcsolatok vizsgálata. A sejt kultúrák esetén kémiai vagy mechanikai úton felbontják a sejtek közötti kapcsolatokat. Alkalmazási területük a vakcina előállítás és különböző gyógyszerkutatások.

#### Alacsonyabb rendű szervezetek

Az alacsonyabb rendű szervezetek (baktériumok, gombák, rovarok, puhatestűek) használatával a kísérletben felhasznált élőállatok száma csökkenthető.

Jó példa rá a mutagén hatások kimutatására használt AMES teszt, amely megfelelő eredményeket nyújt elővizsgálati módszerként.

#### Immun-technikák

Immunológiai technikák a legtöbb *in vitro* rendszer alapját képezik. Ide sorolható az ismert ELISA teszt, a RIA teszt vagy a HA teszt is, amelyek diagnosztikumok, vakcinák kifejlesztésében megfelelő érzékenységgel reagálnak. A specificitás hiánya okán az antigének vagy az antitestek szétválasztásakor az állatkísérletek elvégzése szükséges (Nab és mtsai, 1993).

#### Minőségi szerkezet-aktivitás összefüggés analízise

Egy adott anyag fizikai-kémiai tulajdonságai és biológiai aktivitása között szoros kapcsolat áll fenn. Ezt felhasználva, számítógépes program segítségével, közelítő képet kaphatunk a biológiai hatásokról. Ezen eredmények csökkenthetik a tesztelni kívánt anyagok számát, de ezt minden esetben állatkísérletek kell, hogy kövessék a hiteles adatok elérése érdekében. (Nab és mtsai, 1993)

#### Élettani folyamatok matematikai modellezése

Az élő szervezetben lejátszódó biológiai folyamatok jelentős része leírható matematikai egyenletek segítségével.

A modellek kifejlesztéséhez elengedhetetlen az *in vivo* folyamatok részletes ismerete.

Abban az esetben, ha sikerülne egy hatékony, teljes modellt felépíteni, akkor nem indokolná semmi a további állatkísérletek elvégzését. Jelenleg azonban a számítógépes modellekből származó eredmények csak közelítik a valóságot, ezért állatkísérletre mindenképpen szükség van, hogy a számítógépes modellből származó adatokat igazolhassuk (Carson, 1986).

## Modellezés emberen

Valójában a toxikológiai vizsgálatok legjobb modellje az ember lenne, azonban ennek nemcsak etikai, hanem jogi és gyakorlati akadályai is vannak. A gyógyszerkutatás területén azonban mégis jogszabályi előírás az engedélyezés preklinikai fázisának lezárulása után az emberi modellek alkalmazása. Az ilyen vizsgálatokra csak állatkísérletek elvégzése után kerülhet sor egészséges önkéntesek bevonásával. A folyamat során csak minimális kockázat fogadható el. Ezen módszer alkalmazásával tovább finomítható a fajok közötti extrapolációs probléma, ugyanis az állatkísérletekből származó adatok emberre vonatkoztatása mindig problémát okoz az ember és az állatok között fennálló anatómiai, élettani, biokinetikai és farmakológiai, illetve toxikológiai válaszaik különbözőségei miatt (Nab és mtsai, 1993).

## Más alternatív módszerek

Bizonyos esetekben a kísérleti állatok pótlására vágóhídról származó szervek kerülhetnek felhasználásra. Erre példa a vágóhídról származó szarvasmarha- és csirkeszemek *in vitro* szemirritációs vizsgálatokban való felhasználása, így helyettesítve a nyúlön végzett *in vivo* szemirritációs vizsgálatot.

A BCOP, az ICE és 7 (Red blood cell haemolysis test, Neutral red uptake test, Fluorescein leakage test, EYTEX, HET-CAM, Silicon microphysiometer test, IRE) másik tesztet minősítettek a legígéretesebb alternatívának. Az elsődleges cél a szemet súlyosan irritáló vegyületek lehetséges azonosítása, az irritatív és nem irritatív kategóriák megállapítása mellett (Balls és mtsai., 1995).

Balls és munkatársai (1995) 60 vegyi anyagon az előbb említett kilenc módszer mindegyikét elvégezte. Vizsgálataik alapján egyik módszer sem volt képes a szemirritációs potenciál azonosítására (a maximális teljes korreláció 0,34-0,55 között változott), melynek okát abban látták, hogy az *in vivo* adatokból származó eredményekre egyetlen MMAS (Modified Maximum Average Score) paramétert használtak. Ezen vizsgálatok eredményeképpen 2004-ben 4 módszer (HET-CAM, BCOP, ICE, IRE) újraprofilálására került sor. Továbbra is elsődleges célként, a súlyosan irritatív anyagok kiszűrésére.

### 3.3.1 Izolált szemek felhasználása

Burton és munkatársai 1981-ben izolált nyúl szemet használtak a szemirritáció *in vitro* értékeléséhez. Felfedezték, hogy az *in vivo* szemirritációs teszt során vizsgált szaruhártya elváltozás és az izolált nyúl szem réslámpával vizsgált megvastagodása (duzzanata) között szoros kapcsolat áll fenn (Burton, 1972). Ez idő tájt más tudósok is publikáltak a réslámpás vizsgálat hasznosságáról a szemirritációs vizsgálatok kapcsán, és azon belül is a szaruhártya vizsgálata terén (McDonald és mtsai., 1973; Prinsen és mtsai., 2017).

Az izolált nyúl szemek használatának ötlete tudományos szempontból nagyon tetszetős volt, hiszen tulajdonképpen egy *ex vivo* szemet használnak *in vivo* szemként, és a mért paraméterek (szaruhártya-vastagság, szaruhártyahomály, fluoreszcen-megtartás) közvetlenül összehasonlíthatók az *in vivo* mért paraméterekkel. Emiatt Koeter és Prinsen (1985) egy *in vitro* szemirritációs teszt bevezetését javasolták, amellyel csökkenthetővé válik a kísérleti állatok száma.

Ugyanebben az időben számos más kutató is tanulmányozta az izolált nyúl szemet az *in vivo* teszt alternatívájaként, úgymint York és munkatársai (1982), Price és Andrews (1985), Jacobs és Martens (1988, 1990), amelynek eredményeképpen az izolált nyúl szemet felhasználó teszt (REET: Rabbit Enucleated Eye Test) bekerült az EK alternatív módszereiről szóló tanulmányába (EC, 1991; Prinsen és mtsai., 2017). A REET a jelenlegi IRE elnevezésű teszt elődje.

Mivel a kísérleti állatokból származó nyúl szem beszerezhetőségét korlátozónak találták, ezért a vágóhídról származó szemeket kezdték tanulmányozni. Bár a sertés szeme hasonlít a legjobban az emberi szemhez (Doughty és Zaman, 2000), az izolált szem tesztből származó eredményeknek az *in vivo* szemirritációs tesztből származó eredményekkel kell korrelálniuk, hogy alternatívaként elfogadhatóak legyenek. Ennek következtében olyan szemre volt szükség, amely a nyúl szemhez hasonlít legjobban. Ilyen szem a csirkeszem, amely mind méreteiben, mind szaruhártya-vastagságban hasonló a nyúl szaruhártyájához (Fowler és mtsai., 2004).

A vágóhídi állatok szemével végzett első vizsgálatok Prinsen és Koeter (1993) nevéhez fűződnek.

Prinsen 1996-ban 44 vegyületet vizsgált ICE teszttel, amely során arra a következtetésre jutott, hogy az ICE teszt megfelelő elővizsgálati módszere az *in vivo* tesztnek ( $r = 0,86-0,92$ ), és hogy csak azokat az anyagokat szükséges *in vivo* teszttel megvizsgálni, amelyek irritatívnak minősülnek a csirkeszemet felhasználó módszer alapján.

Thoft és Friend (1977) vizsgálataik során megállapították, hogy az ICE az *in vivo* teszt célszerű előszűrője, valamint csak azon anyagok eredményeit kell nyúl szem tesztel megerősíteni, amelyek az ICE-ben enyhén vagy nem irritatívnak minősülnek, mivel ezek érzékenyebbek a laboratóriumok közötti és laboratóriumon belüli különbségekre.

Maurer és munkatársai (2002) vizsgálataik során azt a következtetést vonták le, hogy a szaruhártya sérülésének mélysége az expozíció korai szakaszában (első 3 óra) előre jelezheti a várható szemkárosodás mértékét és időtartamát. Általánosan az enyhén irritatív vegyi anyagok csak a szaruhártya felületén okoznak károsodást, a gyengén és mérsékelten irritatív anyagok főként az epithéliumon és a stroma felületén, míg a súlyosan irritatív anyagok a stroma mélyebb részeit is károsítják, akár a stroma egész mélysége érintett lehet (2. ábra).

A módszer a szaruhártya-vastagságát, homályát és fluoreszcen-megtartását méri. Ennél az eljárásnál rövidtávon *in vitro* fenntartható a csirkeszem működése. A vizsgálat által okozott károsodás jellemzése ennél a módszernél a szaruhártya felduzzadásának, opacitásának és károsodásának értékelése útján történik (Buda, 2012).

Prinsen és Koeter 1993-ban 21, Prinsen 1996-ban és 2005-ben 94 vegyületet vizsgált meg, amelyek során azt a következtetést vonták le, hogy elegendő adat áll rendelkezésre annak alátámasztásához, hogy az ICE teszt - bizonyos korlátokkal – egy többlépcsős tesztelési stratégiában szűrési módszerként kerüljön alkalmazásra a szemet maró vagy súlyosan irritáló vegyületek azonosításában. Ezt a megállapítást az ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) is megerősítette 2006-ban.

Az ICE teszt előnyei közé tartozik, hogy stabil, a gyakorlati aspektusai nem bonyolultak és viszonylag könnyen kontrollálhatók (Prinsen és mtsai., 2017); izotóniás sóoldat elég a szemek állapotának fenntartásához; minden vegyületet lehet vele tesztelni, azok fizikai-kémiai tulajdonságaitól függetlenül; jól illeszkedik a toxicitási tesztek többlépcsős megközelítésébe.

Hátrányaként említhető, hogy a kezelés okozta szemkárosodások lehetséges gyógyulása nem mérhető (ez egyéb alternatív módszernél is igaz); nincsenek olyan mikroszkópikus elváltozások, amelyek alapján előre jelezhető lenne a reverzibilitás vagy irreverzibilitás (Schutte és mtsai., 2009).

Az ICE tesztel párhuzamosan egy, a vágóhídról származó szarvasmarha szemekkel végzett tesztet (BCOP - Bovine Cornea Opacity/Permeability test) is kifejlesztettek, amely Gautheron és munkatársai (1992) nevéhez fűződik.

A BCOP vizsgálat a szaruhártyát érintő szemirritáció két fontos összetevőjét vizsgálja – a homályosságot (opacitást) és az átteresztőképességet (permeabilitást) (Gautheron és mtsai.,



1992). Az opacitás, amelyet a szaruhártyán átmenő fény mennyisége alapján határoznak meg, kezdetben az egyetlen szaruhártyavégpont volt, amelyet számos *in vivo* szemirritációs vizsgálatban pontosztak és vizsgáltak. A szaruhártyán az irritatív anyagok által okozott homályosság a fehérjék kicsapódását, a duzzanatot, vakuolizációt, a felhám- vagy stromarétegek sérülését jelzi (Millichamp, 1999). A permeabilitást azon nátrium-fluorescein festék mennyisége alapján mérik, amely valamennyi szaruhártya-sejtrétegen áthalad. Mivel azonban a szem irritációja a szivárványhártyára és a kötőhártyára is kiterjedhet, ez a módszer eredetileg nem tükrözte kellően a szemnek az irritatív anyagokra adott komplex reakcióját (Barile, 2010). A kritikák feloldása érdekében számos további végpontot adtak hozzá a BCOP vizsgálatához, beleértve a szaruhártya duzzanatát és a morfológiai elváltozások szövettani értékelését is (Curren és mtsai., 2000; Cooper és mtsai., 2001).

Chamberlain és munkatársai 1997-ben megállapították, hogy a szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló módszer elsősorban a súlyosan irritáló anyagok szűrésére alkalmazható, azonban mindenképpen kiegészítést érdemel.

Debbasch és munkatársai 2005-ben kozmetikai összetevőkön és készítményeken végzett vizsgálatok alapján megállapították, hogy a BCOP vizsgálat eredményei jól korrelálnak az *in vivo* szemirritációs teszt eredményeivel.

Hayashi és munkatársai a HET-CAM és BCOP tesztet vetették össze, és arra a megállapításra jutottak, hogy alkoholok esetében különösen magas a HET-CAM teszt hamis pozitív aránya, ezért inkább a BCOP tesztet javasolják elővizsgálati módszerként.

A BCOP izolált szemtesztben a szarvasmarha-szaruhártya korlátja a mérete, valamint a szaruhártya vastagsága, amely nehézséget okoz az enyhén irritatív anyagok kiszűrésékor (Barile, 2010).

2009 óta az ICCVAM jelentés alapján az ICE (OECD Test Guideline 438) és a BCOP (OECD Test Guideline 437) teszteket elfogadják tesztiránymutatásként a szemet súlyosan irritáló anyagok szűrésére.

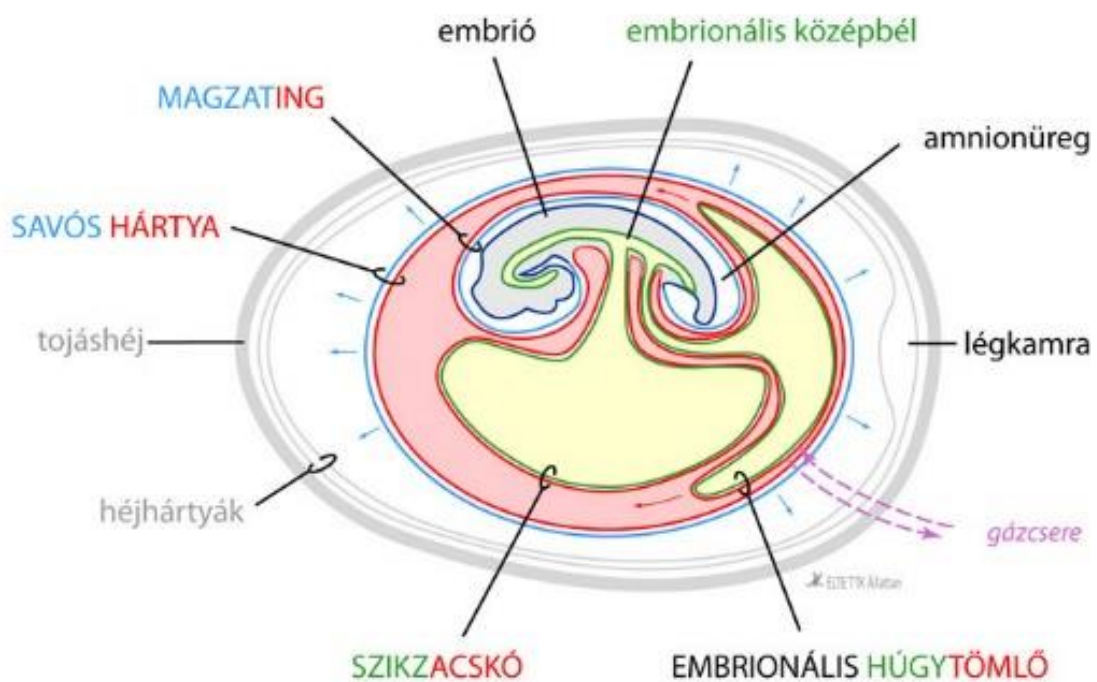
2013 óta nemzetközi szakmai szervezetek állásfoglalása (EC, 2008; ECHA, 2017) szerint az ICE tesztet, a szemet súlyosan irritáló anyagok és a nem kategorizálható/nem irritatív anyagok szűrésére is elfogadják. Minden egyéb, a végpontok kombinációja alapján kapott eredmény esetén javasolható a szemirritációs kategória, de a készítmény tényleges irritációs értékének megállapításához, illetve osztályba sorolásához egyéb *in vitro* vizsgálatokat vagy nyulakon végzett *in vivo* vizsgálatot szükséges elvégezni.

### 3.3.2 A chorioallantois membránt felhasználó organotipikus tesztek

A tyúkembrió a fejlődésének és az életfolyamatainak biztosításához extraembrionális hárttyakkal rendelkezik, amelyek:

- a sziktömlő,
- az amnion (magzating),
- a chorion (membrana serosa, savós burok)
- és az allantois (húgytömlő).

A sziktömlő az embrió táplálásában játszik szerepet. Kialakulása rögtön megtörténik, majd lassan körülveszi a sárgáját. A tápanyagok szállítása a sziktömlőn keresztül valósul meg, azokat az embrió véráramán keresztül adja át. A sziktömlőről való lefűződéssel jönnek létre az embrió magzatburkai (5. ábra). A kelés előtt a szikzacskó mérete lecsökken, majd behúzódik a magzat testébe, és átmenetileg tápanyagforrásként szolgál, majd 5-6 nap múlva felszívódik (Bogenfűst és mtsai., 2000).



5. ábra: A madárembrrió magzatburkai (Molnár és mtsai., 2012)

Az amnion az embriót közvetlenül körülvevő 5 rétegű burok. A 2-3. napon alakul ki. Véd a mechanikai sérüléstől, a kiszáradástól, az extrém hőhatásoktól. Folyadék a fejlődés kései szakaszában táplálja a magzatot (Bogenfűst és mtsai., 2000).

A chorion valamennyi extraembrionális hártát körülöleli. Egyesülve az allantois-szal és a belső héjhártyával, hozza létre a chorioallantois membránt, mely az anyagcserében (táplálkozás, légzés) játszik szerepet (Szabó, 2002).

Az allantois az embrió bélcsatornájának kiöblösödéséből alakul ki a keltetés 3. napján. Az amnion és a chorion közti térbe hatol és összeforr az utóbbival. Fehérjét foglal magába, erekben gazdag bolyhai aminosavakat továbbítanak az embrió számára. Szerepe van a tojáshéjból való kalcium-transzportban is. Az allantois által körülzárt, folyadékkal telt üreg a kiválasztásban is közreműködik (húgysav, illetve annak sói). A tojást teljesen körbeveszi vérerekkel gazdag hártájával. Vérerein át zajlik az embrió légcseréje is (Szabó, 2002).

A chorioallantois membrán (CAM) a keltetés 10. napjára fejlődik ki.

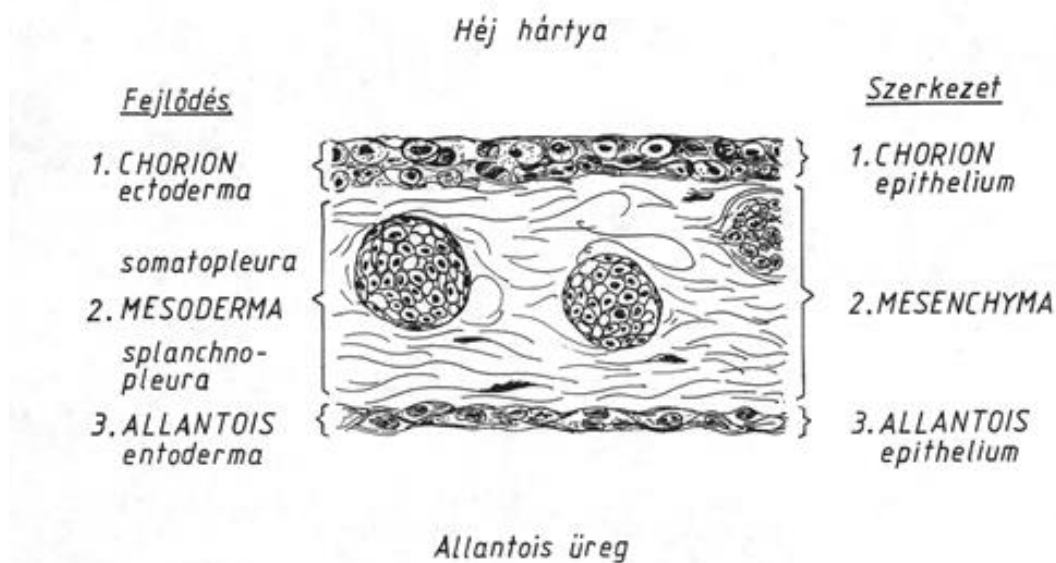
A keltetés 11. napjától a chorioallantois háromrétegű (6. ábra). A külső réteg a héjhártyával érintkező ectodermális eredetű hámréteg. A középső réteg embrionális kötőszövet, a mesenchyma, amely a somato- és a splachnopleurából fejlődik. A belső réteg az entodermából származó allantois-hám.

A chorion hámja köbhámsejtekből áll, két réteget alkot. A külső - héjhártya felőli - hámsejtréteg lap vagy alacsony köbhámsejtekből áll. A belső -mesenchyma felőli - réteget magasabb köbhámsejtek alkotják.

A parietalis mesoderma somato- és splanchopleurája a chorioallantois kialakulásakor összeolvadva egymással egységes mesenchyma-réteget képeznek. A mesenchyma csillag alakú sejtjei hosszúak, nyúlványosak. A mesenchyma héjhártya felőli rétegében szűk és vékonyfalú, az allantois közelében tág ereknek haladnak.

Az allantois egyrétegű laphámsejtekből áll. Az intercelluláris rések helyenként járatokat alkotnak, amelyekbe vastos, hosszú, esetenként elágazódó bolyhok nyúlnak be. Az allantois hámsejteknek a tömlő ürege felőli felületén rövid, vastos nyúlványok, bolyhok és invaginációk találhatóak (Fáncsi és Fehér, 1978).

A csirke magzat chorio - allantois membránja



6. ábra: A chorioallantois membrán szerkezete (Fáncsi és Fehér, 1978)

A chorioallantois membrán a biológiai és tumor kutatásokban már hosszabb ideje részt vesz (Beveridge és Burnet, 1946). Ennek alapját az emberi vagy nyúl szemhez való hasonlósága adja (Barile, 2010). A csirkeembriót tesztobjektumként számos esetben alkalmazzák a különböző vegyi anyagok toxikus és teratogén hatásának becslésére (Verrett és mtsai, 1980; Fisher és Schoenwolf, 1983).

Chorioallantois membránt felhasználó tesztek: a Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA), a Chorioallantoic Membrane – Trypan blue festés (CAM-TB) és a Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).

A CAMVA tesztet Leighton és munkatársai (1985) alkalmazták először, majd Bagley és munkatársai (1989, 1991) fejlesztették tovább. Elsősorban kozmetikumok irritációjának becslésére alkalmazzák, kifejezetten az Amerikai Egyesült Államokban. A módszer a lehetséges irritációt jelzi a chorioallantois membrán érrendszeri károsodásai alapján. A keltetés 4. napján kis nyílást vágnak az embrionálódott tojás héján, és egy kis mennyiségű albumint eltávolítanak. A nyílást ezután lezárják, és a tojást további 6 napig keltetik. A chorioallantois membrán a 10. napra éri el a megfelelő fejlettségi állapotot (Bagley és mtsai, 1992, 1994). Ezen a napon a vizsgálati anyagot közvetlenül a CAM-ra juttatják. 30 perc eltelte után megfigyelhetőek az érrendszeri elváltozások (vérzés, hyperaemia, vér nélküli erek). A kísérlet végpontjának a tesztanyag azon koncentrációja tekinthető, ami a kezelt tojások 50%-án okoz érrendszeri elváltozást.

A CAM-TB a Japán Egészségügyi Minisztérium “Studies on the test methods to evaluate the safety of new ingredients of cosmetics” (Ohno és mtsai., 1999) című programjának részeként vált ismertté, bár a módszert 1991-ben már alkalmazták (Hagino és mtsai. 1991, 1993). A tripánkék festés célja eredetileg egy olyan eljárás kifejlesztése volt, ami csökkenti a HET-CAM teszt szubjektivitásából eredő esetleges hibalehetőséget, és objektívebb eredményt ad. A technika lényege, hogy a CAM által megkötött tripánkék festék mennyiségéből a CAM tényleges károsodására lehet következtetni. A módszert széles körben alkalmazzák a membránkárosodás és az élő sejtek mennyiségének meghatározására (Hagino és mtsai., 1999). Hátránya, hogy a színes anyagok a festést, mint a kísérlet végpontját, zavarhatják (Ohno és mtsai., 1999).

A HET-CAM (Hen’s Egg Test – Chorioallantoic Membrane) tesztet Luepke és Kemper 1986-ban 190 különböző vegyi anyag és készítmény bevonásával tanulmányozták. Vizsgálataik alapján az *in vitro* tesztből származó eredmények jól korreláltak az *in vivo* tesztből származó eredményekkel. A kutatást Luepke és Wallat 1987-ben tovább folytatták, amely alapján arra a megállapításra jutottak, hogy a HET-CAM teszt alkalmas lehet a kísérletekben felhasznált állatok számának csökkentésére, bár a módszer teljes egészében nem képes az *in vivo* vizsgálatok kiváltására.

Leighton és mtsai (1985), Luepke, (1985), Parish (1985), valamint Luepke és Kemper (1986) a tyúktojás chorioallantois membránját használták a vegyi anyagok által okozott károsodások kimutatására. Az *in vitro* vizsgálatból származó eredmények jó korrelációt mutattak az *in vivo* adatokkal.

1990-ben Lawrence és munkatársai további vegyi anyagokkal végezték el a HET-CAM tesztet, amelyhez 10 napos embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránját használták fel. A kezelést követően a membránt 5 percig figyelték meg és értékelték a lízis és a vérzések kialakulását. Az *in vivo* és *in vitro* tesztekéből származó eredmények összehasonlításakor korlátozott mértékű korrelációt állapítottak meg.

Blein és munkatársai (1991) vizsgálataik során megállapították, hogy a HET-CAM teszt adatai jó korrelációt mutattak az *in vivo* adatokkal. Ők észlelték először a teszt túlérzékenységet, valamint azt, hogy a színes, sötét színű vizsgálati anyagok esetében nem határozható meg az irritáció.

Nedvesítő szerek és kozmetikai termékek irritációs potenciálját határozták meg Rougier és munkatársai 1992-ben a HET-CAM teszttel. Az általuk kapott eredmények alapján jól korreláltak az *in vitro* eredmények az *in vivo* irritációs adatokkal.

Bagley és mtsai (1992; 1994) a HET-CAM teszt mellett 4 másik *in vitro* tesztet alkalmazva - vizsgálták háztartási vegyi anyagok irritációs potenciálját. A chorioallantois membránt felhasználó kísérleti módszerek kitűnő reprodukálhatóságát figyelték meg. A HET-CAM teszt esetében megállapították, hogy az eredmények jó korrelációt (HET-CAM teszt  $r = 0,77$ ) mutatnak az *in vivo* adatokkal.

A kilencvenes években a HET-CAM teszt jövőbeni pozitív felhasználhatósága reményében további összehasonlító vizsgálatokat végeztek. 1993-ban Spielmann és munkatársai nagyon jó eredményeket kaptak a HET-CAM teszttel. Megállapították, hogy az *in vitro* teszt a jövőben alkalmas lehet a primer szemirritáció vizsgálatára, alternatív módszerként.

Ohno és munkatársai (1995) 12 féle *in vitro* módszert hasonlítottak össze, melyek szóba kerülhetnek, mint *in vivo* teszt alternatíva. A vizsgálataikban a HET-CAM teszttel kapták a legjobb eredményeket. Megállapításra került viszont az, hogy egyetlen *in vitro* módszer sem alkalmas általánosan a különböző típusú vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására, erre a célra csak különböző *in vitro* módszerekből álló *in vitro* tesztrendszer lehet alkalmas.

Christian és Diener 1996-ban egyik cikkükben összefoglalták azokat az alternatív módszereket a HET-CAM teszt mellett, amelyek ha önmagukban nem is, de más *in vitro* módszerekkel kombinálva, tesztrendszerként felhasználhatók a szemirritációs potenciál meghatározására.

1999-ben már széles körben alkalmazták a HET-CAM tesztet, különösen felületaktív anyagot tartalmazó készítmények okozta szemirritáció értékelésének szempontjából, és egy megbízható előrejelző módszernek tartották a szemirritáció megállapítására (Steiling és mtsai., 1999). Ugyanebben az évben Doucet és munkatársainak vizsgálatai gyenge korrelációt mutattak az *in vitro* és *in vivo* tesztek eredményei között (Doucet és mtsai., 1999).

Budai és munkatársai 2000-ben a HET-CAM tesztet hisztológiai vizsgálattal egészítették ki. Vizsgálataikban kapott *in vitro* és *in vivo* eredmények összehasonlítása során a HET-CAM tesztből származó adatok jó korrelációt mutattak az *in vivo* szemirritációs tesztből származó adatokkal.

Budai (2002) mezőgazdasági vegyi anyagok, elsősorban növényvédő szereken végzett vizsgálatai eredményeképpen jó korrelációt kapott az *in vivo* tesztből nyert adatokkal. Ugyanakkor megállapította, hogy az *in vitro* módszer önmagában nem alkalmas az emlősállatokon végzett vizsgálat kiváltására.

Debbasch és munkatársai (2005) kozmetikai összetevőket és készítményeket teszteltek HET-CAM, BCOP és Corneal Epithelial Cell Line (CEPI) tesztekkel. A HET-CAM tesztről megállapították, hogy a már kereskedelmi forgalomban elérhető, nem irritatív kozmetikumokat

irritatívnak mutatja. Ezen eredményt azzal magyarázták, hogy mindegyik készítmény jelentős mértékben tartalmazott felületaktív anyagokat (De Silva és mtsai., 1992; Steiling és mtsai., 1999).

Vinardell és Mitjans (2006) ipari és laboratóriumi vegyszereket vizsgált a CAM-on. A módszert elővizsgálati módszerként javasolják, és nagy előnyének tartják az olcsóságát.

Kishore és munkatársai (2008) fungicideket és növekedés-szabályzókat teszteltek a HET-CAM módszerrel. A kapott *in vitro* eredményeiket *in vivo* tesztből származó irodalmi adatokkal vetették össze és jó korrelációt állapítottak meg.

Ying és munkatársai (2010) öt tesztből álló tesztrendszerrel dolgoztak ki, melynek a HET-CAM teszt is része. A tesztrendszerben citotoxicitási vizsgálat is szerepel. A szerzők a tesztrendszer megbízhatóságáról és reprodukálhatóságáról számoltak be.

Scheel és munkatársai (2011) évtizedeken keresztül kiterjedt kutatásokat végeztek az *in vivo* szemirritációs teszt alternatíváinak kifejlesztésére. Tanulmányaik alapján hasznosnak bizonyulnak a HET-CAM tesztből származó eredmények, de mindenképpen csak többszintű megközelítésben, nem pedig önálló osztályozási módszerként.

Hayashi és munkatársai (2012) több alternatív módszer (STE, EpiOcular, HET-CAM, BCOP) eredményét elemezték. Vizsgálataik eredményeként mindenképpen többszintű megközelítést javasolnak az alternatív módszerek felhasználása kapcsán a szemirritáció pontos meghatározására.

Tavaszi (2012) mezőgazdasági vegyi anyagok irritációs tulajdonságait vizsgálta a HET-CAM teszttel az *in vivo* szemirritációs vizsgálattal szemben, és nagyfokú egyezést tapasztalt az eredmények összehasonlításakor. Megállapította a HET-CAM teszt érzékenységét, és elővizsgálati módszerként javasolt alkalmazását.

Jírová és munkatársai (2014) kutatásaikból arra következtettek, hogy minden *in vitro* módszerhez kapcsolódik egy szemirritációs végpont, és csak részleges információt ad a tesztelt anyag hatásmechanizmusáról. Továbbá, bár túlbecsül, de a HET-CAM vizsgálat biztosítja a legalacsonyabb hamis eredmények arányát és értékes eredményeket szolgáltat a kötőhártyával kapcsolatosan is.

A HET-CAM módszer nemcsak az *in vivo* teszt helyettesítésére szolgálhat, hanem felhasználhatják gyulladást okozó hatások vizsgálatára, melyben a chorioallantois membrán modellezi az emberi kötőhártyát. Meghosszabbított kezelési idő után az értékelés makroszkopikusan zajlik, szövettani vizsgálatok bevonásával (Parish, 1985).

A vérerekkel és kapillárisokkal átszőtt chorioallantois membrán vérrendszerében bekövetkező változások jól modellezik azon károsodásokat, amelyek kémiai irritáció hatására

alakulnak ki a szem kötőhártyáján. A vizsgálatnak nagy előnye egyszerűsége, gyorsasága, olcsósága és érzékenysége (Prinsen és mtsai., 2017).

A módszer korlátját jelenti a kiértékelés szubjektív természete (Tavaszi, 2012), valamint az, hogy a feljegyzett másodpercek száma nem fordítható le közvetlenül egy *in vivo* hatásra (Prinsen és mtsai., 2017).

Mind az eredmények, mind maga a módszer ígéretesnek bizonyult az eddigi vizsgálatok alapján, ugyanis a tyúk chorioallantois membránja könnyen hozzáférhető, vérerekkel gazdagon átszőtt, a tesztstruktúrát könnyű beszerezni, és különböző kutatási területeken is használható (Budai, 2002).

### **3.3.3 Citotoxicitási tesztek**

A citotoxicitási tesztek alkalmazásának alapja a szemirritációs potenciál megállapításakor az a megfigyelés, hogy az egyes szemre káros hatású anyagok citotoxikus hatást fejthetnek ki a szem különböző hártárainak sejtjein (Barstadt és mtsai., 1991).

A Neutral Red Uptake (NRU) az egyik legszélesebb körben használt citotoxicitási teszt. A vizsgálati anyag azon képességét méri, hogy mennyire képes megakadályozni a semleges vörös festék (neutral red) adszorpcióját. A festék ugyanis áthatol a sejtmembránokon és akkumulálódik a lizoszómákban. Ha a sejthártya megváltozik vagy a lizoszomális membrán érzékeny, a vörös festék adszorpciója megnövekszik. Az NRU vizsgálatban egyrétegű, közel összefolyó sejtenyészetet hoznak létre, és hígítási sorozatokban inkubálják a tesztanyagokat, koncentrációk széles skáláját létrehozva. A tesztanyaggal történő expozíció után 24 vagy 48 órával a sejteket átmoszák, és 3 órán keresztül inkubálják közepes erősségű semleges vörös festékbe áztatva. Ezután a sejteket átmosó/fixáló oldattal kezelik, majd megfelelő oldószerrel leoldják a festéket. A keletkezett oldat optikai sűrűségét (OD) 540 nm-en mérik. A dózis-válasz görbéből kapják meg azt a tesztanyag koncentrációt, ami 50%-os gátlást hoz létre a festék adszorpciójában a tesztanyaggal nem érintkező kontroll mintákhoz képest. Ez az úgynevezett  $NRU_{50}$  vagy  $IC_{50}$  érték szolgál toxikológiai végpontként (Barstadt és mtsai., 1991).

A tetrazólium sók felfedezése a tizenkilencedik század utolsó évtizedére esett, mégis részletesebb tanulmányozásukra csak az 1940-es években került sor (Smith, 1951), amikor is Moewus a tetrazólium sók növényekre gyakorolt mutagén hatásáról tett jelentős felfedezést



(Hegy, 2014). Strauss pedig 1948-ban kimutatta, hogy a daganatos szövetek több formázant képeznek, mint a normál szövetek.

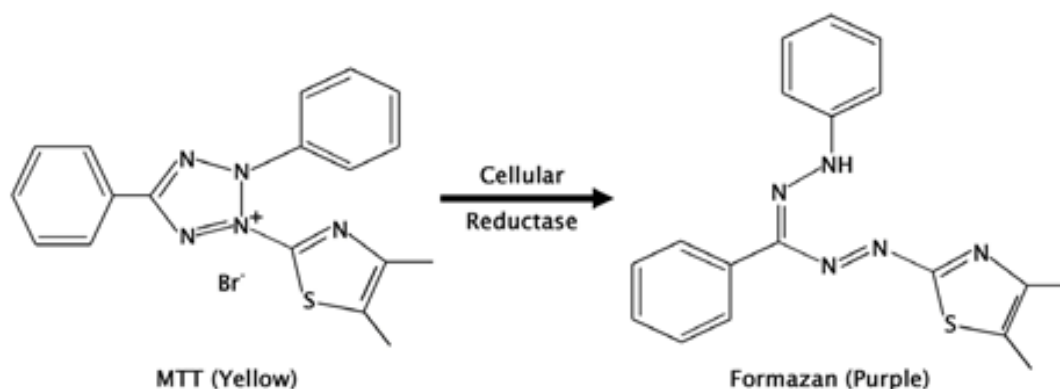
A tetrazólium sók közül legszélesebb körben alkalmazott MTT-t (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) 1957 után szintetizálták és kezdték el tanulmányozni (Altman, 1976). A Mosmann (1983) által leírt módszer jelentette az alapot az MTT-t használó eljárások tekintetében. Mosmann emlős sejtek aktivitásának, növekedésének és túlélésének tanulmányozására fejlesztette ki az MTT kolorimetriás módszert (Mosmann, 1983).

Mosmann modelljét alapul véve számos tudós vizsgálta a módszert és terjesztette ki alkalmazhatóságát (Gerlier és Thomasset, 1986; Scudiere és mtsai., 1988). Ezeket a továbbfejlesztett módszereket sikeresen alkalmazzák ma az immunológiában, a toxikológiában a sejtbiológiában különböző emlőssejtek, köztük daganatos sejtek életképességének, növekedésének és vegyszerérzékenységének (Carmichael és mtsai., 1987; Twentyman és Luscombe, 1987; Alley és mtsai., 1988; Campling és mtsai., 1991; Berridge és Tan, 1993; Liu és mtsai., 1997; Takahashi és mtsai., 2001) vizsgálatára.

Az MTT és a tetrazólium sók redukcióján alapuló kolorimetriás módszerek legfőbb előnye az egyszerűségük és gyorsaságuk. Ahhoz azonban, hogy a hagyományos *in vivo* módszerek alternatívájaként szolgáljanak, még számos paraméter pontos meghatározása és beállítása szükséges (Hegy, 2014).

Manapság a tetrazólium sók csökkenésének mérése széles körben elfogadott, mint a sejtproliferáció vizsgálatának megbízható módszere (Kováts, 2013).

A módszer az élő sejtek azon tulajdonságán alapszik, miszerint képesek a vízoldható tetrazólium sót vízoldhatatlan formazánná (7. ábra) alakítani (Twentyman és Luscombe, 1987), és az így keletkezett formazán mennyisége spektrofotometriás úton meghatározható. Ezen értékből az élő sejtek számára következtethetünk (Mosmann, 1983; Peck, 1985; Denizot és Lang, 1986). A sárga színű, vízben jól oldódó MTT redukálódik a sejtek mitokondriumaiban a vízben oldhatatlan lila formazán kristályokká (Plumb és mtsai., 1989).



7. ábra: Az MTT formazánná redukálódása (cosmobio.com)

A citotoxicitási vizsgálatoknak megvan az az előnye, hogy egyszerű, gyors eljárásúak, alacsonyak a költségeik, ezért együttes alkalmazása az EpiOcular vizsgálattal vagy a BCOP vizsgálattal jól illeszkedik a többszintű megközelítéshez. Ez pedig egyszerre idő és költség megtakarítási funkciókkal bír (Hayashi és mtsai., 2012).

Prinsen és munkatársai szerint a citotoxicitási tesztek jobb reprodukálhatóságot biztosítanak a vizsgálatot végző laboratóriumok között, mint a HET-CAM teszt (Prinsen és mtsai., 2017).

### 3.3.4 Más alternatívák

A 2000-es évek elején megjelentek az úgynevezett 3D modellek, mint például az EpiOcular™ teszt és a SkinEthic emberi szaruhártya-felhám teszt.

Az EpiOcular™ egy *in vitro* emberi szaruhártya-modell, amely egy háromdimenziós, normál emberi felhám-keratinsejteket tartalmazó, *in vitro* emberi szaruhártya epithélium. A szövetszerkezetnek levegő-folyadék érintkezési felülete van, és olyan morfológiai és növekedési jellemzőkkel bír, amelyek szimulálják az *in vivo* körülményeket. A sejt-életképességet az MTT vizsgálattal mérik, egy ET<sub>50</sub> és IC<sub>50</sub> végpontot használva összehasonlításként a különböző vegyi anyagok és az *in vivo* teszt között. A modell olyan adatokat szolgáltat, amelyek a szemirritáció mértékét tükröző citotoxicitás fokát mutatják meg a mérsékelttől a nagyon enyhe irritációig terjedő tartományban, a mérsékelttől a súlyosig terjedő irritáció által kiváltott reakciókon keresztül (Stern és mtsai., 1998; Barile, 2007; Eskes és mtsai., 2005).

A vizsgálat mind a hidrofílnak, mind a hidrofób, folyékony vagy szilárd állapotú testanyagoknál is alkalmazható, meg tudja különböztetni az enyhén és mérsékelten irritatív anyagokat, és képes

a súlyosan irritatív anyagok azonosítására. Eskes és munkatársai (2005) szerint a rendszer egy organotipikus modellel kombinálva használható lehet az irritációs potenciálok teljes skálájának lefedésére.

Az EpiOcular™ modellhez hasonlóan a SkinEthic HCE™ modell is emberi szaruhártya epithéliális sejtekből áll. A rekonstruált szövet rétegzett és jól szervezett epithéliumot alkot, amely szerkezetileg, morfológiailag és funkcionálisan hasonló a humán szaruhártyához. A kezelést követően a sejtek életképességet MTT vizsgálattal mérik. Jelenleg a tanulmányok azt mutatják, hogy a modell használható lehet a vegyi anyag összetevők és alapanyagok szemirritációs tesztjének előszűrőjeként. A HCE modell szintén alkalmas a szaruhártya regenerálódásának *in vitro* mérésére (De Wever és mtsai., 2002; Nguyen és mtsai., 2003).

E modellek hátránya viszont, hogy csak a szaruhártya hámrétegét alkotják újra, amely problémát okozhat a közepesen irritáló és a súlyosan irritáló anyagok elkülönítésekor (Prinsen és mtsai, 2017).

## 4. KÍSÉRLETI RÉSZ

### 4.1. Vizsgálati anyagok

A kísérletek során az alább felsorolt gyomirtó, gombaölő és rovarölő növényvédő szerek kerültek felhasználásra. A HET-CAM teszt és ICE teszt során 100%-os töménységben alkalmaztam őket, míg az MTT vizsgálatnál a módszernél leírt hígításokban.

A készítmények toxikológiai értékelő adatlapját (Toxicological studies on the Plant Protection Product, Annex III A, Section 3, Tier II – Summary: Toxicological studies) a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság Növényvédő szer és Termésnövelő anyag Engedélyezési Osztálya bocsátotta rendelkezésemre. Az *in vivo* adatok besorolása során, bár négy irritációs kategóriát használtak, én három kategóriává alakítottam a statisztikai összehasonlíthatóság miatt, ugyanis a reverzibilitást egyik *in vitro* módszer sem tudja megfelelően nyomon követni. Az általam besorolt három kategóriát a GHS szerint (6. táblázat) úgy alakítottam ki (ami az alternatív módszerek esetében is alkalmazott), hogy a 2A és 2B kategóriát egyben kezeltem irritatív kategóriaként.

#### 1. BUMPER 25 EC (propikonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Kalászos, szőlő, cukorrépa kultúrában lisztharmat, rozsdabetegségek, helmintospóriumos és szeptóriás betegség, cercospórák levélrágja ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 3535 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 7,92 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

## 2. COMMAND 48 EC (klomazon)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Őszi káposztarepce, borsó, burgonya, szója, paprika, görögdinnye, olajtök, más kultúrában magról kelő egy- és kétszikű gyomnövények ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 3240 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 2,2 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Korrozív

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

## 3. CYPERKILL 25 EC (cipermetrin)

Felhasználása: Rovarölő szer

Alkalmazása: Kalászos, szőlő, alma, repce, paprika, paradicsom kultúrában vetésfehérítő bogár, lárva, szőlőmolyok, almamoly, repcefénybogár, repcebecő-ormányos, zöld őszibarack levéltetű, gyapottok bagolylepke, üvegházi molytetű ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 682 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 4000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 5 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Irritálja a bőrt

Szemirritáció: Súlyosan irritatív

## 4. DOMARK 10 EC (tetrakonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Almatermésűek, szőlő kultúrában varasodás, lisztharmat ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 2070 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 5,22 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Irritálja a bőrt

Szemirritáció: Súlyosan irritatív

#### 5. DUAL GOLD 960 EC (S-metolaklór)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Bab, borsó, csicseriborsó, cékla, cikória, cirok, cukorrépa, csillagfürt, dohány, gyógynövény, gyümölcs, kínai kel, lencse, len, lóbab, repce, szója, takarmányrépa, tök, burgonya, kukorica, napraforgó kultúrában magról kelő egyszikű gyomok ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 2267 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (nyúl): > 2020 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 5,09 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 6. GLIALKA STAR (glifozát (K-só))

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Mezőgazdaságilag nem művelt területek, lakott területek, kiskertek, szőlő, gyümölcsös, gyep felújítás, erdészet, fakitermelés totális gyomirtására.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): > 5000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 5000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 5,27 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Enyhén irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 7. GLYPHOGAN 480 SL (glifozát (IPA só))

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Almatermésűek, csonthéjasok, erdészet, gabonafélék, gyep, hüvelyesek, kalászosok, kiskertek, legelő, mezőgazdasági kultúrák, mezőgazdaságilag nem művelt területek, vasúti pályatestek, árokpartokon *Cuscuta spp.*, magról kelő egy- és kétszikű gyomok, évelő egy- és kétszikű gyomok ellen és deszikkálásra, totális gyomirtásra, állományszárításra.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): > 5000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 5000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 5,7 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

8. K-OBIOL 25 EC (deltametrin, piperonil-butoxid)

Felhasználása: Rovarölő szer

Alkalmazása: Gabonafélékben, száraz hüvelyesekben és üres raktárakban raktári kártevők ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 710 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 2,69 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Súlyosan irritatív

9. LEOPARD 5 EC (quizalofop-P-etil)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Cukorrépa, napraforgó, szója, bab, borsó, lencse, len, repce, szőlő, almatermésűek, lucerna, paprika, paradicsom kultúrában magról kelő egyszikű gyomnövények, *Sorghum halepense* (magról, rizómáról kelő), *Agropyron repens*, *Cynodon dactilon*, gabona árvakelés ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 5,6 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

10. MECOMORN 750 SL (MCPA dimetilamin só)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Kalászosokban, gyümölcsösben, réten, legelőn, köles, rizs, rostlen, olajlen, szőlő, római kamilla kultúrában kétszikű gyomnövények ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): > 300 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): 2412 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 6,36 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Súlyosan irritatív

#### 11. MIRAGE 45 EC (prokloráz)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Búza, árpa, napraforgó, csonthéjas kultúrákban gabonalisztharmat, szártőbetegségek, helmintospóriumos levélszáradás, kalászfuzáriózis, gombás szár- és tányérbetegségek, monília hajtás- és virágszáradás, blumeriellás levélbetegség, levélyukacsosodás ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 4,99 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 12. MYSTIC 250 EC (tebukonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Csonthéjasok, gabonafélék, szőlő, őszi káposztarepce kultúrában monília, tafrinás betegség, blumeriellás levélfoltosság, lisztharmat, rozsda, szeptória, kalászfuzáriózis, alternáriás-, fómás- és fehérpenészes levél-, hajtás és becőfertőzés ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5,04 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 13. NIMROD 25 EC (bupirimát)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Alma kultúrában lisztharmat ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):5200 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 3700 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5,3 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Irritálja a bőrt



Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 14. ORIUS 20 EW (tebukonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Csonthéjas, kalászos kultúrában monília, apiognomóniás levélfoltosság, blumeriellás levélfoltosság, tafrinás levélfodrosodás, gabonalisztharmat, helmintospóriumos, szeptóriás és pirenofóras betegségek, kalászfuzáriózis ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 3,44 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 15. PROPLANT (propamikarb)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Burgonya, cukorrépa, paprika, paradicsom, uborka, vöröshagyma, saláta, dísznövények, tulipánhagyma kultúrában, erdészeti csemetekertben burgonyavész, csírákori betegségek, talajlakó gombák, paradicsomvész, peronoszpóra, palántadőlés ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 16. PULSAR 40 SL (imazamox)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Borsó, szója, vöröshere, bíborhere, pannonbükköny, lucerna, napraforgó kultúrában magról kelő egy- és kétszikű gyomnövények ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 5000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 4000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 6,6 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 17. RACER (flurokloridon)

Felhasználása: Gyomirtó szer

Alkalmazása: Napraforgó, sárgarépa, petrezselyem, burgonya kultúrában magról kelő kétszikű gyomnövények ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5,1 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Enyhén irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 18. RELDAN 22 EC (klórpirifosz-metil)

Felhasználása: Rovarölő szer

Alkalmazása: Szőlő, almatermésűek, cseresznye, meggy, gabonafélék, repce, mustár, olajretek kultúrában, raktárakban szőlőmolyok, szőlőilonca, amerikai szőlőkabóca, almamoly, levéltetvek, levélaknázó molyok, pajzstetvek, raktári kártevők, repceszárormányos, repcefénybogár, repcebolha, repcedarázs ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 3129 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 5000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5,39 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Irritálja a bőrt

Szemirritáció: Enyhén irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 19. SCORE 250 EC (difenokonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Alma, körte, őszibarack kultúrában varasodás, lisztharmat, körterozsda, tafrinás levélfodrosodás, levéllikasztó betegség ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 3 129 mg/kg  
Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 5000 mg/kg  
Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5,17 mg/l/4 h  
Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt  
Szemirritáció: Nem irritatív

#### 20. SEKATOR (amidoszulfuron, jodoszulfuron, mefenpir-dietil antidótum)

Felhasználása: Gyomirtó szer  
Alkalmazása: Őszi búza, őszi és tavaszi árpa kultúrában magról kelő kétszikű gyomnövények, mezei acat ellen.  
Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 5000 mg/kg  
Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 4000 mg/kg  
Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 1,339 mg/l/4 h  
Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt  
Szemirritáció: Súlyosan irritatív

#### 21. SYSTHANE DUPLO (miklobutanil)

Felhasználása: Gombaölő szer  
Alkalmazása: Alma, cseresznye, körte, meggy, paprika, szőlő, uborka, dísznövények kultúrában lisztharmat, monília, varasodás ellen.  
Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 2250 mg/kg  
Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg  
Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 5 mg/l/4 h  
Bőrirritáció: Mérsékelten irritálja a bőrt  
Szemirritáció: Közepesen irritatív  
Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

#### 22. TANDUS 200 EC (fluroxipir)

Felhasználása: Gyomirtó szer  
Alkalmazása: Kalászosok, kukorica kultúrában aprószulák, sövényeszulák, hamvas szeder, magról kelő kétszikű gyomnövények ellen.  
Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2500 mg/kg  
Dermális LD<sub>50</sub> (patkány):> 2000 mg/kg  
Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány):> 1 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Nem irritatív

### 23. TOPAS 100 EC (penkonazol)

Felhasználása: Gombaölő szer

Alkalmazása: Almatermésűek, csonthéjasok, paradicsom, paprika, szőlő, kabakosok, dió, mogyoró, mandula, rózsa, szamóca, ribiszke, köszméte, közterületi díszfák kultúrában lisztharman, varasodás, monília, gnomóniás levélfoltosság, mikoszfereállítás-, diplokarponos levélfoltosság, rozsdabetegségek ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 2574 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 4000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): 5,294 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Enyhén irritálja a bőrt

Szemirritáció: Súlyosan irritatív

### 24. VERTIMEC 1,8 EC (abamektin)

Felhasználása: Rovarölő szer

Alkalmazása: Paprika, paradicsom, dohány, dísznövény, uborka, körte, burgonya, szőlő, görögdinnye kultúrában takácsatkák, virágt tripsz, aknázólégy ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): 891 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 5050 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 5,04 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

### 25. WARRANT 200 SL (imidakloprid)

Felhasználása: Rovarölő szer

Alkalmazása: Burgonya, dohány, őszibarack, paprika, paradicsom, uborka kultúrában burgonyabogár, levéltetvek, talajlakó és fiatalkori kártevők, dohány tripsz, zöld őszibarack levéltetű ellen.

Toxicitás: Orális LD<sub>50</sub> (patkány): > 3000 mg/kg

Dermális LD<sub>50</sub> (patkány): > 2000 mg/kg

Inhalációs LC<sub>50</sub> (patkány): > 5,04 mg/l/4 h

Bőrirritáció: Nem irritálja a bőrt

Szemirritáció: Közepesen irritatív

Statisztikai kiértékeléshez általam használt besorolás szerint: Irritatív

## 4.2. Vizsgálati módszerek

A 3.3-as fejezet alfejezeteiben a perspektivikus alternatív módszereket mutattam be. A továbbiakban részletesen azzal a három ígéretes módszerrel foglalkozok, amelyeket a kutatásaim során alkalmaztam.

### 4.2.1. HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantois Membrane) teszt

A kísérletet az Invitox Protocol 47. száma (1990) alapján végeztem el.

Szükséges eszközök:

- Asztali keltetőgép (Ragus, Vienna, Austria)
- Tojásátvilágító lámpa
- Stopperóra
- Sebészi csipesz
- Szemcseppentő
- Főzőpohár
- Nagyító

Szükséges anyagok:

- Fiziológias NaCl-oldat
- 1%-os SDS (Na-lauril szulfát)
- 0,1 M NaOH

A vizsgálathoz magas termékenységi mutatókkal rendelkező (White Leghorn) tyúktojásokat használtam, amelyeket a sármelléki Goldavis Kft. telephelyéről szereztem be.

A tojásokat lámpáztam, majd a terméketleneket eltávolítottam.

A keltetés 37 °C-on 60-70%-os relatív páratartalomnál Ragus típusú inkubátorban történt. A tojásokat naponta többször forgattam (Spielmann, 1997), hogy az embrió ne tapadjon le. A keltetés 9. napján ismét lámpáztam, a nem megfelelően fejletteket kivettem. A 10. napon kezelhetővé váltak a tojások.

A kezeléshez szükséges előkészítés során a tojások mészhéját a légkamra fölött sebészi csipesszel körülvágtam és eltávolítottam. A héjhártyát 0,9%-os NaCl oldattal nedvesítettem (8. ábra), majd sebészi csipesszel óvatosan felhúztam (9. ábra),



8. ábra: A megnedvesített héjhártya (saját kép)



9. ábra: A megnedvesített héjhártya eltávolítása (saját kép)

a chorioallantois membrán szabaddá vált, alkalmas lett a kezelésre (10. ábra).



10. ábra: A kezelésre alkalmas CAM (saját kép)



Kontrollként 2 db tojást 0,9%-os NaCl oldattal, standardként ugyancsak 2 db tojást 1%-os Na-laurilszulfát (SDS) és 0,1 M NaOH oldattal kezeltem.

A kezelést minden vizsgálati anyag esetén 6 db tojáson 4 ismétléssel végeztem.

A membránra 0,3 ml tesztanyagot cseppentettem, és a kezeléstől mért 5 percig figyeltem meg.

A membrán elváltozásainak típusait (vérzés, véredény lízis (11. ábra) vagy koaguláció) kezdő idejét másodperc pontossággal jegyeztem fel.



11. ábra: Lízis a membránon (saját kép)

Az adatok feldolgozása a protokollban meghatározott alábbi algoritmus alapján történt:

$$RI = \frac{301 - \text{secH}}{300} \times 5 \frac{301 - \text{secL}}{300} \times 7 \frac{301 - \text{secC}}{300} \times 9$$

ahol RI: irritációs index; sec: megjelenési idő másodpercben; H: vérzés; L: érlízis; C: koaguláció

Az algoritmus alapján kiszámított részindexek átlagából irritációs indexeket képeztem és ez alapján a 2. táblázatban látható kategóriákba soroltam. Így kaptam meg a vizsgálati anyag irritációs osztályba sorolását.

2. táblázat: A HET-CAM teszt irritációs kategóriái

<b>Irritációs index</b>	<b>Irritációs kategória</b>
0-0,9	nem irritatív
1-8,9	irritatív
9-21	súlyosan irritatív

#### **4.2.2. ICE (Isolated Chicken Eye) teszt**

A kísérletekhez a helyszínt és a feltételeket a TOXI-COOP Toxikológiai Kutatóközpont Zrt. balatonfüredi telephelye biztosította.

Az ICE tesztet az OECD 438 irányelv alapján végeztem.

Szükséges eszközök:

- Szuperfúziós készülék
- Réslámpa (Haag-Streit BQ 900, Switzerland)
- Pipetta
- Főzőpohár
- Lombik
- Sebészi csipesz
- Sebészi olló

Szükséges anyagok:

- Fiziológias NaCl-oldat
- 30 (w/v)% triklórecetsav
- 2 (v/v)% fluoreszcein-oldat

A vágóhídról származó csirkefejek beszerzése minden esetben adott napi vágásból történt, mivel csak ebben az esetben biztosítható elegendő idő a szaruhártyák megfelelő biokémiai és fiziológiai működésének fenntartására a vizsgálat során. A szemeknek ugyanis a vágástól számított 2 órán belül izolált körülményeket biztosító szuperfúziós készülékbe kell kerülniük. A csirkefejek szállítása az erre a célra előkészített fiziológias sóoldattal megnedvesített papírt tartalmazó műanyag dobozban történt.

##### **4.2.2.1 A csirkeszemek előkészítése**

A szemek vizsgálatra való előkészítéséhez egy sebészi csipesszel megfogtam a szemhéjat, óvatosan emeltem a szaruhártya felszínétől, majd egy olló segítségével eltávolítottam a szemhéjat úgy, hogy közben ne sértsem meg a szaruhártya felszínét. Az így szabaddá vált szaruhártya felszínére egy csepp 2 (v/v)%-os fluoreszcein-oldatot cseppenttem, amelyet

néhány másodperc eltelte után 20 ml fiziológiás sóoldat segítségével lemostam. A fluoreszceinnel kezelt szemet réslámpával vizsgáltam annak ellenőrzésére, hogy a szaruhártya felszíne nem sérült-e a csirkefejek gyűjtése, illetve szállítása során. Abban az esetben, ha a szaruhártya felszínén nem találtam sérülést (fluoreszcein-megtartás  $\leq 0,5$ ), akkor elvégeztem a szem eltávolítását a szemüregből (12. ábra).



12. ábra: A szem eltávolítása a szemüregből (saját kép)

A szemek eltávolítása során a pislogóhártyát kifelé húzva egy sebészi ollóval elvágtam a szemizmokat a szaruhártya megsértése nélkül. A kiemelt szemgolyót megtisztítottam a felesleges szövetektől, a látóidegből egy jól látható darabot meghagytam.

Vizsgálati anyagoként hét darab szemre volt szükség: három szemet használtam minden tesztanyag esetében, hármat pozitív kontrollként és egyet negatív kontrollként.

Az előkészített szemet szuperfúziós készülék rozsdamentes acélbilincskébe helyeztem úgy, hogy a szaruhártya függőlegesen helyezkedjen el, és a felszíne folyamatosan nedvesítve legyen a csepegő fiziológiás sóoldattal (13. ábra).



13. ábra: Szuperfúziós készülékben fiziológias sóoldat alatt (saját kép)

A kamrába helyezést követően ismét elvégeztem a szemek fluoreszcein-megtartásának vizsgálatát annak megállapítása érdekében, hogy történt-e sérülés a szaruhártya felszínén a szövetek eltávolítása és az acélbilincsbe helyezés során. Ezt követően vizsgáltam meg a szemek szaruhártya homályának mértékét.

Abban az esetben, ha a szaruhártya felszíne sértetlen volt (fluoreszcein-megtartás  $\leq 0,5$ , valamint a szaruhártyahomály mértéke  $\leq 0,5$ ), akkor a következő lépésként megmértem a vizsgálatba vont szemek szaruhártya vastagságát. A vastagságkülönbség egy adott szem esetében nem lehet nagyobb az átlagérték 10%-ánál. Ezen feltételek teljesülése esetén kezdtem meg a szemek akklimatizációját a szuperfúziós készülékben, ami 45-60 percet vett igénybe. A kamrák hőmérsékletét  $32 \pm 1,5$  °C között tartottam mind az akklimatizációs idő, mind pedig a kezelés utáni megfigyelés során.

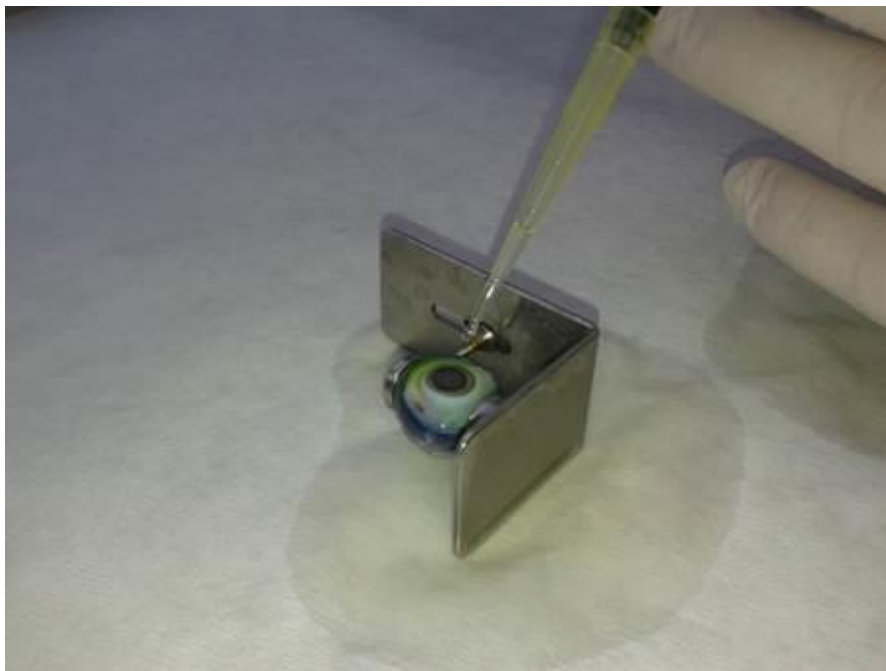
#### 4.2.2.2 A csirkeszemek kezelése

Az akklimatizációs idő letelte után megmértem a vizsgálatba bevont szemek szaruhártya vastagságát és meghatároztam a szaruhártyahomály mértékét, továbbá a fluoreszcein-megtartó képességet. Ezen referencia értékeket ( $t=0$ ) vettem alapul a kezeléseket utáni mérések eredményeinek összehasonlításához.

Amennyiben a szaruhártya vastagságának változása nagyobb volt  $\pm 5-7\%$ -nál az akklimatizációs idő letelte után, vagy nagymértékű homály volt mérhető, illetve a megengedett

tartománynál nagyobb mértékű volt a fluoreszcein-megtartó képesség értéke, akkor az érintett szemet kicseréltem.

A referenciamérések után ( $t=0$ ) az első szemet kivettem a kamrájából, és a vizsgálati anyagot mikropipettával a szemre juttattam (14. ábra) úgy, hogy a szaruhártya egész felszínét befedje. Szemenként 30  $\mu$ l tesztanyagot használtam fel. A kezelések során a növényvédő szereket kereskedelmi töménységben, hígítás nélkül alkalmaztam. Az expozíciós idő minden esetben 10 másodperc volt, amelynek lejárta után a tesztanyagot szobahőmérsékletű 20 ml fiziológiás sóoldat segítségével lemostam a szaruhártya felszínéről (kb. 20 ml/szem). Ezután a szemet visszahelyeztem a szuperfúziós készülékbe.



14. ábra: Vizsgálati anyag szemre juttatása (saját kép)

A negatív- (fiziológiás sóoldat) és pozitív (30 (w/v)% triklórecetsav) kontrollszemek kezelése esetében is ugyanígy jártam el.

A kezelés utáni mosástól számított 30., 75., 120., 180. és 240. percben megvizsgáltam a szaruhártyahomály mértékét, illetve megmértem a szaruhártya vastagságát. A mérési idők között  $\pm 5$  perc eltérés a megengedett. A fluoreszcein-megtartó képességet a kezelés előtt közvetlenül ( $t=0$ ), továbbá a kezelés utáni mosást követő 30. percben állapítottam meg.

### 4.2.2.3 A csirkeszemek elváltozásainak értékelése

A szaruhártya-vastagságot megmértem (15. ábra) a kezelés előtt ( $t=0$ ), valamint meghatároztam a kezelés utáni mosást követő 30., 75., 120., 180. és 240. percekben. A mért értékek alapján az alábbi képletből állapítottam meg a szaruhártya-duzzadást, amelyet százalékban fejeztem ki:

$$\frac{\text{szaruhártya - vastagság az adott időpontban (30., 75. perc, stb.)} - \text{szaruhártya - vastagság referencia értéke (t = 0)}}{\text{szaruhártya - vastagság referencia értéke (t = 0)}} \times 100$$

$$\text{Átlag SZD (30., 75. perc, stb.)} = \frac{\text{ESZD(30., 75. perc, stb.)} + \text{MSZD(30., 75. perc, stb.)} + \text{HSZD(30., 75. perc, stb.)}}{3}$$

Átlag SZD (30., 75. perc, stb.)= a szaruhártya-duzzadás középértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t = 30., 75.$  perc, stb.) időpontban

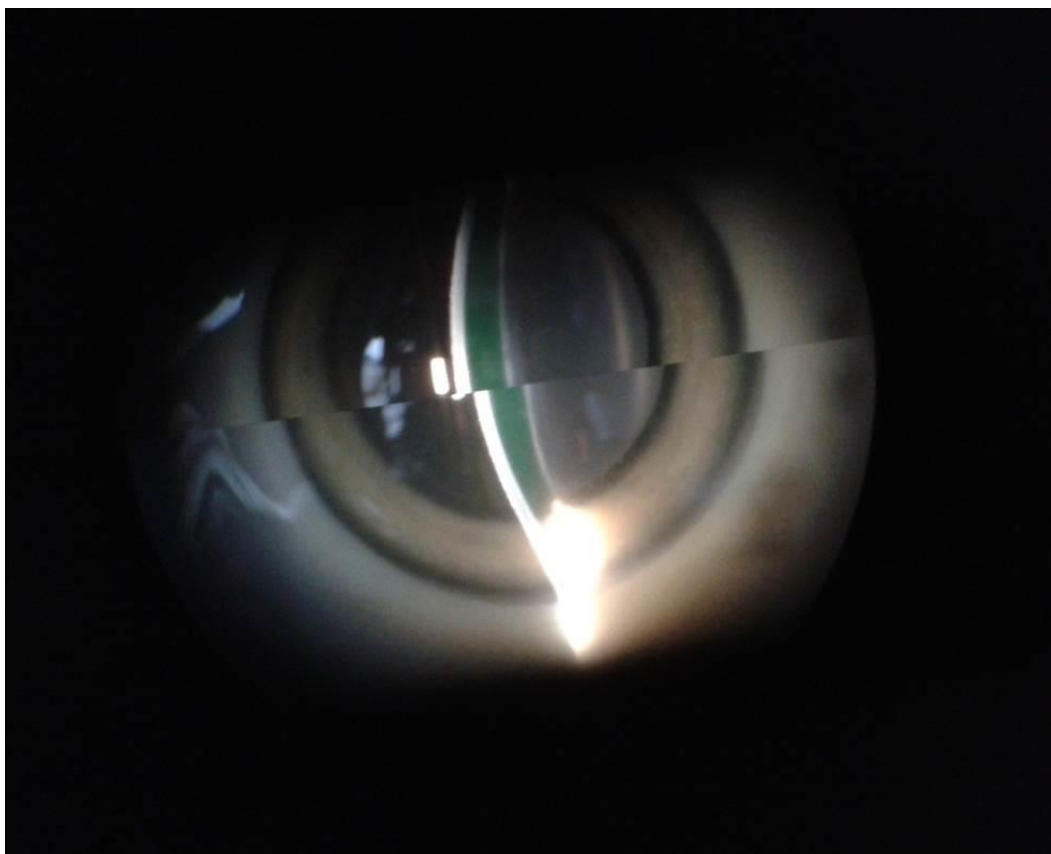
ESZD = első szem szaruhártya duzzadása

MSZD = második szem szaruhártya duzzadása

HSZD = harmadik szem szaruhártya duzzadása

(30., 75. perc, stb.) a szaruhártya-duzzadás mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t = 30., 75.$  perc, stb.) időpontban.

A százalékos értékeket a 3. táblázatban látható kategóriákba soroltam, ez alapján kaptam meg a kívánt végpontot.



15. ábra: Szaruhártya-vastagság mérése (saját kép)

3. táblázat: A szaruhártya-vastagság kategóriái

Szaruhártya-vastagság változásának mértéke %- ban kifejezve	Kategória
0-5	I (nincs torzulás)
>5-12	II (enyhe, kismértékű torzulás)
>12-18 (több, mint 75 perccel a kezelés után)	II (enyhe, kismértékű torzulás)
>12-18 (kevesebb, mint 75 perccel a kezelés után)	III (jól definiálható a torzulás mértéke)
>18-26	III (jól definiálható a torzulás mértéke)
>26-32 (több, mint 75 perccel a kezelés után)	III (jól definiálható a torzulás mértéke)

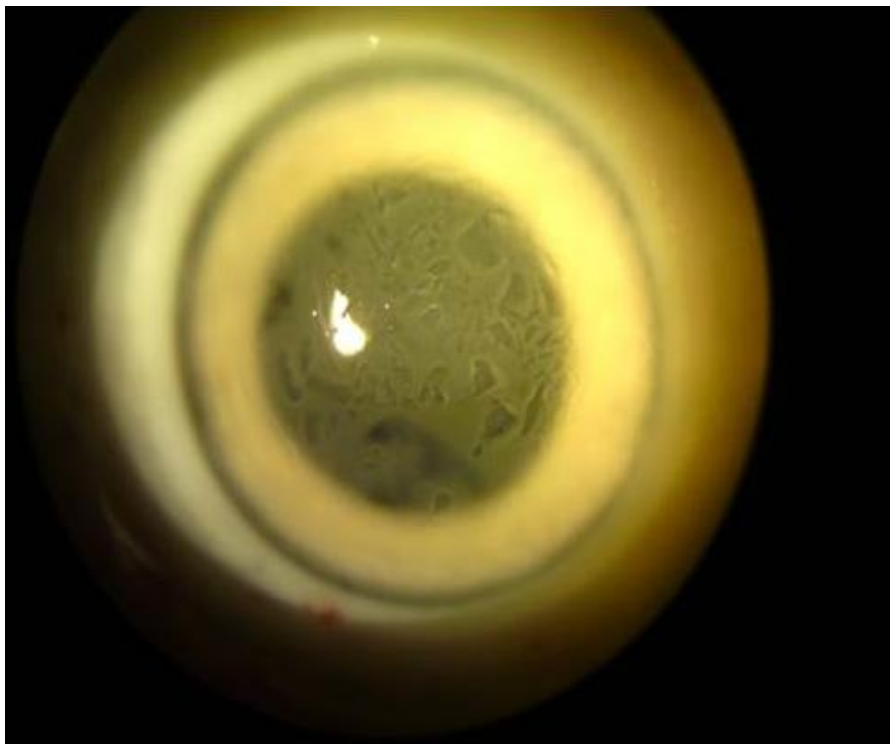


>26-32 (kevesebb, mint 75 perccel a kezelés után)	IV (súlyos mértékű torzulás)
>32	IV (súlyos mértékű torzulás)

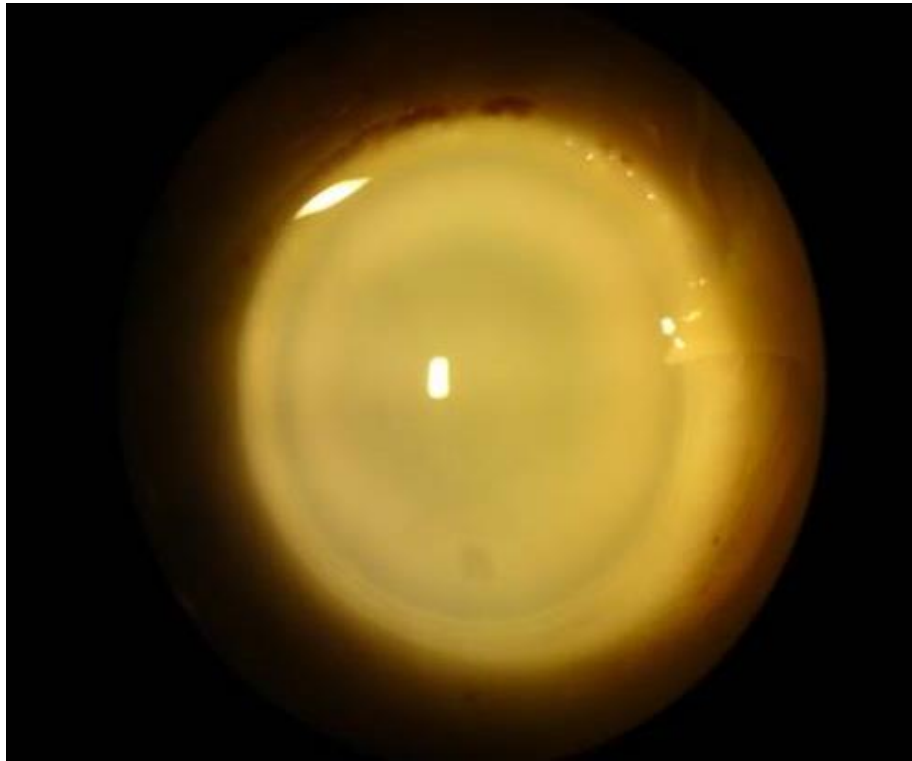
A szaruhártyahomály mértékét meghatároztam közvetlenül az akklimatizációs idő letelte után, de még a kezelés megkezdése előtt ( $t=0$ ). Valamint ezen kívül meghatároztam a kezelés utáni mosást követő 30., 75., 120., 180. és 240. percben is.

A szaruhártyahomály mértékét az alábbi pontrendszer alapján értékeltem:

- Nincs homály 0
- Nagyon halvány homály 0,5
- Szórt vagy zavaros területek; az írisz részletei tisztán kivehetőek 1
- Könnyen észrevehető áttetsző terület; az írisz részletei kissé elmosódottak 2
- Súlyos szaruhártya-homály; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki,  
a pupilla mérete alig érzékelhető (16. ábra) 3
- A szaruhártya teljes homály; az írisz nem látható (17. ábra) 4



16. ábra: Súlyos szaruhártyahomály; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki, a pupilla mérete alig érzékelhető (saját kép)



17. ábra: A szaruhártya teljes homálya; az írisz nem látható (saját kép)

Az adott időpontokban tapasztalt szaruhártyahomály értékekből meghatároztam a homály tényleges mértékét:

$$\Delta\text{SZH a } t \text{ időpontban} = \text{SZH a } t \text{ időpontban} - \text{SZH referencia értéke}$$

$$\text{Átlag SZH} = \frac{\text{ESZ}\Delta\text{SZH}(30., 75., \text{perc, stb.}) + \text{MSZ}\Delta\text{SZH}(30., 75., \text{perc, stb.}) + \text{HSZ}\Delta\text{SZH}(30., 75., \text{perc, stb.})}{3}$$

$\Delta\text{SZH a } t \text{ időpontban}$  = a szaruhártyahomály mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t = 30., 75.$  perc, stb.) időpontban a referencia értékkel korrigálva ( $t=0$ )

$\text{SZH a } t \text{ időpontban}$  = a szaruhártyahomály mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t = 30., 75.,$  perc, stb.) időpontban

$\text{SZH referencia értéke}$  = az adott szem szaruhártya homályához tartozó referencia érték ( $t=0$ )

$\text{Átlag SZH}$  = a szaruhártyahomály középértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t = 30., 75.,$  perc, stb.) időpontban.

$\text{ESZ}\Delta\text{SZH}$  = első szem szaruhártyahomálya a referencia értékkel korrigálva

$\text{MSZ}\Delta\text{SZH}$  = második szem szaruhártyahomálya a referencia értékkel korrigálva

HSZ $\Delta$ SZH = harmadik szem szaruhártyahomálya a referencia értékkel korrigálva  
(30., 75., perc, stb.) a szaruhártyahomály mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$   
( $t = 30., 75., \dots, \text{stb.}$ ) időpontban

A szaruhártyahomály esetén a legnagyobb számértéket figyelembe véve állapítottam meg a végpontot (4. táblázat).

4. táblázat: A szaruhártyahomály besorolási kategóriái

Szaruhártyahomály mértéke	Kategória
0,0-0,5	I (nincs homály)
0,6-1,5	II (enyhe, kismértékű homály)
1,6-2,5	III (jól definiálható homály)
2,6-4,0	IV (teljes homály)

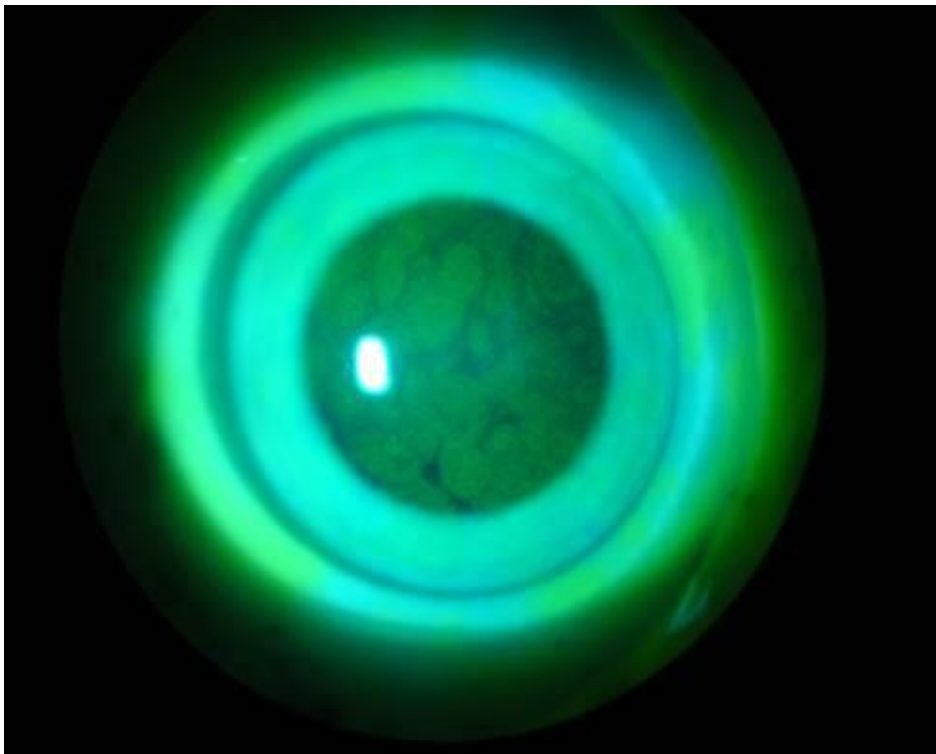
A fluoreszcein-megtartó képességet (18. ábra) meghatároztam az akklimatizáció végeztével, amelyet referencia értéként használtam ( $t=0$ ), illetve a meghatározást elvégeztem a kezelés utáni mosástól számított 30. percben.



18. ábra: Fluoreszcein-oldat lemosása fiziológiás sóoldattal (saját kép)

A fluoreszcein-megtartás mértékét az alábbi pontrendszer alapján értékeltem:

- Nincs fluoreszcein-megtartás 0
- Igen csekély mértékű, egysejtes foltosodás 0,5
- Egysejtes foltosodás elszórtan a szaruhártya kezelt felületén 1
- Fokális vagy egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás 2
- A szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint (19. ábra) 3



19. ábra: A szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint (saját kép)

A fluoreszcein-megtartó képesség meghatározása a meghatározott időpontokban rögzített értékekből a következő összefüggéssel lehetséges:

$\Delta FM$  a  $t$  időpontban = FM a  $t$  időpontban – FM referencia értéke

$$\text{Átlag FM} = \frac{\text{ESZ}\Delta\text{FM}(30.\text{perc}) + \text{MSZ}\Delta\text{FM}(30.\text{perc}) + \text{HSZ}\Delta\text{FM}(30.\text{perc})}{3}$$

$\Delta FM$  a  $t$  időpontban = a fluoreszcein-megtartás mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t= 30.$  perc) időpontban a referencia értékkel korrigálva ( $t=0$ )

FM a  $t$  időpontban = a fluoreszcein-megtartás mértéke a kezelés utáni mosást követő adott  $t$  ( $t= 30.$  perc) időpontban

FM referencia értéke = az adott szaruhártya fluoreszcein-megtartásához tartozó referencia érték

Átlag FM = a fluoreszcein-megtartás középértéke

ESZ $\Delta$ FM = az első szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva

MSZ $\Delta$ FM = a második szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva

HSZ $\Delta$ FM = a harmadik szem fluoreszcein megtartása a referencia értékkel korrigálva

Az egyenletből kapott számérték segítségével kategorizálhatjuk a fluoreszcein-megtartást (5. táblázat) és kapjuk meg a végpontot.

5. táblázat: A fluoreszcein-megtartás kategóriái

Fluoreszcein-megtartó képesség mértéke	Kategória
0,0-0,5	I (nincs fluoreszcein-megtartás)
0,6-1,5	II (enyhe, kismértékű fluoreszcein-megtartás)
1,6-2,5	III (jól definiálható fluoreszcein-megtartás)
2,6-4,0	IV (nagyértékű fluoreszcein-megtartás)

A három mérésből származó végpontból határozható meg a vizsgálati anyag szemirritációs potenciálja. A besorolási kategóriákat a 6. táblázat mutatja be. A 2A és 2B kategória között a

különbség a teljes gyógyulás időtartamában van, azaz 21 nap alatt vagy 7 nap alatt lesznek tünetmentesek az állatok.

A nemzetközi szakmai szervezetek állásfoglalása (EC, 2008; ECHA, 2017) szerint abban az esetben, ha a vizsgált anyag súlyos szemirritációt/szemkorróziót okozó kategóriába kerül, az anyag súlyosan szemirritáló/szemkorróziót okozó osztályba sorolása történik meg, ha a vizsgált anyag nem osztályozható, az anyag nem irritáló hatásúként kerül besorolásra. Minden egyéb, a végpontok kombinációja alapján kapott eredmény esetén egy szemirritációs kategória javasolható, de a készítmény tényleges irritációs értékének megállapításához, illetve osztályba sorolásához egyéb *in vitro* vizsgálatokat vagy nyulakon végzett *in vivo* vizsgálatot szükséges elvégezni.

6. táblázat: ICE teszt összesített irritációs kategóriái

Kategória	UN-GHS kategória	A három végpont kombinációja
Nem irritáló hatású anyag	nem osztályozható	3xI 2xI, 1xII 2xI, 1xI <sup>3</sup>
Irritáló hatású anyag	2.B kategória	3xII 2xII, 1xIII 1xI, 1xII, 1xIII <sup>1</sup>
	2.A kategória	3xIII 2xIII, 1xII 2xI, 1xIV <sup>1</sup> 2xIII, 1xIV <sup>2</sup> 2xIII, 1xI, 2xII, 1xIV <sup>1</sup> 1xII, 1xIII, 1xIV <sup>1</sup>
Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag	1. kategória	3xIV 2xIV, 1xIII 2xIV, 1xII <sup>1</sup> 2xIV, 1xI <sup>1</sup>  30 percnél a szaruhártya homálya legalább 3 (legalább két szem esetében). Bármely időpontban a szaruhártya homálya 4 (legalább két szem esetében). A felhám súlyos fellazulása (legalább egy szem esetében).

<sup>1</sup>: kis valószínűséggel előforduló kombináció

<sup>2</sup>: az irritáló és súlyosan irritáló határán lévő

<sup>3</sup>: a nem irritáló és az irritáló határán lévő

#### 4.2.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) vizsgálat

A kísérletek a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont, Gyógyszertranszport és Toxicitás Laboratóriumában kerültek elvégzésre.

Szükséges eszközök:

- Spektrofotométer (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader)
- Laboratóriumi centrifuga
- Pipetta
- 96 lyukú lemez (96-well Greiner plate; 50000 db sejt/lyuk)
- Sebészi csipesz
- Sebészi olló
- Gézlap

Szükséges anyagok:

- EBSS-oldat (Earle's Balanced Salt Solution)
- Kelátképző
- 0,5 mM-os EGTA
- Szuszpendáló-oldat
- CaCl<sub>2</sub>-oldat
- 200 mM-os glutamin
- DMSO (dimetil-szulfoxid)
- HBSS (Hank-oldat)
- Inzulin
- Fiziológias sóoldat
- Tripánkék-oldat
- Tápoldat

A kísérlet során 150-250 g súlyú Wistar hím patkányok kerültek felhasználásra.



#### 4.2.3.1 Az állat előkészítése, műtétje

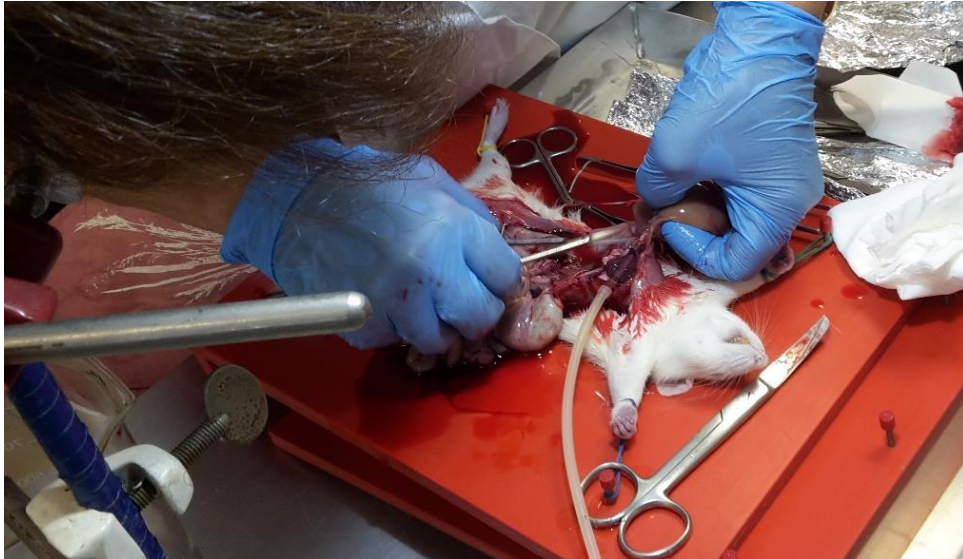
A májsejtek kinyeréséhez szükséges műtét előtt az állat dietil-éterrel került altatásra. Mivel célunk életképes májsejtek izolálása volt, az altatás során nem voltak használhatóak hatékonyabb, ám májkárosító altatószerek, mint pl. halotán, kloroform. Valamint nem kerülhettek felhasználásra indukciós hatású szerek sem (barbiturátok). Az altatás az állat légterébe juttatott étergőzőkkel történt.

A has és a mellkas tájékról a bőr téglalap formájában levágásra került (20. ábra).



20. ábra: A bőr levágása a mellkas szabaddá tételéhez (saját kép)

Az os pubis-tól kb. 2 cm-re bemetszettem a peritoneumot és a línea alba mentén a thoraxig felvágtam vigyázva, hogy a peritoneumra felfekvő májlebenybe ne vágjak bele. Középtájon a diaphragmától kb. 1 cm-re mindkét oldal irányában elvágtam a peritoneumot és a műtőasztalhoz rögzítettem. Két érbe (a véna (v.) cava superior-ba és a véna portae hepatis-ba) a következő módon vezettem kanült: a peritoneum megnyitása után a v. portae-t és a v. cava inferior-t kipreparáltam és fonalat helyeztem a vénák köré. Először a v. cava inferior-ra helyeztem lazán egy fonalat a veseleágazás felett. A második fonal a v. portae-ra került a májba történő beszájadzás és a portális érről leágazó pankreatikus-duodenális ér közé. A laza fonalak felhelyezése után a fonal alatt kb. 45 fokos szögben bevágtam a v. portae-t, és behelyeztem a kanült (21. ábra), amelyhez előzőleg a perisztaltikus pumpa nyomó ágát csatlakoztattam.



21. ábra: A kanül behelyezése (saját kép)

A fonal megkötésével rögzítettem a kanült az érben. A nyomó ág bekötésével a keringési rendszerben a folyadékmennyiség növekedése nyomásfokozódást okozott, ezért átvágtam a v. cava inferior-t a ráhelyezett fonal alatt, hogy a nyomás csökkenjen. A rekeszizom bevágásával légmell alakult ki, ennek következtében az állat megfulladt. A mellkas feltárásával hozzáfértem a szívhez és a v. cava superior-hoz. Fonalat helyeztem fel a jobb pitvartól kb. egy cm-re a v. cava superior-ra. A szívet csipesz segítségével óvatosan kiemelttem, majd ollóval bemetszettem a jobb pitvar felől, és a kanült felcsúsztattam a fonallig, majd rögzítettem. Ezután a v. cava inferior-on lévő fonallal az eret elkötöttem, ezzel zárt rendszert hoztam létre, megakadályozva a perfúziós folyadék további elszivárgását.

A májperfúzióhoz két oldatot használtam, amelyeket termosztátban 41 °C-on tartottam, így mire az oldatok eljutottak a májhoz, a vékony csövekben áramolva éppen 37 °C-osra hűltek le. A perfúziós oldatokba karbogén gázt (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) vezettem, így beállítva az optimális oxigén koncentrációt és pH-t. A perisztaltikus pumpa szívó ága az első oldatba merült, nyomó ága pedig egy buborékfogóban végződött, ahonnan műanyag csövön keresztül jutott a folyadék a kanülbe. Az oldatot a perfúzió megkezdéséig az első tárolóedénybe juttattam vissza. A perfúziós folyadék áramlási sebessége a második kanül bekötéséig 10 ml/perc volt, a v. cava inferior elkötése után ezt 40 ml/percre növeltem. A perfúzió célja a hepatociták közötti sejtkapcsoló struktúrák megszüntetése, így juthattam májsejt szuszpenzióhoz. Az első fázis a máj kelátképzővel történő átmosása volt. Az EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) oldatból, amely 0,5 mM EGTA-t (Ethylene glycol tetraacetic acid) tartalmazott, 300 ml-t folyattam át a májon. Az EGTA komplexbe viszi a kalcium ionokat, így a kalcium-függő sejtkapcsoló

struktúrák megszűnnek. A második fázis a kelátképző kimosása volt. 350 ml EBSS oldatból kb. 220 ml mosta át a májat. A harmadik fázisban a maradék 130 ml-t visszaforgattam a tárolóedénybe. A recirkuláló rendszerhez 1,3 ml 0,25 M-os  $\text{CaCl}_2$ -oldatot és 25 mg EBSS oldatban oldott kollagenáz enzimet adtam. 5 percig tartottam fenn az áramlást, ez alatt a kollagenáz feloldotta a sejtek közötti mátrixot, így a sejtek elváltak egymástól. A májat kívülről borító tok kevésbé emésztődik, a képlékeny máj így viszonylag könnyen kiemelhető.

#### **4.2.3.2 A májsejtek kinyerése, tisztítása, sejt kultúra készítése**

A májat ollóval apró darabokra vágtam, majd a májat borító tokot szuszpendáló oldatban szétszakítottam, a sejtsuszpenziót négyrétegű steril gézen szűrtem, ezt követően 900 rpm fordulatszám mellett egy percig centrifugáltam. A felülúszót kidobtam, a pelletet reszuszendáltam. Az eljárást még kétszer ismételtam, az utolsó centrifugálás előtt kiegészítettem William's E (W. E.) médiumban szuszpendáltam a sejteket. Ezt követően tripánkék módszerrel határoztam meg a sejtek életképességét. A módszer elve az, hogy a sérült sejtek membránja áteresztővé válik, és a festékanyag bejut a citoplazmába, azt kékre színezve. A sejtszámot Neubauer kamra segítségével határoztam meg.

Ha megfelelő volt az életképes sejtek száma (90% fölött, de minimum 85% szükséges a sejt kultúra készítéséhez), a kollagénezett lemezekre ültettem a sejteket. A William's E Mediumot kiegészítettem 100 nM inzulinnal, 0,1  $\mu\text{M}$  dexametazonnal és 5% FCS-sel (fetal calf serum). A további, 24 óránként cserélt tápfolyadékot sérumentesre cseréltem (nem tartalmaz FCS-t).

#### **4.2.3.3 A kísérleti módszer**

A kísérletet 24 órás kezelési idővel végeztem. A hepatocitákat lemezre ültettem, majd a megfelelő időre termosztátba helyeztem. A sejt kultúrán végzett kezeléseket inkubációban 37 °C-on, 100%-os páratartalom mellett, 5%:95%  $\text{CO}_2$ : levegő atmoszférában végeztem.

A sejteket a lemezre ültetés után a megfelelő ideig termosztátba helyeztem, majd kivettem, és vákuumszívóval leszívtam róluk a tápoldatot vigyázva, hogy ne sértsem meg a sejtállományt. 5 koncentrációs csoportot állítottam be, melyekben a megfelelő koncentrációban növényvédő szert tartalmazó vizes oldatot (2560x, 1280x, 640x, 320, 20x) tettem, és visszahelyeztem a lemezt a termosztátba, a kívánt kezelési időre. A kezelési idő lejártá után az oldatot leszívtam,

majd Hank-oldattal mostam a sejteket, hogy ne maradjanak a kultúrában növényvédő szer maradványok. Egy újabb leszívás után a sejtekre (a kontrollsejtekre is) MTT reagens került (22. ábra) és visszakerültek a termosztátba 2 órás inkubálásra, tekintettel arra, hogy ennyi az MTT reagens minimum hatóideje.



22. ábra: A sejtek kezelése (saját kép)

Az MTT reagens alacsony abszorbens értékekkel rendelkezik a sejtek hiányában. A sejtszám és a kapott jel közötti összefüggés minden sejtípus esetén lineáris, így a változások pontosan mérhetőek. Ha az abszorbencia értékek alacsonyabbak a vizsgált sejtek esetében a kontrollsejtekhez képest, az csökkent sejt proliferációt és az életképesség csökkenését mutatja (Kováts, 2013).

A 2 óra letelte után a sejtekről ismét leszívtam az oldatot. Ezután 50  $\mu$ l DMSO (dimetil-szulfoxid) oldat került a sejtekre, mely felbontja a sejtmembránokat, valamint oldatba viszi a keletkezett lila színű formazánt. 20 perces rázatás után a formazán kellő mértékben feloldódik. Ezután spektrofotométerrel olvastam le az abszorbanciát 540 nm-es hullámhosszon.

A vizsgálati minták minden hígításával három párhuzamos mérést végeztem.

A kezelt oldat fényelnyelését a kezeletlenhez viszonyítva, az élő sejtek %-os aránya az alábbiak szerint meghatározható:

$$\frac{\text{a kezelt sejtek abszorbanciája}}{\text{a kontrollsejtek abszorbanciája}} \times 100$$

Az irritációs besorolást a 7. táblázatban bemutatott kategóriák szerint végeztem el.

7. táblázat: Az MTT vizsgálatban alkalmazott irritációs kategóriák

<b>EC<sub>50</sub> érték</b>	<b>Irritációs kategória</b>
>50 ml/l	nem irritatív
50-0,780 ml/l	irritatív
0,781 ml/l>	súlyosan irritatív

## 4.3 Alkalmazott statisztikai módszerek

A toxikológia nemzetközi irodalmában az alternatív módszerek és az *in vivo* tesztekől származó eredmények összehasonlítására általánosan elfogadottak a korrelációs vizsgálatok. A korrelációs számítás speciális esetei az ún. rangkorrelációk, amelyekben két változó értékeiből képzett rangok (sorszámok) korrelációját lehet vizsgálni.

Az *in vivo* és *in vitro* módszerekből származó eredmények összehasonlításának bemutatására a gamma és kapa mutatók alkalmasak (Guo és mtsai., 2010; Jírová és mtsai., 2014).

Munkám során az egyes módszerekkel megállapított kategóriák összehasonlítását a Kendall-féle gamma és a Cohen-féle kapa kiszámításával végeztem.

### 4.3.1 Kendall-féle gamma

A rangkorreláció két változó közötti sztochasztikus monotonitást vizsgál. Mivel mindkét változó erősen diszkrét (mindössze 3 különböző értéke lehet), a különböző rangkorrelációs együtthatók közül a Kendall-féle gammát (Goodman és Kruskal, 1954) (a szakirodalomban Goodman-Kruskal gamma néven is szerepel) választottam, amit kifejezetten ilyen esetekre fejlesztettek ki. Ennek kiszámítása az alábbi képlet segítségével történt:

$$\Gamma = \frac{p_+ - p_-}{p_+ + p_-}$$

ahol  $p_+$  a konkordáns (pozitív viszony),  $p_-$  pedig a diszkordáns (negatív viszony) párok számát jelöli. (Vargha, 2015)

A számítások az R statisztikai szoftver (R Core Team, 2017) segítségével a “MESS” nevű csomag (Ekstrom, 2017) `gkgamma()` függvényével kerültek elvégzésre.

### 4.3.2 Cohen-féle kappa

A Cohen-féle kappa mérőszámot olyan osztályozó eljárások összehasonlítására dolgozták ki, amelyek ordinális szintű eredményt adnak (Cohen, 1968). Ha a két módszer eltérő kategóriába sorolja a vizsgálati anyagot, ez figyelembe veszi, hogy az eltérés egy vagy két kategória. Négyzetes súlyozást alkalmaztam, ami azt jelenti, hogy ha az egyik módszer által megállapított kategória eggyel tér el a másik módszer által megállapított kategóriától, akkor a súly értéke 1, ha kettővel, akkor 4. A Cohen-féle kappa kiszámítása az alábbi képlettel történt:

$$\kappa = 1 - \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k w_{ij} x_{ij}}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k w_{ij} m_{ij}}$$

ahol  $k$  a kategóriák száma (esetünkben három, mivel három kategória van: nem irritatív, irritatív, súlyosan irritatív);  $w_{ij}$  az eltérésekhez tartozó súlyok értéke (négyzetes súlyozást használtunk);  $x_{ij}$  a megfigyelt esetek száma (hány olyan anyag volt, amit az egyik módszer az  $i$ -dik kategóriába, a másik módszer pedig a  $j$ -dik kategóriába sorolt);  $m_{ij}$  a megfigyeléssel azonos peremeloszlás mellett történő véletlen osztályozás várható értéke (ha mindkét módszer teljesen véletlenül sorolná az anyagokat valamelyik kategóriába, akkor átlagosan ennyiszor fordulna elő, hogy az első módszer az  $i$ -dik, a második módszer pedig a  $j$ -dik kategóriába sorolja).

A számítások az "irr" nevű R csomag (Gamer és mtsai., 2012) kappa2() függvényével kerültek elvégzésre.

## 4.4 Eredmények

### 4.4.1 A HET-CAM tesztből származó eredmények

A vizsgált növényvédő szereknél kapott irritációs indexeket és irritációs kategóriákat a 8. táblázat összesíti. Az irritációs indexek alapját képező részindexeket adott vizsgálati anyag esetén a Mellékletek fejezet 19-41. táblázatai tartalmazzák.

8. táblázat: A HET-CAM tesztből származó irritációs indexek és kategóriák

Vizsgált anyag	Irritációs index	Irritációs kategória
<b>BUMPER 25 EC</b>	8,16	irritatív
<b>COMMAND 48 EC</b>	6,54	irritatív
<b>CYPERKILL 25 EC</b>	6,69	irritatív
<b>DOMARK 10 EC</b>	9,62	súlyosan irritatív
<b>DUAL GOLD 960 EC</b>	0	nem irritatív
<b>GLIALKA STAR</b>	6,67	irritatív
<b>GLYPHOGAN 480 SL</b>	6,55	irritatív
<b>K-OBIOL 25 EC</b>	10,75	súlyosan irritatív
<b>LEOPARD 5 EC</b>	2,34	irritatív
<b>MECOMORN 750 SL</b>	10,59	súlyosan irritatív
<b>MIRAGE 45 EC</b>	4,89	irritatív
<b>MYSTIC 250 EC</b>	8,3	irritatív
<b>NIMROD 25 EC</b>	6,76	irritatív
<b>ORIOUS 20 EW</b>	10,79	súlyosan irritatív
<b>PROPLANT</b>	8,66	irritatív
<b>PULSAR 40 SL</b>	4,91	irritatív
<b>RACER</b>	8,37	irritatív
<b>RELDAN 22 EC</b>	8,85	irritatív
<b>SCORE 250 EC</b>	6,19	irritatív
<b>SEKATOR</b>	9,56	súlyosan irritatív
<b>SYSTHANE DUPLO</b>	10,76	súlyosan irritatív
<b>TANDUS 200 EC</b>	0	nem irritatív
<b>TOPAS 100 EC</b>	10,76	súlyosan irritatív



<b>VERTIMEC 1,8 EC</b>	6,45	irritatív
<b>WARRANT 200 SL</b>	10,89	súlyosan irritatív

A BUMPER 25 EC-vel kezelt tojásokon az 50. másodperctől lízist, majd ezt követően a 80. és 130. másodperc között kezdődően vérzést figyeltem meg a chorioallantois membránon. A kapott eredmények alapján a gombaölő szer irritatívnak minősül (A 19. táblázat).

A COMMAND 48 EC-vel végzett kezelés során a 14. másodperctől lízist jegyeztem fel, amelyet vérzés nem követett. A gyomirtó szer az irritatív kategóriába sorolható (20. táblázat).

A CYPERKILL 25 EC-vel elvégzett kezelést követően lízis jelentkezett a megfigyelési idő 6-22. másodperce között. A rovarölő szer ez által az irritatív kategóriába sorolható (21. táblázat).

A DOMARK 10 EC-vel kezelt tojásokon a 20-46. másodperc között lízis alakult ki, a 90-110. másodpercben vérzések jelentkeztek. A gombaölő szer a kapott értékek alapján az súlyosan irritatív kategóriába sorolható (22. táblázat).

A DUAL GOLD 960 növényvédő szerrel történt kezelés során nem volt a megfigyelési idő alatt jelentkező elváltozás a chorioallantois membránon. A gyomirtó szer nem irritáló tulajdonságú.

A GLIALKA STAR-ral kezelt tojásokon érlízis volt megfigyelhető a kezelést követő 9-35. másodpercben. A gyomirtó szer az irritatív kategóriába sorolható (23. táblázat).

A GLYPHOGAN 480 SL tekintetében szintén csak lízist figyelhettem meg a membránon a kezelést követő 15-25. másodpercben. A gyomirtó szer ezen adatok alapján irritatívnak minősül (24. táblázat).

A K-OBIOL 25 EC-vel végzett kezelés utáni 7-28. másodpercek között líziseket jegyeztem fel, amelyeket a 35-120. másodpercben vérzés követett. A rovarölő szer ezen értékek alapján az súlyosan irritatív kategóriába sorolható (25. táblázat).

A LEOPARD 5 EC-vel végzett kezelés hatására lízis volt megfigyelhető a 140-250. másodpercben a chorioallantois membrán felületén. A gyomirtó szer irritatívnak minősül (26. táblázat).

A MECOMORN 750 SL-lel történt kezelés utáni 2-7. másodpercben erős lízis volt megfigyelhető, amelyet a 30. másodperctől vérzések követtek. A gyomirtó szer az súlyosan irritatív kategóriába sorolható (27. táblázat).

A MIRAGE 45 EC-vel kezelt tojások chorioallantois membránján a megfigyelési idő 82-97. másodperce között érlízis alakult ki. A gombaölő szer az irritatív kategóriába sorolható (28. táblázat).

A MYSTIC 250 EC-vel végzett kezelés során a 13. másodperctől lízis alakult ki a membránon, amelyet a 75. másodperctől vérzések követtek. A gombaölő szer a kapott értékek alapján irritatívnak minősül (29. táblázat).

A NIMROD 25 EC esetében a kezelést követő 3-15. másodpercben lízist figyeltem meg. A gombaölő szer irritatívnak bizonyult (30. táblázat).

Az ORIUS 20 EW-vel történt kezelés során a megfigyelési idő 20. másodpercétől érlízist jegyeztem fel, amelyet a 27. másodperctől kezdődően vérzés követett. Az értékek alapján a gombaölő szer súlyosan irritatív kategóriába sorolható (31. táblázat).

A PROPLANT szerrel történt kezelés során a 15-35. másodperc között lízis jelentkezett a membrán felületén, majd a 130. másodperctől vérzés volt megfigyelhető. A gombaölő szer az irritatív kategóriába sorolható (32. táblázat).

A PULSAR 40 SL-lel kezelt tojások chorioallantois membránján a kezelést követő 64-103. másodperc közötti időben jelentkezett lízis. A gyomirtó szer az irritatív kategóriába sorolható (33. táblázat).

A RACER-rel végzett kezelés utáni 20-37. másodpercben jelentkező lízist jegyeztem fel, majd a 27. másodperctől vérzéseket. A gyomirtó szer a kapott értékek alapján irritatív kategóriába sorolható (34. táblázat).

A RELDAN 22 EC-vel elvégzett kezelést követően a 30. másodperctől lízist, a 95. másodperctől vérzéseket figyeltem meg a chorioallantois membrán felületén. A rovarölő szer ezen értékek alapján irritatívnak minősül (35. táblázat).

A SCORE 250 EC-vel történt kezelés során a megfigyelési idő 25-45. másodperce között líziseket figyeltem meg a membrán felületén. A gombaölő szer irritatívnak minősül (36. táblázat).

A SEKATOR esetében a kezelést követő 20-46. másodpercben lízist jegyeztem fel, majd a megfigyelési idő 53. másodpercétől vérzést figyeltem meg. A gyomirtó szer súlyosan irritatívnak minősül (37. táblázat).

A SYSTHANE DUPLO szerrel kezelt tojások esetében a 10. másodpercben lízis jelentkezett, amelyet a 40. másodperctől vérzés követett. A gombaölő szer súlyosan irritatív kategóriába sorolható (38. táblázat).

A TANDUS 200 EC-vel kezelt tojások chorioallantois membránján nem volt megfigyelhető elváltozás. A gyomirtó szer nem minősül irritatív tulajdonságúnak.

A TOPAS 100 EC-vel végzett kezelés során a 4-18. másodperc között lízis jelentkezett, majd a 25. másodperctől vérzés volt megfigyelhető. A gombaölő szer súlyosan irritatív kategóriába sorolható (39. táblázat).

A VERTIMEC 1,8 EC esetében érlízis volt megfigyelhető a kezelést követő 10. másodperctől. A rovarölő szer az irritatív kategóriába sorolható (40. táblázat).

A WARRANT 200 SL-lel kezelt tojások membránján az 5. másodperctől jelentkeztek lízisek, melyeket a 32. másodperctől vérzések követtek. A rovarölő szer súlyosan irritatív kategóriába sorolható (41. táblázat).

#### 4.4.2 Az ICE tesztből származó eredmények

A vizsgálatok során alkalmazott pozitív (triklórecetsav 30 (w/v)%) és negatív (fiziológiás sóoldat) kontroll anyagok az alkalmazott végpontok (szaruhártya vastagság és homály, fluoreszcein-megtartás) értékelése alapján minden esetben a tőlük várt kategóriába esnek: a negatív kontroll nem irritáló, a pozitív kontroll szemkorroziót/súlyos szemirritációt okozó. Így az elvégzett vizsgálatok érvényesnek tekinthetők.

Az egyes vizsgálati anyagokhoz tartozó végpontok kombinációit és a készítmények besorolását a 9. táblázatban összesítettem.

9. táblázat: A vizsgálati anyagok ICE tesztből származó végpont-kombinációi, és besorolásuk

Vizsgált anyag	Végpont-kombinációk	Besorolás
<b>BUMPER 25 EC</b>	3xII	irritatív
<b>COMMAND 48 EC</b>	1xII, 1xIII, 1xIV	irritatív
<b>CYPERKILL 25 EC</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>DOMARK 10 EC</b>	2xI, 1xII	nem irritatív
<b>DUAL GOLD 960 EC</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>GLIALKA STAR</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>GLYPHOGAN 480 SL</b>	1xII, 2xIV	súlyosan irritatív
<b>K-OBIOL 25 EC</b>	1xII, 1xIII, 1xIV	irritatív
<b>LEOPARD 5 EC</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>MECOMORN 750 SL</b>	3xIV	súlyosan irritatív
<b>MIRAGE 45 EC</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>MYSTIC 250 EC</b>	2xII, 1xIV	irritatív
<b>NIMROD 25 EC</b>	1xI, 1xII, 1xIII	irritatív
<b>ORIUS 20 EW</b>	1xII, 1xIII, 1xIV	irritatív
<b>PROPLANT</b>	1xI, 2xII	nem irritatív
<b>PULSAR 40 SL</b>	3xI	nem irritatív
<b>RACER</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>RELDAN 22 EC</b>	1xI, 2xII	nem irritatív
<b>SCORE 250 EC</b>	3xI	nem irritatív

<b>SEKATOR</b>	1xII, 2xIV	súlyosan irritatív
<b>SYSTHANE DUPLO</b>	2xII, 1xIV	irritatív
<b>TANDUS 200 EC</b>	2xII, 1xIII	irritatív
<b>TOPAS 100 EC</b>	1xI, 1xII, 1xIV	irritatív
<b>VERTIMEC 1,8 EC</b>	1xII, 1xIII, 1xIV	irritatív
<b>WARRANT 200 SL</b>	1xI, 1xII, 1xIII	irritatív

A BUMPER 25 EC gombaölő szerrel végzett kezelés során szaruhártya-duzzadás egyik szem esetében sem volt mérhető a kezelést követő 75. percig, majd a megfigyelés 240. percére jelentősebb (8%) növekedést mutatott. Kismértékű szaruhártyahomály volt megfigyelhető a vizsgálat periódusának első felében, amely enyhe emelkedést mutatott a vizsgálati periódus második felében. A kezelést követő mosástól számított 30. percben két szem esetében csekély mértékű egysejtes foltosodás formájában jelentkezett a fluoreszcein-megtartás, míg egy szem esetében elszórtan jelentkezett a szaruhártya felületén (42. táblázat).

A BUMPER 25 EC gombaölő növényvédő szer az adatok értékelése alapján szemirritáló hatású.

A COMMAND 48 EC gyomirtó szerrel kezelt szemek esetén a szaruhártya-vastagság kismértékű növekedése volt jellemző mindhárom szem esetében a 75. percig elvégzett megfigyelések során, amely a megfigyelési idő 240. percére elérte a 9%-ot. Halvány szaruhártyahomály volt megfigyelhető a 75. percben, amely fokozatosan erősödött, az írisz részletei elmosódottakká váltak. Nagymértékű fluoreszcein-megtartás volt jellemző mindhárom szem esetében (43. táblázat).

A COMMAND 48 EC gyomirtó szer a kapott eredmények alapján szemirritáló hatású.

A CYPERKILL 25 EC rovarölő szerrel végzett vizsgálatok során megállapítható, hogy már a megfigyelési idő első periódusában jelentős mértékű szaruhártya-vastagodás volt megfigyelhető, amely a megfigyelési idő második felére még magasabb, 10%-os értéket ért el. Szaruhártyahomály csak kis mértékben jelentkezett mindhárom szem esetében a 120. perctől, majd jól definiálható homállyá alakult. A fluoreszcein-megtartás egy szem esetében nagymértékben jelentkezett, míg a másik két szem esetében jól definiálható fluoreszcein-megtartás volt feljegyezhető (44. táblázat).

A CYPERKILL 25 EC a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású rovarölő szer.

A DOMARK 10 EC gombaölő szerrel végzett vizsgálatok során a szaruhártya-vastagság mérésének 75. percében kismértékű növekedés volt megfigyelhető, amely nem növekedett számottevően a megfigyelési időszak második felében. A szaruhártyahomály eleinte egyáltalán nem, majd a vizsgálati periódus végéig nagyon halványan jelentkezett. A fluoreszcein-megtartás két szem esetében csekély mértékű egysejtes foltosodást mutatott, míg egy szem esetében elszórt egysejtes foltosodás volt megfigyelhető a szaruhártya kezelt felületén (45. táblázat).

A DOMARK 10 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján nem irritáló tulajdonságú.

A DUAL GOLD 960 EC gyomirtó szerrel kezelt szemek esetében a szaruhártya-vastagság a kezelési idő utáni 75. percig kismértékben növekedett. Ez a duzzadás tovább erősödött a háromból két szemnél a tünetelés második felére. Könnyen észrevehető áttetsző terület és az írisz kissé elmosódott részletei voltak megállapíthatóak két szem esetén, míg egy szemnél súlyos szaruhártyahomály jelentkezett, amely során az írisz egyetlen részlete sem volt kivehető. A fluoreszcein-megtartás két szem esetében csekély mértékű, egysejtes foltosodást mutatott, míg a harmadik szem esetében egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás jelentkezett (46. táblázat).  
A DUAL GOLD 960 EC gyomirtó szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A GLIALKA STAR gyomirtó szerrel végzett kezelés során az adott tünetelési időpontokban felvett szaruhártya-vastagság értékek megfigyelése alapján elmondható, hogy kismértékű szaruhártya-duzzadás (2-3%) volt tapasztalható mindhárom szem esetében a 75. percig elvégzett klinikai megfigyelések során. Ez a duzzadás tovább súlyosbodott a háromból két szemnél. Nagyon halvány szaruhártyahomály volt megfigyelhető egy szem esetében már a kezelést követő mosás utáni 30. és 75. percben, amely később tovább súlyosbodva a szaruhártya felszínén zavaros területek megjelenését okozta, de az írisz részletei továbbra is tisztán kivehetőek voltak. Két szemnél a nagyon halvány homály az egyik esetben a 75. percben, míg a másik szemnél a 180. percben jelentkezett és tovább már egyik esetben sem súlyosbodott a megfigyelési időszak alatt. A fluoreszcein-megtartás mindhárom szem esetében egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodást mutatott (47. táblázat).

A GLIALKA STAR gyomirtó szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A GLYPHOGAN 480 SL gyomirtó szerrel kezelt szemek esetén, a vizsgálat során jelentős szaruhártya-duzzadás volt megfigyelhető már a megfigyelési időszak elején, amely további erősödést mutatott a megfigyelési időszak haladtával. A szaruhártya homálya az első adott időszakban történt megfigyelés során jól definiálható volt, mely a továbbiakban teljes homállyá alakult. A fluoreszcein-megtartás mindhárom szem esetében a legnagyobb volt, a szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint (48. táblázat).

A GLYPHOGAN 480 SL gyomirtó szer a kapott végpontok alapján súlyos szemirritációt okoz.

A K-OBIOL 25 EC rovarölő szerrel kezelt szemek esetén a megfigyelési időszak első felében jelentős szaruhártya-vastagság volt tapasztalható a kezelés után. A duzzadás 9%-os középértékűre súlyosbodott a vizsgálati periódus második felére. Könnyen észrevehető áttetsző terület és az írisz kissé elmosódott részletei voltak megállapíthatóak a megfigyelési időszak elején. Ez súlyos szaruhártyahomállyá változott, amely során az írisznek egyetlen részlete sem volt kivehető, a pupilla mérete alig érzékelhetővé vált. Fluoreszceint mindhárom szem szaruhártyájának nagy, egybefüggő területei tartottak vissza (49. táblázat).

A végpontok kombinációi alapján a K-OBIOL 25 EC rovarölő szer szemirritáló hatású.

A LEOPARD 5 EC gyomirtó szerrel kezelt szemek egyéni adatai alapján a szaruhártya-vastagság kismértékű növekedése (2%) volt tapasztalható mindhárom szem esetében a 75. percre elvégzett klinikai megfigyelések során. Ez az érték a 180. percre 6%-ra emelkedett. Halvány szaruhártyahomály volt tapasztalható egy szemnél a 30. percen és két szem esetében a 75. percen végrehajtott megfigyelés során. A további időpontokban történő megfigyelés esetén már mindhárom szemnél tapasztalható volt a nagyon halvány homály. A fluoreszcein-megtartás esetében két szem a legsúlyosabb 3-as értéket, míg egy szem az ennél kedvezőbb 2-es értéket kapta (50. táblázat).

A végpontok kombinációja alapján a LEOPARD 5 EC gyomirtó szer szemirritáló tulajdonságú.

A MECOMORN 750 SL gyomirtó szerrel kezelt szemek szaruhártyáin a szaruhártya-vastagság torzulása a megfigyelés 30. percében már 17%-ot ért el, amely fokozatos növekedést mutatott, és a 240. percre 46%-os, súlyos mértékű torzulást ért el. A szaruhártya teljes homálya volt megfigyelhető mindhárom szem esetében már a 75. perctől. A fluoreszcein-megtartás is a maximum értékeket képviselte mindhárom szem esetében, azaz a szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint (51. táblázat).

A kapott végpontok alapján a MECOMORN 750 SL gyomirtó szer súlyos szemirritációt okozó hatású.

A MIRAGE 45 EC gombaölő szerrel kezelt szemek esetén a kezelést követő mosástól számított 30. percben két szem esetében volt megfigyelhető kismértékű, 2%-os szaruhártya-duzzadás, amely a 120. perctől már 6%-osra emelkedett. A harmadik szemnél a 75. percig egyáltalán nem, majd a 120. perctől nagyon enyhe, kismértékű torzulást figyeltem meg. A szaruhártyán szórt, zavaros területek, az írisz elmosódott részletei voltak megfigyelhetőek két szem esetében a 75. perctől, mindhárom szem esetében a 120. perctől. Két szem esetében a szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint, míg egy szemnél egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás volt megállapítható (52. táblázat).

A MIRAGE 45 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A MYSTIC 250 EC gombaölő szerrel kezelt szemek esetén a kezelést követő mosástól számított 30. percben 8%-os szaruhártya-duzzadás volt megfigyelhető, amely már a 180. percre 15%-os növekedési értéket ért el. A szaruhártyahomály a középértékének a maximumát a 180. percben érte el a szaruhártyák teljes homályával. A fluoreszcein-megtartás megfigyelése során enyhe, kismértékű foltosodás volt feljegyezhető (53. táblázat).

A MYSTIC 250 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A NIMROD 25 EC gombaölő szerrel kezelt szemek esetén csekély mértékű szaruhártya-duzzadás volt észlelhető (2%). Jól definiálható szaruhártyahomály volt megfigyelhető a 120. perctől két szem esetében. Enyhe, kismértékű fluoreszcein-megtartás volt jellemző, amely során elszórtan volt megfigyelhető egysejtes foltosodás a szaruhártyák kezelt felszínén (54. táblázat).

A NIMROD 25 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján szemirritációt okozó hatású.

Az ORIUS 20 EW gombaölő szerrel történt kezelés során a meghatározott megfigyelési időpontokban felvett szaruhártya-vastagság értékek alapján elmondható, hogy kismértékű szaruhártya-duzzadás volt tapasztalható mindhárom szem esetében. Ez a duzzadás tovább súlyosbodott úgy, hogy a 240. percben történő megfigyelés során 6% volt a referencia értékéhez viszonyítva. Mindhárom szem esetében eleinte jól definiálható homály jelentkezett, amely a háromból két szem esetében teljes homállyá alakult. Jól definiálható fluoreszcein-megtartás



volt a jellemző egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodással két szem esetében, míg egy szemnél nagymértékű megtartás volt megfigyelhető (55. táblázat).

A kapott végpontok alapján az ORIUS 20 EW gombaölő szer szemirritáló hatású.

A PROPLANT gombaölő szerrel kezelt szemek esetén a szaruhártya vastagsága csekély mértékben (2%) növekedett. Mindössze az első, a 30. percben elvégzett klinikai megfigyelés során mutatott kismértékű növekedést, és ez nem változott a 240. megfigyelési percig. Nagyon halvány szaruhártyahomály volt megfigyelhető a 75. percig, amely súlyosbodott a kezelést követő mosás utáni 120. percben. Enyhe, kismértékű fluoreszcein-megtartás volt jellemző a vizsgált három szem esetében, amely során elszórtan jelentkezett egysejtes foltosodás a szaruhártyák kezelt felszínén (56. táblázat).

A PROPLANT gombaölő szer a kapott végpontok alapján nem irritáló hatású.

A PULSAR 40 SL gyomirtó szerrel kezelt szemek esetén minimális szaruhártya-duzzadás volt megfigyelhető két szem esetében, míg egy szemnél semmilyen vastagság-növekedés nem volt mérhető. A szaruhártyahomály mindhárom szem esetében nagyon halványan jelentkezett a megfigyelési idő 180. percére. A fluoreszcein-megtartás nagyon csekély mértékű volt két szem esetében, egy szem esetében pedig egyáltalán nem jelentkezett (57. táblázat).

A PULSAR 40 SL gyomirtó szer a kapott végpontok alapján nem irritáló hatású.

A RACER gyomirtó szerrel végzett kezelés során kismértékű szaruhártya-duzzadás volt megállapítható mindhárom szem esetében a 75. percben elvégzett megfigyelések során. Ez a duzzadás a megfigyelési periódus végére 6%-os súlyosbodást ért el. Két szem esetében a megfigyelési idő 30. percétől szórt, zavaros terület volt megfigyelhető, az írisz részei elmosódottan látszódtak, míg a harmadik szem esetében mindez csak a 180. megfigyelési időponttól alakult ki. A vizsgált hátról két szem egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodást mutatott, tehát jól definiálható fluoreszcein-megtartással rendelkeztek, míg a harmadik szem esetében enyhe, kismértékű foltosodás volt feljegyezhető (58. táblázat).

A kapott végpontok alapján a RACER gyomirtó szer szemirritáló hatású.

A RELDAN 22 EC rovarölő szerrel végzett kezelés során elmondható, hogy a kezelt szemek szaruhártya-vastagsága csekély mértékben (2%) növekedett, csak az első, a 30. percben elvégzett klinikai megfigyelés során mutatott kismértékű növekedést (két szem esetében 2%, míg egy szem esetében 3%). Szaruhártyahomály nagyon halványan jelentkezett, amely a 180.

percben mérve erősödött. A fluoreszcein-megtartás kismértékű volt. Két szem esetében elszórt egysejtes foltosodást, míg egy szem esetén csekély mértékű egysejtes foltosodást mutatott (59. táblázat).

A RELDAN 22 EC rovarölő szer esetében kapott végpontok alapján, a szer nem minősíthető szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagnak. Az eredmények szerint a készítmény nem irritáló tulajdonságú.

A SCORE 250 EC gombaölő szerrel kezelt szemekkel végzett vizsgálatok során a szaruhártya-vastagság mérésének 75. percében kismértékű növekedés volt megfigyelhető mindhárom szem esetében, amely a megfigyelési időszak második felében minimálisan emelkedett (4%). A szaruhártyahomály mindhárom szem esetében nagyon halványan jelentkezett a 75. perctől és tartott a megfigyelési időszak végéig. A fluoreszcein-megtartás két szem esetében igen csekély mértékű egysejtes foltosodást mutatott, míg egy szem esetében egyáltalán nem jelentkezett a szaruhártyán (60. táblázat).

A SCORE 250 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján nem irritáló hatású.

A SEKATOR gyomirtó szerrel kezelt mindhárom szem esetében nagyon enyhe, kismértékű szaruhártya-duzzadás volt megállapítható a megfigyelési idő 75. percében. Ez a duzzadás a megfigyelési periódus 180. percére 14%-os súlyosbodást ért el, jól definiálható volt a torzulás a szaruhártyán. Súlyos szaruhártyahomály jelentkezett két szem esetén, a pupilla egyetlen részlete sem volt kivehető. Egy szemnél a megfigyelési idő végére alakult ki a teljes homály. Mindhárom szem vizsgálatakor nagymértékű fluoreszcein-megtartás volt tapasztalható, a szaruhártyák nagy egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint. Mindhárom szaruhártya esetében a felhám súlyos fellazulása jelentkezett (61. táblázat).

A SEKATOR gyomirtó szer a kapott végpontok kombinációi alapján a súlyos szemirritációt okozó hatású kategóriába sorolható.

A SYSTHANE DUPLO gombaölő szerrel végzett kezelés során két szem esetében nem volt jelentősen megállapítható szaruhártya-duzzadás. A harmadik szem esetén a tünetelési periódusban minimális emelkedés jelentkezett, és a 6%-os értékével enyhe, kismértékű torzulást mutatott. Egy szem esetében szórt, zavaros területek voltak megfigyelhetőek, míg a másik két vizsgált szem esetében nagyon halvány homály volt csak diagnosztizálható. Nagymértékű fluoreszcein-megtartás jelentkezett, a szaruhártya nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint (62. táblázat).

A SYSTHANE DUPLO gombaölő szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A TANDUS 200 EC gyomirtó szerrel kezelt szemek esetén a megfigyelési időszak első felében jelentős szaruhártya-vastagság volt megfigyelhető a kezelés utáni mosást követően. A duzzadás súlyosbodott, a vizsgálati periódus 180. percére 9%-os középértéket elérve. Két vizsgált szem esetében szórt, zavaros területek jelentkeztek a megfigyelési idő 75. percétől, míg a harmadik szem esetében ugyanezek tünetek a 180. megfigyelési időben mutatkoztak. Jól definiálható fluoreszcein-megtartás volt a jellemző egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodással két szem esetében, míg egy szemnél nagymértékű megtartás volt megfigyelhető (63. táblázat).

A TANDUS 200 EC gyomirtó szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A TOPAS 100 EC gombaölő szerrel történt vizsgálat során egy szem esetében a 75. percre 1%-os duzzadás érték volt megfigyelhető, egy másik szem esetében a 180. percre történt minimális (1%-os) változás, míg a harmadik szem esetében egyáltalán nem volt szaruhártya-duzzadás. Nagyon halvány szaruhártyahomály jelentkezett és maradt fent a megfigyelés idejében két vizsgált szemnél, míg a harmadik szemnél a 75. percre szórt, zavaros területek alakultak ki, de az írisz részletei még tisztán kivehetőek voltak. A fluoreszcein-megtartás mindhárom szemnél a mérhető legnagyobb értékű volt, a szaruhártyák nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint (64. táblázat).

A TOPAS 100 EC gombaölő szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A VERTIMEC 1,8 EC rovarölő szerrel kezelt mindhárom szem esetében nagyon enyhe, kismértékű szaruhártya-duzzadás volt megállapítható a megfigyelési idő 75. percében. Ez a duzzadás a megfigyelési periódus 180. percére 17%-os súlyosbodást ért el, jól definiálható torzulás jelentkezett a szaruhártyán. Jelentős szaruhártyahomály jelentkezett, az írisz kissé elmosódott részleteivel. Mindhárom szem vizsgálatakor nagymértékű fluoreszcein-megtartás volt tapasztalható, a szaruhártyák nagy, egybefüggő területei tartottak vissza fluoreszceint (65. táblázat).

A VERTIMEC 1,8 EC rovarölő szer a kapott végpontok alapján szemirritáló hatású.

A WARRANT 200 SL rovarölő szerrel kezelt mindhárom szemén nagyon enyhe, kismértékű szaruhártya-duzzadás volt megállapítható a megfigyelési idő 75. percében, amely csak minimális emelkedést mutatott a 240. percre, gyakorlatilag nem volt torzulás. Szaruhártyahomály nagyon halványan jelentkezett, egy szem esetében a 75. percre szórt,

zavaros területek jelentek meg, egy másik szem esetében mindez a megfigyelt 120. percben következett be. A fluoreszcein-megtartás mindhárom szem esetében jól definiálható volt, fokális, sűrű egysejtes foltosodással (66. táblázat).

A WARRANT 200 SL rovarölő szer a megállapított végpontok kombinációi alapján szemirritáló hatású.

#### 4.4.3 Az MTT tesztből származó eredmények

A citotoxicitási vizsgálatot 15 növényvédő szer készítménnyel tudtam elvégezni a rendelkezésre álló lehetőségek (technikai okok) alapján, melynek eredményeit a 10. táblázat mutatja be.

10. táblázat: Az MTT teszt eredményei

Vizsgált anyag	EC <sub>50</sub> érték	Besorolás
COMMAND 48 EC	3,125 - 1,56	irritatív
CYPERKILL 25 EC	3,125 - 1,56	irritatív
K-OBIOL 25 EC	~ 1,56	irritatív
LEOPARD 5 EC	3,125 - 1,56	irritatív
MIRAGE 45 EC	0,781 - 0,391	súlyosan irritatív
MYSTIC 250 EC	0,781 - 0,391	súlyosan irritatív
NIMROD 25 EC	3,125 - 1,56	irritatív
PROPLANT	50 - 3,125	irritatív
PULSAR 40 SL	> 50	nem irritatív
RACER	3,125 - 1,56	irritatív
RELDAN 22 EC	0,781 - 0,391	súlyosan irritatív
SYSTHANE DUPLO	3,125 - 1,56	irritatív
TANDUS 200 EC	50 - 3,125	irritatív
TOPAS 100 EC	3,125 - 1,56	irritatív
WARRANT 200 SL	50 - 3,125	irritatív

A COMMAND 48 EC a 20x és a 320x-os hígításában a sejtek több mint 50%-a elpusztult, míg az 1280x és 2560x-os hígítás során sejtpusztulás nem történt (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gyomirtó szer irritatív hatású.

A CYPERKILL 25 EC vizsgálati anyag esetén a 20x és a 320x-os hígítás során a sejtek több mint 50%-a elpusztult, míg a 640x, 1280x és 2560x-os hígításban sejtpusztulás nem történt (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A rovarölő szer irritatív tulajdonságú.

A K-OBIOL 25 EC a 20x és a 320x-os hígításban a sejtek több mint 50%-át elpusztította. 2560x-os hígítás esetén nem történt sejtpusztulás (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke ~ 1,562 ml/l. A rovarölő szer irritatív hatású.

A LEOPARD 5 EC a 20x és a 320x-os hígításban pusztította el a sejtek több mint 50%-át. Az 1280x és 2560x-os hígítás során nem történt sejtpusztulás (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gyomirtó szer irritatív hatású.

A MIRAGE 45 EC a 20x, 320x, 640x és 1280x-os hígításban elpusztította a sejtek több mint 50%-át (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 0,781 ml/l és 0,391 ml/l között van. A gombaölő szer súlyosan irritatív hatású.

MYSTIC 250 EC-vel történt kezelés során a 20x, 320x, 640x és 1280x-os hígításban elpusztult a sejtek több mint 50%-a (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 0,781 ml/l és 0,391 ml/l között van. A gombaölő szer súlyosan irritatív tulajdonságú.

NIMROD 25 EC a 20x, 320x és 640x-os hígításban elpusztította a sejtek több mint 50%-át. Az 1280x és 2560x-os hígításban nem történt sejtpusztulás (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gombaölő szer irritatív hatású.

A PROPLANT-tal történt kezelés során a 20x-os hígítás 50% feletti sejtpusztulást okozott, míg a 640x, 1280x és a 2560x-os hígítás nem okozott sejtpusztulást (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 50 ml/l és 3,125 ml/l között van. A gombaölő szer irritatív hatású.

PULSAR 40 SL a 20x-os hígításban csak minimális sejtpusztulást okozott, míg a többi hígításnál egyáltalán nem okozott sejtpusztulást (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke > 50 ml/l. A gyomirtó szer nem irritáló hatású.

A RACER a 20x és 320x-os hígításban elpusztította a sejtek több mint 50%-át. Az 1280x és 2560x-os hígításban nem történt sejtpusztulás (67. táblázat). EC<sub>50</sub> értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gyomirtó szer irritatív hatású.

A RELDAN 22 EC a 20x, 320x, 640x és 1280x-os hígításban a sejtek több mint 50%-át elpusztította, azonban 2560x-os hígításban nem történt sejtpusztulás (67. táblázat).  $EC_{50}$  értéke 0,781 ml/l és 0,391 ml/l között van. A rovarölő szer súlyosan irritatív tulajdonságú.

A SYSTHANE DUPLO a 20x és 320x-os hígításokban a kezelt sejtek több mint 50%-át elpusztította, míg az 1250x és 2560x-os hígításokban nem okozott sejtpusztulást (67. táblázat).  $EC_{50}$  értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gombaölő szer irritatív hatású.

A TANDUS 200 EC a 20x-os hígításban okozott 50% feletti sejtpusztulást (67. táblázat).  $EC_{50}$  értéke 50 ml/l és 3,125 ml/l között van. A gyomirtó szer irritatív hatású.

A TOPAS 100 EC a 20x és 320x-os hígítás során okozott 50% feletti sejtpusztulást, azonban a 640x, 1280x és 2560x-os hígításokban sejtpusztulás nem történt (67. táblázat).  $EC_{50}$  értéke 3,125 ml/l és 1,562 ml/l között van. A gombaölő szer irritatív hatású.

A WARRANT 200 SL a 20x-os hígításban pusztította el a sejtek több mint 50%-át, a többi hígításban nem okozott sejtpusztulást (67. táblázat).  $EC_{50}$  értéke 50 ml/l és 3,125 ml/l között van. A rovarölő szer irritatív tulajdonságú.

## 4.5 Eredmények értékelése és javaslatok

### 4.5.1 A HET-CAM tesztből származó eredmények összehasonlítása az *in vivo* adatokkal

A kísérletbe vont 25 vizsgálati anyagból 19 készítmény (76%) irritációs kategóriába sorolása megegyezett (11. táblázat) az *in vivo* adat alapján és az *in vitro* HET-CAM tesztből származó eredmények alapján. 1 vizsgálati anyag (TANDUS 200 EC) esetében mindkét teszt nem irritatív kategóriába, 13 vizsgálati anyag (BUMPER 25 EC, COMMAND 48 EC, GLIALKA STAR, GLYPHOGAN 480 SL, LEOPARD 5 EC, MIRAGE 45 EC, MYSTIC 250 EC, NIMROD 25 EC, PROPLANT, PULSAR 40 SL, RACER, RELDAN 22 EC, VERTIMEC 1,8 EC) esetében mindkét teszt irritatív kategóriába, míg 5 vizsgálati anyag (DOMARK 10 EC, K-OBIOL 25 EC, MECOMORN 750 SL, SEKATOR, TOPAS 100 EC) esetében mindkét teszt súlyosan irritatív kategóriába sorolta be a növényvédő szereket.

4 vizsgálati anyag (16%) esetében a HET-CAM teszt túlbecsülte az *in vivo* adatokat. 1 vizsgálati anyag (SCORE 250 EC) nem irritatív az *in vivo* adatok alapján, míg irritatív besorolást kapott a HET-CAM teszt alapján; 3 vizsgálati anyag (ORIUS 20 EW, SYSTHANE DUPLO, WARRANT 200 SL) az *in vivo* adatok szerint irritatív, míg a HET-CAM teszt során kapott eredmények alapján súlyosan irritatívnak bizonyult.

2 vizsgálati anyag (8%) esetében figyeltem meg, hogy az *in vivo* adat sorolta erősebb kategóriába a növényvédő szereket. 1 vizsgálati anyag (DUAL GOLD 960 EC) az *in vivo* adatok alapján irritatívnak minősült, míg a HET-CAM teszt szerint nem irritatív; 1 vizsgálati anyag (CYPERKILL 25 EC) az *in vivo* adatok szerint súlyosan irritatív kategóriába sorolható, míg az általam elvégzett HET-CAM teszt alapján irritatívnak bizonyult.

11. táblázat: Az *in vivo* teszt és a HET-CAM teszt irritációs kategóriáinak az összevetése

<i>In vivo</i> teszt kategóriái	HET-CAM teszt kategóriái			Összesen
	Nem irritatív	Irritatív	Súlyosan irritatív	
Nem irritatív	1	1	0	2
Irritatív	1	13	3	17
Súlyosan irritatív	0	1	5	6
Összesen	2	15	8	25



#### 4.5.2 Az ICE tesztből származó eredmények összehasonlítása az *in vivo* adatokkal

A kísérletbe vont 25 vizsgálati anyagból 16 készítmény (64%) esetében megegyezett (12. táblázat) az ICE tesztből származó eredmények irritációs kategóriába sorolása az irodalomból származó adatok besorolásával. 1 vizsgálati anyag (SCORE 250 EC) esetében mindkét teszt nem irritatív kategóriába, 13 vizsgálati anyag (BUMPER 25 EC, COMMAND 48 EC, DUAL GOLD 960 EC, GLIALKA STAR, LEOPARD 5 EC, MIRAGE 45 EC, MYSTIC 250 EC, NIMROD 25 EC, ORIUS 20 EW, RACER, SYSTHANE DUPLO, VERTIMEC 1,8 EC, WARRANT 200 SL) esetében mindkét teszt irritatív kategóriába, míg 2 vizsgálati anyag (MECOMORN 750 SL, SEKATOR) esetében mindkét teszt súlyosan irritatív kategóriába sorolta be a növényvédő szereket.

2 vizsgálati anyag (8%) esetében az ICE tesztből származó eredmények túlbecsülték az *in vivo* adatokból származó besorolást. 1 vizsgálati anyag (TANDUS 200 EC) az *in vivo* adatok alapján nem irritatív, míg az ICE teszt alapján irritatívnak bizonyult; 1 vizsgálati anyag (GLYPHOGAN 480 SL) az *in vivo* adatok alapján irritatívnak minősült, míg az ICE teszt alapján súlyosan irritatívnak.

7 vizsgálati anyag (28%) esetében az *in vivo* adat sorolta erősebb kategóriába a növényvédő szereket. 3 vizsgálati anyag (PROPLANT, PULSAR 40 SL, RELDAN 25 EC) irritatív az *in vivo* adatok alapján, azonban nem irritatívnak bizonyult az elvégzett ICE teszt alapján; 1 vizsgálati anyag (DOMARK 10 EC) súlyosan irritatív az *in vivo* adatok alapján, miközben az általam elvégzett ICE teszt szerint nem minősült irritatív besorolásúnak; 3 vizsgálati anyag (CYPERKILL 25 EC, K-OBIOL 25 EC, TOPAS 100 EC) súlyosan irritatív az *in vivo* adatok alapján, míg irritatív besorolást kapott az ICE tesztből származó eredményei alapján.

12. táblázat: Az *in vivo* teszt és az ICE teszt irritációs kategóriáinak az összevetése

<i>In vivo</i> teszt kategóriái	ICE teszt kategóriái			Összesen
	Nem irritatív	Irritatív	Súlyosan irritatív	
<b>Nem irritatív</b>	1	1	0	2
<b>Irritatív</b>	3	13	1	17
<b>Súlyosan irritatív</b>	1	3	2	6
<b>Összesen</b>	5	17	3	25

### 4.5.3 Az ICE és HET-CAM tesztből származó eredmények összehasonlítása

A kísérletbe vont 25 vizsgálati anyagból 12 készítmény (48%) esetében megegyezett (13. táblázat) az két *in vitro* teszt kategóriákba sorolása a szemirritáció szerint. 10 vizsgálati anyag (BUMPER 25 EC, COMMAND 48 EC, CYPERSKILL 25 EC, GLIALKA STAR, LEOPARD 5 EC, MIRAGE 45 EC, MYSTIC 250 EC, NIMROD 25 EC, RACER, VERTIMEC 1,8 EC) irritatívnak bizonyult mind az ICE teszt, mind a HET-CAM teszt besorolása alapján, 2 vizsgálati anyag (MECOMORN 750 SL, SEKATOR) esetében mindkét teszt súlyosan irritatív kategóriába sorolta be a növényvédő szereket.

10 vizsgálati anyag (40%) esetében figyeltem meg azt, hogy a HET-CAM teszt túlbecsülte az ICE tesztből származó eredményeket. 4 vizsgálati anyag (PROPLANT, PULSAR 40 SL, RELDAN 25 EC, SCORE 250 EC) irritatív a HET-CAM teszt alapján, amíg az elvégzett ICE teszt szerint nem minősült irritatívnak; 1 vizsgálati anyag (DOMARK 10 EC) súlyosan irritatív a HET-CAM tesztből származó adatok alapján, azonban az ICE teszt szerint nem minősül irritatív besorolásúnak; 5 vizsgálati anyag (K-OBIOL 25 EC, ORIUS 20 EW, SYSTHANE DUPLO, TOPAS 100 EC, WARRANT 200 SL) rovarölő szer súlyosan irritatívnak minősül a HET-CAM teszt alapján, miközben az ICE teszt szerint irritatív kategóriába sorolható.

3 vizsgálati anyag (12%) esetében az ICE teszt sorolta magasabb irritációs kategóriába a kapott eredményeket a HET-CAM teszttel szemben. 2 vizsgálati anyag (DUAL GOLD 960 EC, TANDUS 200 EC) a HET-CAM teszt alapján nem minősült irritatívnak, míg az ICE teszt szerint irritatív; 1 vizsgálati anyag (GLYPHOGAN 480 SL) a HET-CAM tesztből származó eredmények alapján irritatívnak minősült, amíg az ICE teszt alapján súlyosan irritatívnak.

13. táblázat: Az ICE teszt és a HET-CAM teszt irritációs kategóriáinak az összevetése

HET-CAM teszt kategóriái	ICE teszt kategóriái			Összesen
	Nem irritatív	Irritatív	Súlyosan irritatív	
Nem irritatív	0	2	0	2
Irritatív	4	10	1	15
Súlyosan irritatív	1	5	2	8
Összesen	5	17	3	25

#### 4.5.4 Az MTT tesztből származó eredmények összehasonlítása az *in vivo* adatokkal

A kísérletbe vont 15 vizsgálati anyagból 7 (46,66%) vizsgálati anyag MTT vizsgálatból származó eredménye megegyezett (14. táblázat) az *in vivo* adatokkal. A COMMAND 48 EC, a LEOPARD 5 EC, a NIMROD 25 EC, a PROPLANT, a RACER, a SYSTHANE DUPLO, a WARRANT 200 SL egyaránt irritatívnak minősült mindkét besorolás alapján..

4 vizsgálati anyag (26,67%) esetében az MTT vizsgálat túlbecsülte az *in vivo* adatokból származó besorolást. 1 vizsgálati anyag (TANDUS 200 EC) az *in vivo* adatok alapján a nem irritatív besorolást kapta, míg az MTT vizsgálat alapján irritatívnak minősült; 3 vizsgálati anyag (MIRAGE 45 EC, MYSTIC 250 EC, RELDAN 25 EC) irritatívnak bizonyult az *in vivo* adatok alapján, azonban súlyosan irritatív az MTT vizsgálat alapján.

4 vizsgálati anyag (26,67%) az *in vivo* adatok szerint került magasabb irritációs besorolásba az MTT vizsgálat eredményeivel szemben. 1 vizsgálati anyag (PULSAR 40 SL) irritatívnak bizonyul az *in vivo* adatok alapján, míg nem irritatív az MTT vizsgálat szerint; 3 vizsgálati anyag (CYPERKILL 25 EC, K-OBIOL 25 EC, TOPAS 100 EC) szer súlyosan irritatív az *in vivo* adatok alapján, míg irritatív besorolást kapott az MTT vizsgálatból származó eredményei alapján.

14. táblázat: Az *in vivo* teszt és az MTT vizsgálat irritációs kategóriáinak az összevetése

<i>In vivo</i> teszt kategóriái	MTT vizsgálat kategóriái			Összesen
	Nem irritatív	Irritatív	Súlyosan irritatív	
Nem irritatív	0	1	0	1
Irritatív	1	7	3	11
Súlyosan irritatív	0	3	0	3
Összesen	1	11	3	15

#### 4.5.5 Az eredmények statisztikai elemzése

Az egyes módszerek rangkorrelációval való összehasonlításának eredményét a 15. táblázat mutatja be.

15. táblázat: A módszerek rangkorrelációval való statisztikai értékelése

Módszerek	Egyezőség (%)	Kendall-féle gamma	p érték
<i>in vivo</i> - HET-CAM	76	0,9238095	0,0006268
<i>in vivo</i> - ICE	64	0,5000000	0,2020261
ICE - HET-CAM	48	0,3500000	0,3015548

Az *in vivo* teszt és HET-CAM teszt közötti egyezőség mutatta a legközelebbi eredményeket, 76%-os értékkel. Kendall-féle gamma érték a két módszer kategóriái között 0,92. Az *in vivo* teszt és ICE teszt irritációs kategóriáinak egyezősége 64%-os, Kendall-féle gamma értéke 0,5. Az ICE teszt és HET-CAM teszt irritációs besorolásának egyezősége mindössze 48%, Kendall-féle gamma értéke 0,3.

Egyes módszerek Cohen-féle kappával való összehasonlításának eredményét a 16. táblázat mutatja be.

16. táblázat: A módszerek Cohen-féle kappával való statisztikai értékelése

Módszerek	Egyezőség (%)	Cohen-féle kappa	p érték
<i>in vivo</i> - HET-CAM	76	0,6268657	0,0014991
<i>in vivo</i> - ICE	64	0,2788462	0,1267418
ICE - HET-CAM	48	0,1561181	0,3663614

Az *in vivo* teszt és HET-CAM teszt összehasonlításából eredő Cohen-féle kappa mutató értéke 0,63, mely érték jónak tekinthető. Az *in vivo* teszt és ICE teszt irritációs kategóriáinak összehasonlítására vonatkozó Cohen-féle kappa mutató értéke 0,28, mely érték gyengének tekinthető. Az ICE teszt és HET-CAM teszt összehasonlításából eredő Cohen-féle kappa mutató értéke 0,16, mely érték gyengének tekinthető. A Cohen-féle kappa mutató értékelését a 17. táblázatban szemléltetem.

17. táblázat: A Cohen-féle kapp mutató értelmezése

<b>Cohen-féle kapp értéke</b>	<b>Besorolás</b>
0-0,4	gyenge
0,4-0,6	közepes
0,6-0,8	jó
0,8-1	kiváló

A kis szignifikancia érték csak arra utal, hogy a különböző módszerekkel kapott kategóriák egyezősége jobb, mint a véletlennek köszönhető egyezés azonos peremeloszlások esetén. Tehát a kis szignifikancia értékből nem következtethetünk arra, hogy az egyik módszer kiváltható a másik módszerrel, hanem csak arra, hogy a köztük lévő egyezés jobb, mint ami a véletlen miatt is bekövetkezhetne.

Ahogy a fent látható 15. táblázat is mutatja, az általam elvégzett vizsgálatok közül leginkább a HET-CAM teszt eredményei (76%) közelítik az *in vivo* szemirritációs tesztből származó adatokat (Kendall-féle gamma 0,92; Cohen-féle kapp 0,62), amelyet az ICE teszt követ 64%-kal (Kendall-féle gamma 0,5; Cohen-féle kapp 0,28) (15. táblázat).

Az MTT vizsgálat statisztikai kiértékelését mellőztem az eltérő elemszám miatt.

#### 4.5.6 Következtetések és javaslatok

A 18. táblázat mutatja be az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokból származó összesített szemirritációs eredményeket.

18. táblázat: Az agrokemikáliák *in vivo* és *in vitro* szemirritációs kategóriái

Vizsgált anyag	<i>In vivo</i> adatok	HET-CAM tesztből származó eredmények	ICE tesztből származó eredmények	MTT vizsgálatból származó eredmények
<b>BUMPER 25 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	-
<b>COMMAND 48 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	irritatív
<b>CYPERKILL 25 EC</b>	súlyosan irritatív	irritatív	irritatív	irritatív
<b>DOMARK 10 EC</b>	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	nem irritatív	-
<b>DUAL GOLD 960 EC</b>	irritatív	nem irritatív	irritatív	-
<b>GLIALKA STAR</b>	irritatív	irritatív	irritatív	-
<b>GLYPHOGAN 480 SL</b>	irritatív	irritatív	súlyosan irritatív	-
<b>K-OBIOL 25 EC</b>	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	irritatív	irritatív
<b>LEOPARD 5 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	irritatív
<b>MECOMORN 750 SL</b>	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	-
<b>MIRAGE 45 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	súlyosan irritatív
<b>MYSTIC 250 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	súlyosan irritatív
<b>NIMROD 25 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	irritatív
<b>ORIOUS 20 EW</b>	irritatív	súlyosan irritatív	irritatív	-
<b>PROPLANT</b>	irritatív	irritatív	nem irritatív	irritatív
<b>PULSAR 40 SL</b>	irritatív	irritatív	nem irritatív	nem irritatív
<b>RACER</b>	irritatív	irritatív	irritatív	irritatív

<b>RELDAN 22 EC</b>	irritatív	irritatív	nem irritatív	súlyosan irritatív
<b>SCORE 250 EC</b>	nem irritatív	irritatív	nem irritatív	-
<b>SEKATOR</b>	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	-
<b>SYSTHANE DUPLO</b>	irritatív	súlyosan irritatív	irritatív	irritatív
<b>TANDUS 200 EC</b>	nem irritatív	nem irritatív	irritatív	irritatív
<b>TOPAS 100 EC</b>	súlyosan irritatív	súlyosan irritatív	irritatív	irritatív
<b>VERTIMEC 1,8 EC</b>	irritatív	irritatív	irritatív	-
<b>WARRANT 200 SL</b>	irritatív	súlyosan irritatív	irritatív	irritatív

Az általam használt alternatív módszerek (HET-CAM teszt, ICE teszt, MTT vizsgálat) rendelkeznek azokkal az alapvető előnyös tulajdonságokkal, melyeket az *in vitro* módszerekkel szemben támasztanak. Megfelelő érzékenységek, olcsóbbak és gyorsabbak, mint az *in vivo* teszt, könnyen reprodukálhatóak. Hátrányként mindhárom alternatív módszer esetében általánosságban említhető a reverzibilitás megfigyelhetőségének hiánya. A HET-CAM teszt esetében hátrány az értékelés szubjektivitása és a vizsgálati anyagok fizikai-kémiai tulajdonságai által a kiértékelés befolyásolása. Az ICE teszt hátrányaként a csirkeszemek korlátozott idejű fenntarthatósága jelenik meg, valamint az, hogy nem veszi figyelembe a kötőhártya és írisz sérüléseit. Az MTT vizsgálat korlátját a mitokondrium dehidrogenáz tevékenysége, valamint a sejtek élettani állapota adhatja.

Bagley és mtsai (1992; 1994) a chorioallantois membránt felhasználó kísérleti módszerek kitűnő reprodukálhatóságát figyelték meg. A HET-CAM teszt esetében megállapították, hogy az eredmények jó korrelációt ( $r = 0,77$ ) mutatnak az *in vivo* adatokkal.

Leighton és mtsai (1985), Luepke, (1985), Parish (1985), valamint Luepke és Kemper (1986) vizsgálataik szerint arra a megállapításra jutottak, miszerint az *in vitro* HET-CAM vizsgálatból származó eredmények jó korrelációt mutatnak az *in vivo* adatokkal egyéb vegyi anyagok esetén, emellett Budai (2002) növényvédő szereken végzett vizsgálatait során is nagyfokú egyezőséget ( $r = 0,78$ ) tapasztalt a HET-CAM teszt és az *in vivo* tesztből származó adatok összehasonlításakor.

Jírová és munkatársai (2014) kutatásaik során megállapították, hogy a HET-CAM teszt biztosítja a legalacsonyabb hamis eredmények arányát és értékes eredményeket szolgáltat a kötőhártyával kapcsolatosan is.

Az általam végzett összehasonlító vizsgálatok alapján megállapíthatom, hogy az *in vitro* tesztek (HET-CAM, ICE, MTT) együttesen jelenlegi formájukban nem alkalmasak az *in vivo* szemirritációs teszt teljes irritációs potenciáljának kiváltására. Külön-külön hatékonyan bizonyulnak a szemirritációs vizsgálatok többlépcsős folyamatban való kiváltásához, hiszen amennyiben az *in vitro* HET-CAM teszt súlyosan irritatívnak állapítja meg a vizsgált anyagot, valamint ha az ICE teszt súlyos szemkárosodást (1. kategória) állapít meg, vagy nem mér károsodást (nem osztályozható), az engedélyezési hatóságok nem kérik az *in vivo* szemirritációs teszt elvégzését.

Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a kísérletbe vont növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában a HET-CAM teszt adta a legjobb eredményt (76%) az *in vivo* adatokkal történő összehasonlítás során. Ezek alapján, figyelembe véve a többlépcsős megközelítést (4. ábra), a HET-CAM teszt ígéretes módszer a növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában. A módszer nagyfokú érzékenységét mutatja, hogy vizsgálataimban, azokban az esetekben, ahol az *in vivo* irritációs besorolás nem egyezett az *in vitro* besorolással, ott magasabb a fals pozitív eredmények száma (16%), mint a fals negatívaké (8%), ami humán kockázatbecslés szempontjából előnyös.

Vizsgálataim során a kísérletbe vont növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában az ICE teszt jó (64%) eredményeket adott az *in vivo* adatokkal történő összehasonlítás során. A fals pozitív és fals negatív eredmények aránya 8%:28%. Egyéb vegyi anyagok esetében az ICE teszt nagyon jó eredményeket (83%-os egyezés, (NIEHS, 2006)) adott az *in vivo* adatokkal történő összehasonlítás során. Az ICE teszt alkalmasságát egy többlépcsős tesztelési stratégiában a szemet súlyosan irritáló vegyületek esetében Prinsen és Koeter (1993), Prinsen (1996; 2005) is megállapították, akik vizsgálataik során több mint száz vegyülettel végezték el a kísérletet. Többlépcsős megközelítésben alkalmazva, javaslom az ICE teszt felhasználását a növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában, valamint további növényvédő szerek bevonásával növelhető az összehasonlíthatóság alapja.

A kísérletbe vont növényvédő szerek szerekkel történt vizsgálataim alapján megállapítottam, hogy a két *in vitro* módszerből (HET-CAM, ICE) származó eredmény összehasonlítása 48%-os egyezőséget mutatott. A fals pozitív és fals negatív eredmények aránya 12%:40%.

Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a kísérletbe vont növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában az MTT teszt eredményei kevésbé közelítették (46,66%) a



kívánt eredményeket az *in vivo* adatokkal történő összehasonlítás során, bár a kísérletbe vont növényvédő szerek számából adódóan megalapozott következtetéseket nem vonhatok le. A fals pozitív és fals negatív eredmények aránya 26,67%:26,67%. A citotoxicitási vizsgálatot mindenképpen javasolt nagyobb elemszámmal és szűkebb hígítási határokkal is elvégezni, leszűkíteni az EC<sub>50</sub> értékek meghatározhatóságát.

A HET-CAM teszt és az ICE teszt alkalmas az állatok számának csökkentésére, ezáltal az *in vivo* vizsgálatok finomítására is. Kísérleteim alapján elmondhatom, hogy az általam vizsgált tesztek *in vitro* tesztrendszerben együttesen több módszer felhasználásával alkalmasak lehetnek az *in vivo* teszt teljes irritációs potenciálját lefedő kiváltásra. A teljes irritációs potenciál lefedéséhez többlépcsős megközelítésben *in vitro* tesztrendszer szükséges, amelyhez ajánlom mind a HET-CAM, mind az ICE módszerek bevonását az OECD 405-ös szabvány szerinti *in vivo* vizsgálat elvégzése előtt.

## 5 ÖSSZEFOGLALÁS

A megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszerek előállításában - a világ rohamosan növekvő népességének egyre nagyobb élelmiszerigénye mellett – a növényvédő szerek okszerű felhasználásának jelentős szerepe van.

A kémiai növényvédelem mellett egyre kiemeltebb szerepet kap a biológiai és fizikai növényvédelem, mert a termésveszteséget okozó károsítók ellen a környezet kímélése érdekében lépünk fel. A növényvédő szerek, bár szükséges anyagok, potenciális mérgek, ezért kedvező hatásaik mellett esetleges káros hatásokkal is számolnunk kell. Ezek a káros hatások az élő szervezetekre sokféleképpen érvényesülhetnek. Mivel a környezetbe juttatjuk ki a peszticideket, mérgeződhet a környezet (talaj, víz, levegő), illetve az itt élő nem-célszervezetek (méh, hal, vad, rovar, háziállat), valamint a táplálékláncban feldúsulva végső fogyasztóként az ember is. Felhasználás során szintén mérgeződhet az ember, mint aki kijuttatja, alkalmazza a szereket. A kijuttatást végző személy testfelszínére kerülve helyi, illetve általános mérgezés alakulhat ki. A szerek különböző mértékű szem- és bőrkárosodást okozhatnak irritatív hatásuktól függően. A szembe jutott mérgező anyagok az enyhe, reverzibilis kötőhártya gyulladástól kezdve súlyos és maradandó szemkárosodást, szaruhártyahomályt, végső esetben vakságot és egyéb életveszélyes károsodást is okozhatnak (Bordás, 1971).

Céлом az volt a vizsgálataim során, hogy Magyarországon Budai (2002) és Tavaszi (2012) után újabb növényvédő szerekkel és módszerekkel bővítem ki a különböző *in vitro* vizsgálatok összehasonlítását a primer szemirritációban elismert *in vivo* szemirritációs teszttel, valamint, hogy megállapíthassam az alternatív módszerek együttes vagy külön-külön való alkalmazhatóságát elővizsgálati vagy kiváltási módszerként. Céлом elérése érdekében 25 (MTT-nél 15) növényvédő szer irritációs potenciálját határoztam meg a HET-CAM, az MTT és az ICE teszttel, majd vettem azokat össze az *in vivo* szemirritációs teszt irodalomból (toxikológiai értékelő jelentések) származó adataival.

Az *in vivo* adatokat (Toxicological studies on the Plant Protection Product, Annex III A, Section 3, Tier II – Summary: Toxicological studies) a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság Növényvédő szer és Termésnövelő anyag Engedélyezési Osztálya bocsátotta rendelkezésemre.

A HET-CAM tesztet az Invitox Protocol 47. száma (1990) alapján végeztem el. A vizsgálati anyagokat 100%-os töménységben alkalmaztam. A vizsgálathoz magas termékenységi mutatóval rendelkező (White Leghorn) tyúktojásokat használtam, amelyeket lámpázás után 10

napig keltetem 37 °C-on, 60-70 %-os páratartalomnál. A 10. napon a tojáshéj felnyitásával szabadabbá váló chorioallantois membránra cseppenttem a vizsgálati anyagot, melyet 5 percig figyeltem meg. A membránon vérzés, véredény lízis vagy koaguláció jelentkezhet, melyek jelentkezésének idejét másodperc pontossággal rögzítettem, majd ezekből irritációs indexet számoltam. Vizsgálati anyagonként 6 db tojást alkalmaztam 4 ismétlésben.

Az ICE tesztet az OECD 438 irányelv alapján végeztem el. A vizsgálatához használt csirkeszemek a vágástól számított két órán belül az izolált körülményeket biztosító szuperfúziós készülékbe kerültek. A vizsgálókamrákba helyezett szemek alkalmasságát a szaruhártyahomály és a 2 v/v%-os fluoreszein-oldat megtartásának mértékével ellenőriztem. A nem megfelelő szemek kicserélésre kerültek, majd megmértem a szaruhártya-vastagságot minden szem esetében. 45-60 perces akklimatizációt követően, de még a kezelés előtt szintén meghatároztam a szaruhártya-vastagságot, a szaruhártyahomályt és a fluoreszein-megtartást mindegyik szemnél (referencia értékek). A kezelést követő mosás utáni 30., 75., 120., 180., 240. percben végzett megfigyelések során rögzített paramétereket a referenciaértékekkel összehasonlítva meghatározható volt a vizsgált vegyi anyag szaruhártyára gyakorolt károsító hatása az adott időpontban. A kezelési térfogat 30 µl, az expozíciós idő pedig 10 másodperc volt minden egyes szem esetében, amelynek lejárta után a tesztanyagot szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldat segítségével távolítottam el a szaruhártya felszínéről (kb. 20 ml/szem). A csirkeszemek elváltozásainak mértékét százalékban fejeztem ki, majd a három mérésből származó végpontból határoztam meg a vizsgálati anyag szemirritációs potenciálját. Vizsgált anyagonként három szemet vontam kísérletbe.

Az MTT vizsgálatot patkányból kinyert epithelsejteken végeztem, amelyeket 24 órával a vizsgálat megkezdése előtt az előzőleg elkészített szuszpenzióban (Hank-oldat), megfelelő hígításban 96 lyukú lemezre vittem fel. Másnap a tápoldatot kiöntöttem, és friss tápoldatra cseréltem, amely a vizsgálati anyag különböző mértékben hígított oldatát tartalmazta. 24 órás expozíció után 2 órán át 1 mg/ml MTT oldattal inkubáltam a sejteket, majd a keletkezett formazán kristályokat DMSO-val oldottam. Az oldat fényelnyelését 540 nm hullámhosszon mértem. Az azonos hígítások fényelnyelési adataiból (3 mérés) átlagot számoltam, majd ezt a kezeletlen sejtek (24 mérés) átlagához viszonyítva kiszámítottam a %-os sejtpusztulást. A kezelt oldat fényelnyelését a kezeletlenhez viszonyítva határoztam meg az élő sejtek %-os arányát. A vizsgálati minták minden hígításával három párhuzamos mérést végeztem. Kontrollként kezeletlen sejteket használtam.

Az általam elvégzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy összességében mindhárom alternatív módszernél jó a közelítés az *in vivo* adatok irányába (18. táblázat), de a kísérletbe vont növényvédő szerek alapján a HET-CAM teszt mutatta a legjobb eredményeket.

Kísérleteim alapján elmondhatom, hogy az általam vizsgált tesztek *in vitro* tesztrendszerben együttesen több módszer felhasználásával alkalmasak lehetnek az *in vivo* teszt teljes irritációs potenciálját lefedő kiváltásra. A teljes irritációs potenciál lefedéséhez többlépcsős megközelítésben *in vitro* tesztrendszer szükséges, amelyhez ajánlom mind a HET-CAM, mind az ICE módszerek bevonását az OECD 405-ös szabvány szerinti *in vivo* vizsgálat elvégzése előtt.

## 6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Budai Péter egyetemi docensnek, aki iránymutatásaival, hasznos tanácsaival hozzájárult doktori értekezésem elkészítéséhez.

Köszönöm Buda Istvánnak az ICE teszt kísérleteiben nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Jemnitz Katalinnak és munkatársainak, az MTT vizsgálat elvégzésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti a Növényvédelmi Intézet Higiéné Osztályának dolgozóit: Tarsoly Gábornét, Dr. Szabó Ritát, Somody Gergőt, Grúz Adriennét és Szemerédy Gézát a HET-CAM teszt során nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Menyhárt Lászlónak, aki az eredmények statisztikai feldolgozásához nyújtott elengedhetetlen segítséget.

Köszönöm Grúz Adrienn és Németh Balázs segítségét az angol-magyar fordításban.

Minden támogatást és segítséget köszönök Családomnak.

## 7 IRODALOMJEGYZÉK

1. Alley, M. C., Scudiere, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R. 1988. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research* 48. 589-601.
2. Altman, F. P. 1976. Tetrazolium salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 9. 1-51.
3. Bagley, D.M., Kong, B.M., De Salva, S.J. 1989. Assessing the eye irritation potential of surfactant-based materials using the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA). AM Goldberg (Ed.): *Alternative methods in toxicology series - Symposium on in vitro toxicology: new directions*. Mary Ann Liebert, Inc., New York 7. 265-272.
4. Bagley, D.M., Rizvi, P.Y., Kong, B.M., Salva, S.J. 1991. Factors affecting use of the hen's egg chorioallantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential. *Journal of toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* 10. 95-104.
5. Bagley, D.M., Bruner, L.H., De Silva, O. 1992. An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. *Toxicology in Vitro* 6. 275-284.
6. Bagley, D.M., Waters, D., Kong, B.M. 1994. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Food and Chemical Toxicology* 33. 1155-1160.
7. Balls, M., Botham, P.A. Bruner, L.H., Spielmann, H., 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 9. 871-929.
8. Barile, F. A. 2007. Chapter 13. Cell culture methods for acute toxicology testing. In F. A. Barile (Ed.), *Principles of toxicology testing* 175–202.
9. Barile, F. A. 2010. Validating and troubleshooting ocular *in vitro* toxicology tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61. 136–145.
10. Barstadt, R., Cortesi, J., Janus J. 1991. Use of Clonetics neutral red bioassay to optimize components of serumfree medium for normal human anchorage-dependent cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27. 160-170.
11. Berridge, M. V., Tan A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular

- localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of Biochemistry and Biophysics 303. 474-482.
12. Beveridge, W. I. B., Burnet, F.M. 1946. The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. Medical Research Council Special Report Series No. 256, London
  13. Blein, O., Adolphet, M., Lakhdar, B., Cambar, J., Gubanski, G., Castelli, D., Contie, C., Hubert, F., Latrille, F., Masson, P., Clouzeau, J., Le Bigot, J.F., De Silva, O., Dossou, K.G. 1991. Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test (OPAL Project). Toxicology in Vitro 5. 555-557.
  14. Bogenfürst F., Horn P., Meleg I., Mihók S., Sütő Z. 2000. Állattenyésztés II. Mezőgazda Kiadó, Budapest 42-63.
  15. Bordás S. 1971. A növényvédő szer mérgezés elsősegélynyújtása. Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Minisztérium, Budapest 21.
  16. Buda I. 2012. Mezőgazdasági vegyi anyagok *in vitro* szemirritációs vizsgálata izolált csirkeszemen. Szakdolgozat. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Budapest
  17. Budai P., FánCSI T., Várnagy L. 2000. Histological examination of CAM treated with irritative pesticides. Proceedings of the 6th Meeting of the Central and Eastern European Section of SECOTOX. Central European Journal of Public Health 8. 68.
  18. Budai P. 2002. Mezőgazdasági vegyi anyagok irritatív potenciáljának vizsgálata *in vitro* HET-CAM teszttel. Doktori értekezés. Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely
  19. Burton, A. B. G. 1972. A method for the objective assessment of eye irritation. Food and Cosmetics Toxicology 10, 209-217.
  20. Burton, A. B. G., York, M., Lawrence, R.S. 1981. The *in vitro* assessment of severe eye irritants. Food and Cosmetics Toxicology 19. 471-480.
  21. Campling, B.G., Pym, J., Baker, H.M., Cole, S.P.C., Lam, Y. M. 1991. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. British Journal of Cancer 63. 75-83.
  22. Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing Cancer Research 47. 936-942.
  23. Carson, E. R. 1986. The role of mathematical models. Alternatives to Laboratory Animals 13. 295-299.

24. Chamberlain, M., Gad, S. C., Gautheron, P., Prinsen, M. K. 1997. Organotypic Models for the Assessment/Prediction of Ocular Irritation. *Food and Chemical Toxicology* 35. 23-37.
25. Christian, M.S., Diener, R. 1996. Soaps and detergents: alternatives to animal eye irritation tests. *Journal of the American College of Toxicology* 15. 1-44.
26. Cohen, J. 1968. "Weighed kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit". *Psychological Bulletin* 70. 213–220.
27. Cooper, K. J., Earl, L. K., Harbell, J., Raabe, H. 2001. Prediction of the ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability assay (BCOP) assay. *Toxicology in Vitro* 15. 95–103.
28. Curren, R., Evans, M., Raabe, H., Ruppalt, R., Harbell, J. 2000. Correlation of histopathology, opacity, and permeability of bovine corneas exposed *in vitro* to known ocular irritants. *Veterinary Pathology* 37. 557–564.
29. De Silva, O., Rougier, A., Dossou, K.G., 1992. The HET-CAM test: a study of the irritation potential of chemicals and formulations. *Alternatives to Laboratory Animals* 20. 432–437.
30. De Wever, B., Tornier, C., Rosdy, C., Beuerman, R. 2002. *In vitro* corneal recovery assay using a reconstituted human corneal epithelial model. Fourth World Congress On Alternatives And Animal Use In The Life Sciences, New Orleans, Louisiana, August 11-15. 2002.
31. Debbasch, C., Ebenhahn, C., Dami, N., Pericoi, M., Van den Berghe, Ch., Cottin, M., Nohynek, G. J. 2005. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. *Food and Chemical Toxicology* 43. 155–165.
32. Denizot, F., Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89. 271-277.
33. Doucet, O., Lanvin, M., Zastrow, L. 1999. Comparison of three *in vitro* methods for the assessment of the eye irritation potential of formulated products. *In vitro & Molecular Toxicology* 12. 63–76.
34. Doughty, M. J., Zaman, M. L. 2000. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Survey of Ophthalmology* 44. 367-408.



35. Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 82. 377–390.
36. EC 1991. Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Eye Irritation Test. Document XI/632/91-V/E/1/131/91, part I and part II. European Commission, Brussels
37. EC 2008. Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelet (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* L/353
38. EC 2013a. A Bizottság 283/2013/EU rendelete (2013. március 1.) a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 1107/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet értelmében a hatóanyagokra vonatkozó adatszolgáltatási követelmények meghatározásáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja*
39. EC 2013b. A Bizottság 284/2013/EU rendelete (2013. március 1.) a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 1107/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet értelmében a növényvédő szerekre vonatkozó adatszolgáltatási követelmények meghatározásáról.
40. ECHA (European Chemicals Agency) 2017. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance 214-231.
41. Ekstrom, C. T. 2017. MESS: Miscellaneous Esoteric Statistical Scripts. R package version 0.4-15. <https://CRAN.R-project.org/package=MESS>
42. Eskes, C., Bessou, S., Bruner, L., Curren, R., Harbell, J., Jones, P., Kreiling, R., Liebsch, M., McNamee, P., Pape, W., Prinsen, M. K., Seidle, T., Vanparys, P., Worth, A., Zuang, V. 2005. Eye irritation. *Alternatives to Laboratory Animals* 33. 47–81.
43. FánCSI T., Fehér Gy. 1978. A chorioallantois-membrán (CAM) szerkezetváltozása a keltetés során, csirkében. *Magyar Állatorvosok Lapja* 6. 403-407.
44. Fehér Gy. 1989. Háziállatok tájanatómiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest 57-58.
45. Fehér Gy. 2004. A háziállatok funkcionális anatómiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
46. Fisher, M., Schoenwolf, G. C. 1983. The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. *Teratology* 27. 65.
47. Fowler, W.C., Chang, D.H., Roberts, B.C., Zarovnya, E.L., Proia, A.D. 2004. A new paradigm for corneal wound healing research: the white leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Current Eye Research* 28. 241-250.

48. Gamer, M., Lemon, J., Fellows, I., Singh, P. 2012. irr: Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement. R package version 0.84. <https://CRAN.R-project.org/package=irr>
49. Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F. 1992. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundamental and Applied Toxicology* 18. 442-449.
50. Gáborjányi R., Kőmíves T., Király Z. 1995. A fenntartható mezőgazdaság növényvédelme. *Növényvédelem* 31. 49-43.
51. Gerlier, D., Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* 57. 57-63.
52. Goodman, L. A., Kruskal, W. H. 1954. Measures of association for cross classifications. *Journal of the American Statistical Association* 49. 732-764.
53. Guo, X., Yang, X. F., Yang, Y., Hans, R., Cai, J. H., Xue, J. Y., Tan, X. H., Xie, X. P., Xiong, X. K., Huang, J. M. 2010. Prediction of Ocular Irritancy of 26 Chemicals and 26 Cosmetic Products with Isolated Rabbit Eye (IRE) Test. *Biomedical and Environmental Sciences* 25. 359-366.
54. Hagino S., Itagaki H., Kato S., Kobayashi T., Tanaka M. 1991. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicology in Vitro* 5. 301-304.
55. Hagino S., Itagaki H., Kato S., Kobayashi T. 1993. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. *Toxicology in Vitro* 7. 35-39.
56. Hagino S., Kinoshita S., Tani N., Nakamura T., Ono N., Konishi K., Iimura H., Kojima H., Ohno Y. 1999. Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicology in Vitro* 13. 99-113.
57. Hayashi, K., Mori, T., Abo, T., Ooshima, K., Hayashi, T., Komano, T., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Takatsu, A., Nishiyama, N. 2012. Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicology in Vitro* 26. 1199–1208.
58. Hegyi F. 2014. Laktobacillusok vizsgálata továbbfejlesztett kolorimetriás módszerrel. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar.
59. Huhtala, A., Salminen, L., Tähti, H., Uusitalo, H. 2008. Corneal models for the toxicity testing of drugs and drug releasing materials. *Topics in multifunctional biomaterials and devices* 5-12.

60. ICCVAM 2006. *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NIH. Publication No: 07 -4517.
61. Invittox Protocol No 47. HET-CAM Test 1990. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. *Toxicology in Vitro* 4. 702-706.
62. Jacobs, G., Martens, M. 1988. The enucleated eye test: a comparison of the use of ultrasonic and optic pachometers. *Toxicology in Vitro* 2. 253-256.
63. Jacobs, G., Martens, M. 1990. Quantification of eye irritation based upon *in vitro* changes of corneal thickness. *Alternatives to Laboratory Animals* 17. 255-262.
64. Jírová, D., Kejlová, K., Janoušek, S., Bendová, H., Malý, M., Kolářová, H., Dvořáková, M. 2014. Eye irritation hazard of chemicals and formulations assessed by methods *in vitro*. *Neuroendocrinology Letters* 35. 133–140
65. Kay, J. H., Calandra, J. C. 1962. Interpretation of eye irritation tests. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 13. 281-289.
66. Kishore, A.S., Surekha, P.A., Sekhar, P.V.R., Srinivas, A., P., Murthy, P. B. 2008. Hen Egg Chorioallantoic Membrane Bioassay: An *In vitro* Alternative to Draize Eye Irritation Test for Pesticide Screening. *International Journal of Toxicology* 27. 449.
67. Kiss I. 1997. Szervek és szervrendszerek toxikológiája. In: Kiss, I. (szerk.): *Toxikológia*. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém 54-55.
68. Koeter, H.B.W.M., Prinsen, M.K. 1985. Comparison of *in vivo* and *in vitro* eye irritation test systems: a study with 34 substances. *Alternative Methods in Toxicology*, Chapter A9. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, New York
69. Kováts D. 2013. Nano-mérettartományba eső anyagok májkárosító hatása. Diplomadolgozat. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Budapest
70. Lawrence, R.S., Ackroyd, D.M., Williams, D.L. 1990. The chorioallantoic membrane in the prediction of eye irritation potential. *Toxicology in Vitro* 4. 321-323.
71. Leighton, J., Nassauer, J., Tchao, R. 1985. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and Chemicals Toxicology* 23. 293-298.
72. Liu, Y., Peterson, D. A., Hideo Kimura, H., Schubert, D. 1997. Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* 69. 581-593.
73. Lordo, R.A., Feder, P.I., Gettings, S.D. 1999. Comparing and evaluating alternative (*in vitro*) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. *Toxicology in Vitro* 13. 45-72.

74. Luepke, N.P. 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemicals Toxicology* 23. 287-291.
75. Luepke, N.P., Kemper, F.H. 1986. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. *Food and Chemical Toxicology* 24. 495-496.
76. Luepke, N.P., Wallat, S. 1987. HET-CAM – Reproducibility studies. *Alternative Methods in Toxicology* 5. 353-363.
77. Maurer, J. K., Parker, R.D., Jester, J.V. 2002. Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36. 106-117.
78. McDonald, T.O., Baldwin, H.A., Beasley, C.H. 1973. Slit-lamp examination of experimental animal eyes. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 24. 163-180.
79. Millichamp, N. J. 1999. Species specificity: Factors affecting the interpretation of species differences in toxic responses of ocular tissues. In G. C. Y. Chiou (Ed.), *Ophthalmic toxicology*, 2nd ed Target organ toxicology series. 89–114.
80. Molnár K., Csörgő T., Farkas J., Kis V., Sass M., Szatmári Zs., Török J. K. 2012. *Bevezetés az állattanba*. ELTE TTK Biológiai Intézet
81. Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65. 55-63.
82. Nab, J., Balls, M., Hendriksen, C.F.M. 1993. Alternatives to animal experimentation. In: Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., Beynen, A.C. (eds): *Principles of laboratory animal science*. Elsevier Amsterdam 319-333.
83. Nguyen, D. H., Beuerman, R. W., De Wever, B., Rosdy, M. 2003. Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In H. Salem, S. A. Katz (Eds.), *Alternative methods for the new millennium*, chapter 14. 145–157.
84. NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) 2006. Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. Background Review Document. NIH Publication No: 06-4513
85. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2017. Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Eye Irritation/Corrosion.

86. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2009. Test Guideline 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
87. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2017. Test Guideline 438. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 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
88. Ohno, Y., Kaneko, T., Kobayashi, T., Inoue, T., Kuroiwa, Y., Yoshida, T., Momma, J., Hayashi, M., Akiyama, J., Atsumi, T., Chiba, K., Endo, T., Fujii, A., Kakishima, H., Kojima, H., Masamoto, K., Masuda, M., Matsukawa, S., Ohkoshi, K., Okada, J., Sakamoto, K., Takano, K., Takanaka, A. 1995. First-phase interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. I. Overview, organization and results of the validation study. AATEX 3. 123-136.
89. Ohno Y., Kaneko T., Inoue T., Morikawa Y., Yoshida T., Fuji A., Masuda M., Ohno T., Hayashi M., Momma J., Uchiyama T., Chiba K., Ikeda N., Imanashi Y., Itakagaki H. 1999. Interlaboratory validation of the 23 *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. Toxicology in Vitro 13. 73-98.
90. Parish, W.E. 1985. Ability of *in vitro* (corneal injury - eye organ - and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. Food and Chemicals Toxicology 24. 215-227.
91. Peck, R. 1985. A One-Plate Assay for Macrophage Bactericidal Activity. Journal of Immunological Methods 82. 131-140.
92. Plumb, J. A., Milroy, R., Kaye, S. B. 1989. Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. Cancer Research 49. 4435-4440.
93. Price, J.B., Andrews, I.J. 1985. The *in vitro* assessment of eye irritation using isolated eyes. Food and Cosmetics Toxicology 23. 313-315.
94. Prinsen, M.K., Koeter, H.B.W.M. 1993. Justification of the Enucleated Eye Test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. Food and Chemicals Toxicology 31. 69-76.

95. Prinsen, M.K. 1996. The Chicken Enucleated Eye Test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food and Chemicals Toxicology* 34. 291-296.
96. Prinsen, M.K. 2005. *In vitro* and *in vivo* Data for 94 Substances Tested in the Isolated Chicken Eye Test. Unpublished Data provided Directly to NICEATM by M.K. Prinsen. TNO Nutrition and Food Research Institute
97. Prinsen, M. K., Hendriksen, C. F. M., Krul, C. A. M., Woutersen, R. A. 2017. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85. 132-149.
98. R Core Team 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
99. Rougier, A., Cottin, M., De Silva, O. 1992. *In vitro* methods: their relevance and complementary in ocular safety assesment. *Lens and Eye Toxicity Research* 9. 229-245.
100. Russell, W.M.S., Burch, R.L. 1959. The principles of humane experimental technique. Methouen, London
101. Scheel, J., Kleber, M., Kreutz, J., Lehringer, E., Mehling, A., Reisinger, K., Steiling, W. 2011. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59. 471–492.
102. Schutte, K., Prinsen, M.K., McNamee, P.M., Roggeband, R. 2009. The isolated chicken eye test as a suitable *in vitro* method for determining the eye irritation potential of household cleaning products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54. 272-281.
103. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. 2010. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and TopDown approaches. *Toxicology in Vitro* 24. 1–9.
104. Scudiere, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. 1988. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 48. 4827-4833.

105. Smith, F. G. 1951. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Journal of Iowa* 445-456.
106. Spielmann, H., Liebsch, M., Gerner, I., Kalweit, S., Wirnsberger, T. 1993. Results of the German validation project of alternatives to the Draize eye test (Abstract). In: Goldberg, A. M. (ed): *Alternative Methods in Toxicology* 9. 243.
107. Spielmann, H. 1997. Ocular irritation. In Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J. (Eds.), *In vitro* methods in pharmaceutical research. London, UK: Academic Press. 265–287
108. Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., De Silva, O. 1999. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in Vitro* 13. 375–384.
109. Stern, M., Klausner, M., Alvarado, R., Reskers, K., Dickens, M. 1998. Evaluation of EpiOcular™ Tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 12. 455-461.
110. Strauss, L. 1948. The Pathology of Gargoylism. Report of a Case and Review of the Literature. *American Journal of Pathology* 24. 855.
111. Süveges I. 2015. Szemészet. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest 130-134.
112. Szabó J. 2002. Állattenyésztés III. (Baromfitenyésztés). Egyetemi jegyzet. Szent István Egyetem Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
113. Szentágothai J., Réthelyi M. 2014. Funkcionális anatómia III. Medicina Könyvkiadó Zrt.
114. Takahashi, S., Abe, T., Goto, J., Fukuuchi, Y. 2001. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International* 40. 441–448.
115. Tavaszi J. 2012. Mezőgazdasági vegyi anyagok irritatív hatásainak *in vitro* toxikológiai vizsgálata. Doktori értekezés. Pannon Egyetem Georgikon Kar, Keszthely.
116. Thoft, R.A., Friend, J. 1977. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 16. 14-20.
117. Twentyman, P. R., Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer* 56. 279-285.
118. Vargha A. 2015. Matematikai statisztika. Pólya Kiadó, Budapest 338.
119. Verrett, M.J., Scott, W.F., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K., Thomas, C.A. 1980. Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicology and Applied Pharmacology* 56. 265.

120. Vinardell, M.P., Mitjans, M. 2006. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. *Toxicology in Vitro* 20. 1066-1070.
121. Walum, E., Balls, M., Bianchi, V., Blaauboer, B., Bolcsfoldi, G., Guillouzo, A., Moore, G.A., Odland, L., Reinhardt, Ch., Spielmann, H. 1992. ECITTTS: An integrated approach to the application of *in vitro* test systems to the hazard assessment of chemicals. *Alternatives to Laboratory Animals* 20. 406–428.
122. Weil, C.S., Scala, R.A. 1971. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicology and Applied Pharmacology* 19. 276-360.
123. Wilson, S.L., Ahearne, M., Hopkinson, A. 2015. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology* 327. 32–46.
124. Ying, Y., Xingfen, Y., Wengai, Z., Jinheng, C., Jinyu, X., Guangyu, Y., Xiaohua, T., Xiaoping, X., Xikun, X., Junming, H., Xiang, G. 2010. Combined *In vitro* Tests as an Alternative to *In vivo* Eye Irritation Tests. *Alternatives to Laboratory Animals* 38. 303-314.
125. York, M., Lawrence, R.S., Gibson, G.B., 1982. An *in vitro* test for the assessment of eye irritancy in consumer products - preliminary findings. *International Journal of Cosmetic Science* 4. 223-234.



## 8 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### 8.1 Tézispontok magyarul

1. Elsőként végeztem el az alábbi növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározását *in vitro* HET-CAM teszttel:

- BUMPER 25 EC: irritatív,
- COMMAND 48 EC: irritatív,
- CYPERSKILL 25 EC: irritatív,
- DOMARK 10 EC: súlyosan irritatív,
- DUAL GOLD 960 EC: nem irritatív,
- GLIALKA STAR: irritatív,
- GLYPHOGAN 480 SL: irritatív,
- K-OBIOL 25 EC: súlyosan irritatív,
- LEOPARD 5 EC: irritatív,
- MECOMORN 750 SL: súlyosan irritatív,
- MIRAGE 45 EC: irritatív,
- MYSTIC 250 EC: irritatív,
- NIMROD 25 EC: irritatív,
- ORIUS 20 EW: súlyosan irritatív,
- PROPLANT: irritatív,
- PULSAR 40 SL: irritatív,
- RACER: irritatív,
- RELDAN 22 EC: irritatív,
- SCORE 250 EC: irritatív,
- SEKATOR: súlyosan irritatív,
- SYSTHANE DUPLO: súlyosan irritatív,
- TANDUS 200 EC: nem irritatív,
- TOPAS 100 EC: súlyosan irritatív,
- VERTIMEC 1,8 EC: irritatív,
- WARRANT 200 SL: súlyosan irritatív.

2. Elsőként végeztem el az alábbi növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározását *in vitro* ICE teszttel:

- BUMPER 25 EC: irritatív,
- COMMAND 48 EC: irritatív,
- CYPERSKILL 25 EC: irritatív,
- DOMARK 10 EC: nem irritatív,
- DUAL GOLD 960 EC: irritatív,
- GLIALKA STAR: irritatív,
- GLYPHOGAN 480 SL: súlyosan irritatív,
- K-OBIOL 25 EC: irritatív,
- LEOPARD 5 EC: irritatív,
- MECOMORN 750 SL: súlyosan irritatív,
- MIRAGE 45 EC: irritatív,
- MYSTIC 250 EC: irritatív,
- NIMROD 25 EC: irritatív,
- ORIUS 20 EW: irritatív,
- PROPLANT: nem irritatív,
- PULSAR 40 SL: nem irritatív,
- RACER: irritatív,
- RELDAN 22 EC: nem irritatív,
- SCORE 250 EC: nem irritatív,
- SEKATOR: súlyosan irritatív,
- SYSTHANE DUPLO: irritatív,
- TANDUS 200 EC: irritatív,
- TOPAS 100 EC: irritatív,
- VERTIMEC 1,8 EC: irritatív,
- WARRANT 200 SL: irritatív.

3. Elsőként végeztem el az alábbi növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározását MTT vizsgálattal:
- COMMAND 48 EC: irritatív,
  - CYPERSKILL 25 EC: irritatív,
  - K-OBIOL 25 EC: irritatív,
  - LEOPARD 5 EC: irritatív,
  - MIRAGE 45 EC: súlyosan irritatív,
  - MYSTIC 250 EC: súlyosan irritatív,
  - NIMROD 25 EC: irritatív,
  - PROPLANT: irritatív,
  - PULSAR 40 SL: nem irritatív,
  - RACER: irritatív,
  - RELDAN 22 EC: súlyosan irritatív,
  - SYSTHANE DUPLO: irritatív,
  - TANDUS 200 EC: irritatív,
  - TOPAS 100 EC: irritatív,
  - WARRANT 200 SL: irritatív.
4. Az *in vitro* tesztekől származó eredmények *in vivo* adatokkal történő összehasonlítása során az *in vitro* tesztek (HET-CAM, ICE, MTT) jelenlegi formájukban nem alkalmasak valamennyi irritációs kategória esetében az *in vivo* eredmények helyett a növényvédő szerek engedélyezési célú felhasználására.
5. Az általam végzett *in vitro* tesztek (HET-CAM, ICE, MTT) a növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározásában többlépcsős megközelítésben használhatóak, de növényvédő szerek esetében a HET-CAM teszt és az ICE teszt ajánlható leginkább a szemirritációs kategóriák megállapítására.
6. A növényvédő szerek szemirritációs potenciáljának meghatározása során az OECD 405-ös szabvány szerinti *in vivo* szemirritációs vizsgálat teljes kiváltásához egy *in vitro* tesztrendszer kidolgozása szükséges, melynek összeállításában a HET-CAM teszt és az ICE teszt alkalmazása javasolt.

## 8.2 Tézispontok angolul

1. I determined for the first time the eye irritation potential of the following pesticides with *in vitro* HET-CAM test:

- BUMPER 25 EC: irritant,
- COMMAND 48 EC: irritant,
- CYPERSKILL 25 EC: irritant,
- DOMARK 10 EC: severely irritant,
- DUAL GOLD 960 EC: not irritant,
- GLIALKA STAR: irritant,
- GLYPHOGAN 480 SL: irritant,
- K-OBIOL 25 EC: severely irritant,
- LEOPARD 5 EC: irritant,
- MECOMORN 750 SL: severely irritant,
- MIRAGE 45 EC: irritant,
- MYSTIC 250 EC: irritant,
- NIMROD 25 EC: irritant,
- ORIUS 20 EW: severely irritant,
- PROPLANT: irritant,
- PULSAR 40 SL: irritant,
- RACER: irritant,
- RELDAN 22 EC: irritant,
- SCORE 250 EC: irritant,
- SEKATOR: severely irritant,
- SYSTHANE DUPLO: severely irritant,
- TANDUS 200 EC: not irritant,
- TOPAS 100 EC: severely irritant,
- VERTIMEC 1,8 EC: irritant,
- WARRANT 200 SL: severely irritant.

2. I determined for the first time the eye irritation potential of the following pesticides with *in vitro* ICE test:

- BUMPER 25 EC: irritant,
- COMMAND 48 EC: irritant,
- CYPERSKILL 25 EC: irritant,
- DOMARK 10 EC: not irritant,
- DUAL GOLD 960 EC: irritant,
- GLIALKA STAR: irritant,
- GLYPHOGAN 480 SL: severely irritant,
- K-OBIOL 25 EC: irritant,
- LEOPARD 5 EC: irritant,
- MECOMORN 750 SL: severely irritant,
- MIRAGE 45 EC: irritant,
- MYSTIC 250 EC: irritant,
- NIMROD 25 EC: irritant,
- ORIUS 20 EW: irritant,
- PROPLANT: not irritant,
- PULSAR 40 SL: not irritant,
- RACER: irritant,
- RELDAN 22 EC: not irritant,
- SCORE 250 EC: not irritant,
- SEKATOR: severely irritant,
- SYSTHANE DUPLO: irritant,
- TANDUS 200 EC: irritant,
- TOPAS 100 EC: irritant,
- VERTIMEC 1,8 EC: irritant,
- WARRANT 200 SL: irritant.

3. I determined for the first time the eye irritation potential of the following pesticides with *in vitro* MTT examination:
  - COMMAND 48 EC: irritant,
  - CYPERSKILL 25 EC: irritant,
  - K-OBIOL 25 EC: irritant,
  - LEOPARD 5 EC: irritant,
  - MIRAGE 45 EC: severely irritant,
  - MYSTIC 250 EC: severely irritant,
  - NIMROD 25 EC: irritant,
  - PROPLANT: irritant,
  - PULSAR 40 SL: not irritant,
  - RACER: irritant,
  - RELDAN 22 EC: severely irritant,
  - SYSTHANE DUPLO: irritant,
  - TANDUS 200 EC: irritant,
  - TOPAS 100 EC: irritant,
  - WARRANT 200 SL: irritant.
  
4. Comparing the results of the *in vitro* tests with the *in vivo* data I realized that the *in vitro* tests (HET-CAM, ICE, MTT) in their current form are not suitable as a complete replacement for the Draize Rabbit Eye Test in the authorization procedure of plant protection products.
  
5. The performed *in vitro* tests (HET-CAM, ICE, MTT) can be used in a tiered approach for the determination of the eye irritation potential of pesticides, but for determining the eye irritation potential of plant protection products the HET-CAM and the ICE tests can be mostly recommended.
  
6. To entirely replace the OECD standard 405 *in vivo* eye irritation test for determining the eye irritation potential of plant protection products the development of a complex *in vitro* test system is needed, for which the use of HET-CAM and ICE tests is recommended.

## 9 MELLÉKLETEK

### HET-CAM teszt

19. táblázat: BUMPER 25 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	120	60		3,02	5,62	
2	117	55		3,06	5,74	
3	110	60		3,18	5,62	
4	99	60		3,3	5,62	
5	103	50		3,3	5,85	
6	100	53		3,35	5,78	
7	130	60		2,85	5,62	
8	90	61		3,51	5,6	
9	80	53		3,68	5,78	
10	100	57		3,35	5,69	
11	85	55		3,6	5,74	
12	125	60		2,93	5,62	
13	90	52		3,51	5,81	
14	80	60		3,68	5,62	
15	89	56		3,53	5,72	
16	85	55		3,6	5,74	
17	81	60		3,67	5,62	
18	90	54		3,51	5,76	
19	95	61		3,43	5,6	
20	86			3,58		
21	80			3,68		
22	89	58		3,53	5,67	
23	81	57		3,67	5,69	
24	91			3,5		

20. táblázat: COMMAND 48 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		19			6,58	
2		14			6,7	
3		19			6,58	
4		21			6,53	
5		21			6,53	
6		21			6,53	
7		22			6,51	
8		19			6,58	
9		27			6,39	
10		16			6,65	
11		22			6,51	
12		23			6,49	
13		17			6,63	
14		20			6,55	
15		23			6,49	
16		20			6,55	
17		21			6,53	
18		16			6,65	
19		17			6,63	
20		24			6,46	
21		26			6,42	
22		18			6,6	
23		27			6,39	
24		20			6,55	



21. táblázat: CYPERKILL 25 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		6			6,88	
2		7			6,86	
3		10			6,79	
4		11			6,76	
5		12			6,74	
6		14			6,69	
7		14			6,69	
8		17			6,58	
9		22			6,51	
10		14			6,69	
11		15			6,67	
12		17			6,58	
13		14			6,69	
14		13			6,72	
15		11			6,76	
16		13			6,72	
17		17			6,58	
18		14			6,69	
19		13			6,72	
20		14			6,69	
21		17			6,58	
22		7			6,86	
23		11			6,76	
24		17			6,58	

22. táblázat: DOMARK 10 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	100	30		3,35	6,32	
2		45			5,97	
3	95	20		3,43	6,55	
4	100	25		3,35	6,44	
5	90	30		3,51	6,32	
6	110			3,18		
7	100	33		3,35	6,25	
8	105	42		3,26	6,04	
9	110	42		3,18	6,04	
10	92	30		4,38	6,32	
11	98	46		3,38	5,95	
12	107	35		3,23	6,2	
13		35			6,2	
14		38			6,14	
15		20			6,55	
16		25			6,44	
17		43			6,02	
18		32			6,28	
19		25			6,44	
20		42			6,04	
21		30			6,32	
22		35			6,2	
23		41			6,07	
24		33			6,25	

23. táblázat: GLIALKA STAR HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		35			6,2	
2		20			6,55	
3		12			6,74	
4		16			6,65	
5		15			6,67	
6		14			6,69	
7		22			6,51	
8		12			6,74	
9		10			6,79	
10		15			6,67	
11		17			6,62	
12		16			6,65	
13		13			6,72	
14		16			6,65	
15		13			6,72	
16		10			6,79	
17		9			6,81	
18		10			6,79	
19		14			6,69	
20		15			6,67	
21		16			6,65	
22		10			6,79	
23		11			6,76	
24		20			6,55	

24. táblázat: GLYPHOGAN 480 SL HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		20			6,55	
2		15			6,67	
3		25			6,44	
4		15			6,67	
5		25			6,44	
6		17			6,63	
7		25			6,44	
8		25			6,44	
9		20			6,55	
10		20			6,55	
11		20			6,55	
12		23			6,49	
13		15			6,67	
14		20			6,55	
15		15			6,67	
16		25			6,44	
17		20			6,55	
18		18			6,6	
19		22			6,51	
20		20			6,55	
21		25			6,44	
22		15			6,67	
23		20			6,55	
24		21			6,53	

25. táblázat: K-OBIOL 25 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	47	19		4,23	6,58	
2	120	20		3,02	6,55	
3	60	17		4,02	6,63	
4	50	20		4,18	6,55	
5	48	23		4,22	6,49	
6	38	13		4,38	6,72	
7	55	13		4,1	6,72	
8	35	10		4,43	6,79	
9		15			6,67	
10		25			6,44	
11		28			6,37	
12		12			6,74	
13		15			6,67	
14		12			6,74	
15		17			6,63	
16		8			6,83	
17		7			6,86	
18		10			6,79	
19		20			6,67	
20		18			6,74	
21		15			6,63	
22		12			6,83	
23		17			6,86	
24		20			6,79	

26. táblázat: LEOPARD 5 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		170			3,06	
2		150			3,52	
3		140			3,76	
4		220			1,89	
5		170			3,06	
6		200			2,36	
7		220			1,89	
8		210			2,12	
9		230			1,66	
10		250			1,19	
11		245			1,30	
12		200			2,36	
13		220			1,89	
14		220			1,89	
15		180			2,82	
16		190			2,59	
17		195			2,47	
18		215			2	
19		205			2,24	
20		190			2,59	
21		185			2,7	
22		180			2,82	
23		205			2,24	
24		210			2,12	

27. táblázat: MECOMORN 750 SL HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	100	7		3,35	6,86	
2	120	5		3,02	6,9	
3	150	3		2,52	6,95	
4	96	4		3,42	6,93	
5	120	3		3,02	6,95	
6	160	3		2,35	6,95	
7	65	3		3,93	6,95	
8	140	3		2,68	6,95	
9	120	4		3,02	6,93	
10	127	4		2,9	6,93	
11	105	5		3,26	6,9	
12	98	5		3,38	6,9	
13	65	5		3,93	6,9	
14	30	2		4,52	6,97	
15	32	3		4,48	6,95	
16	38	4		4,38	6,93	
17	36	2		4,42	6,97	
18	40	6		4,35	6,88	
19	38	3		4,38	6,95	
20	42	4		4,32	6,93	
21	34	4		4,45	6,93	
22	38	5		4,38	6,9	
23		4			6,93	
24		4			6,93	

28. táblázat: MIRAGE 45 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		89			4,95	
2		89			4,95	
3		86			5,01	
4		93			4,85	
5		82			5,11	
6		94			4,83	
7		97			4,76	
8		91			4,9	
9		89			4,95	
10		86			5,01	
11		93			4,85	
12		94			4,83	
13		97			4,76	
14		93			4,85	
15		86			5,01	
16		91			4,9	
17		89			4,95	
18		95			4,8	
19		97			4,76	
20		97			4,76	
21		91			4,9	
22		89			4,95	
23		91			4,9	
24		90			4,92	



29. táblázat: MYSTIC 250 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	120	13		3,02	6,72	
2	150	17		2,52	6,63	
3	155	20		2,43	6,56	
4	180	18		2,02	6,6	
5	160	19		2,35	6,58	
6	75	22		3,77	6,51	
7	180	13		2,02	6,72	
8	145	28		2,6	6,37	
9	95	25		3,43	6,44	
10	110	15		3,18	6,67	
11	140	17		3,12	6,63	
12	100	15		3,35	6,67	
13	100	16		3,35	6,65	
14	120	21		3,02	6,53	
15	210	25		1,52	6,44	
16	150	13		2,52	6,72	
17	150	19		2,52	6,58	
18		22			6,51	
19		24			6,46	
20		25			6,44	
21		30			6,32	
22		35			6,2	
23		14			6,69	
24		15			6,67	

30. táblázat: NIMROD 25 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		3			6,93	
2		15			6,65	
3		13			6,72	
4		11			6,72	
5		13			6,72	
6		10			6,79	
7		10			6,79	
8		12			6,72	
9		9			6,79	
10		10			6,79	
11		9			6,79	
12		11			6,72	
13		13			6,72	
14		15			6,65	
15		12			6,72	
16		9			6,79	
17		11			6,72	
18		10			6,79	
19		5			6,91	
20		11			6,72	
21		7			6,86	
22		13			6,72	
23		10			6,79	
24		15			6,65	

31. táblázat: ORIUS 20 EW HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	40	30		4,35	6,32	
2	50	28		4,18	6,37	
3	50	35		4,18	6,2	
4		37			6,16	
5	28	20		4,55	6,56	
6		35			6,2	
7	28	34		4,55	6,23	
8	35	27		4,43	6,39	
9	27	33		4,57	6,25	
10		25			6,44	
11		25			6,44	
12		35			6,2	
13		35			6,2	
14		33			6,25	
15		37			6,16	
16		23			6,48	
17		33			6,25	
18		30			6,32	
19		35			6,2	
20		33			6,25	
21		30			6,32	
22		25			6,44	
23		35			6,2	
24		28			6,37	

32. táblázat: PROPLANT HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	175	20		2,1	6,55	
2	150	30		2,52	6,32	
3	205	30		1,6	6,32	
4	130	35		2,85	6,2	
5	140	15		2,68	6,67	
6	170	29		2,2	6,35	
7	140	24		2,68	6,46	
8	190	28		1,85	6,37	
9		34			6,23	
10		35			6,2	
11		35			6,2	
12		29			6,35	
13		26			6,42	
14		27			6,39	
15		33			6,25	
16		32			6,28	
17		30			6,32	
18		34			6,23	
19		25			6,44	
20		20			6,55	
21		32			6,28	
22		28			6,37	
23		29			6,35	
24		31			6,3	

33. táblázat: PULSAR 40 SL HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		90			4,92	
2		93			4,85	
3		87			4,99	
4		78			5,2	
5		92			4,88	
6		70			5,39	
7		64			5,53	
8		103			4,62	
9		75			5,27	
10		99			4,71	
11		89			4,95	
12		97			4,76	
13		101			4,66	
14		97			4,76	
15		87			4,99	
16		93			4,85	
17		85			5,04	
18		100			4,69	
19		94			4,83	
20		90			4,92	
21		101			4,66	
22		93			4,85	
23		97			4,76	
24		94			4,83	

34. táblázat: RACER HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének  
alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	40	30		4,35	6,32	
2	50	28		4,18	6,37	
3	50	35		4,18	6,2	
4		37			6,16	
5	28	20		4,55	6,56	
6		35			6,2	
7	28	34		4,55	6,23	
8	35	27		4,43	6,39	
9	27	33		4,57	6,25	
10		25			6,44	
11		25			6,44	
12		35			6,2	
13		35			6,2	
14		33			6,25	
15		37			6,16	
16		23			6,48	
17		33			6,25	
18		30			6,32	
19		35			6,2	
20		33			6,25	
21		30			6,32	
22		25			6,44	
23		35			6,2	
24		28			6,37	

35. táblázat: RELDAN 22 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	145	38		2,6	6,13	
2	135	40		2,85	6,09	
3	120	50		3,01	5,85	
4	130	68		2,85	5,43	
5	140	55		2,68	5,74	
6	147	44		2,56	5,99	
7	130	45		2,85	5,97	
8	99	55		3,66	5,74	
9	117	47		3,06	5,92	
10	140	65		2,68	5,5	
11	135	55		2,76	5,74	
12	121	40		3	6,09	
13	95	30		3,43	6,32	
14	113	53		3,13	5,78	
15	130	50		2,85	5,85	
16	120	63		3,01	5,55	
17	105	39		3,26	6,11	
18	140	45		2,68	5,97	
19	120	55		3,01	5,74	
20	110	59		3,18	5,64	
21	105	37		3,26	6,16	
22	118	43		3,05	6,02	
23	125	50		2,93	5,85	
24	117	65		3,06	5,5	

36. táblázat: SCORE 250 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		35			6,16	
2		45			5,95	
3		33			6,23	
4		30			6,3	
5		37			6,16	
6		25			6,44	
7		28			6,37	
8		38			6,09	
9		37			6,16	
10		43			6,02	
11		32			6,23	
12		35			6,16	
13		40			6,09	
14		34			6,23	
15		36			6,16	
16		33			6,23	
17		30			6,3	
18		35			6,16	
19		28			6,37	
20		38			6,09	
21		37			6,16	
22		43			6,02	
23		29			6,35	
24		35			6,16	



37. táblázat: SEKATOR HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	160	20		2,35	6,56	
2	140	35		2,68	6,2	
3	75	26		3,76	6,41	
4	53	46		4,13	5,95	
5	85	30		3,6	6,32	
6		35			6,2	
7		35			6,2	
8		46			5,95	
9		23			6,49	
10		30			6,32	
11		28			6,37	
12		27			6,39	
13		35			6,2	
14		35			6,2	
15		26			6,41	
16		42			6,04	
17		40			6,09	
18		23			6,49	
19		35			6,2	
20		30			6,32	
21		42			6,04	
22		40			6,09	
23		25			6,44	
24		35			6,2	

38. táblázat: SYSTHANE DUPLO HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	45	15		4,26	6,67	
2	40	12		4,35	6,74	
3	50	10		4,18	6,79	
4	60	16		4,02	6,65	
5	75	16		3,76	6,65	
6	70	18		3,85	6,6	
7	55	17		4,1	6,63	
8	45	15		4,26	6,67	
9	50	15		4,18	6,67	
10	62	17		3,98	6,62	
11		13			6,72	
12		15			6,67	
13		15			6,67	
14		17			6,62	
15		16			6,65	
16		15			6,67	
17		15			6,67	
18		14			6,69	
19		17			6,62	
20		16			6,65	
21		15			6,67	
22		16			6,65	
23		13			6,72	
24		14			6,69	

39. táblázat: TOPAS 100 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	50	6		4,18	6,88	
2	47	5		4,23	6,9	
3	49	5		4,2	6,9	
4	85	6		3,6	6,88	
5	25	5		4,6	6,9	
6	52	6		4,15	6,88	
7	80	4		3,65	6,93	
8	118	6		3,2	6,88	
9	40	6		4,35	6,88	
10	120	7		3,0	6,86	
11	35	5		4,4	6,9	
12	110	18		3,15	6,6	
13	33	4		4,45	6,93	
14	75	5		3,75	6,9	
15	95	7		3,4	6,86	
16	37	8		4,4	6,83	
17	60	7		4,08	6,86	
18	80	6		3,65	6,88	
19		7			6,86	
20		8			6,83	
21		5			6,9	
22		7			6,86	
23		6			6,88	
24		8			6,83	

40. táblázat: VERTIMEC 1,8 EC HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1		35			6,2	
2		40			6,09	
3		30			6,32	
4		25			6,44	
5		15			6,67	
6		35			6,2	
7		30			6,32	
8		20			6,55	
9		10			6,79	
10		17			6,62	
11		10			6,79	
12		30			6,32	
13		20			6,55	
14		35			6,2	
15		25			6,44	
16		30			6,32	
17		25			6,44	
18		20			6,55	
19		30			6,32	
20		15			6,67	
21		10			6,79	
22		40			6,09	
23		20			6,55	
24		20			6,55	

41. táblázat: WARRANT 200 SL HET-CAM teszt alapján meghatározott irritációs indexének alapadatai

Tojás	Vérzés	Lízis	Koaguláció	Részindex 1	Részindex 2	Részindex 3
1	40	5		4,35	6,9	
2	35	13		4,43	6,72	
3	32	43		4,48	6,02	
4	44	5		4,28	6,9	
5	49	17		4,2	6,63	
6	60	9		4,02	6,81	
7	57	10		4,01	6,79	
8	60	9		4,02	6,81	
9	70	11		3,85	6,76	
10	75	21		3,77	6,53	
11		8			6,83	
12		9			6,81	
13		10			6,79	
14		6			6,88	
15		5			6,9	
16		7			6,86	
17		8			6,83	
18		12			6,74	
19		10			6,79	
20		11			6,76	
21		10			6,79	
22		10			6,79	
23		17			6,63	
24		6			6,88	

## ICE teszt

42. táblázat: BUMPER 25 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	0%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	8%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1,2	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	0,7	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	3xII	

43. táblázat: COMMAND 48 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	3%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	9%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1,67	III
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,83	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xII, 1xIII, 1xIV	

44. táblázat: CYPERKILL 25 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	5%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	9%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1,33	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,17	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	

45. táblázat: DOMARK 10 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	1%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	2%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,3	I
A fluoreszcein-megtartás középértéke	0,7	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xI, 1xII	

46. táblázat: DUAL GOLD 960 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	4%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	2,3	III
A fluoreszcein-megtartás középértéke	1,5	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	

47. táblázat: GLIALKA STAR ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	3%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,67	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	



48. táblázat: GLYPHOGAN 480 SL ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	10%	II
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	12%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	3,2	IV
A fluoreszcein-megtartás középértéke	3,0	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xII, 2xIV	

49. táblázat: K-OBIOL 25 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	5%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	9%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	2,5	III
A fluoreszcein-megtartás középértéke	3	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xII, 1xIII, 1xIV	

50. táblázat: LEOPARD 5 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,67	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,50	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	

51. táblázat: MECOMORN 750 SL ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	23%	III
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	46%	IV
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	4	IV
A fluoreszcein-megtartás középértéke	3	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	3xIV	

52. táblázat: MIRAGE 45 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	8%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,5	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	

53. táblázat: MYSTIC 250 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	12%	II
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	15%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	2,67	IV
A fluoreszcein-megtartás középértéke	1	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIV	

54. táblázat: NIMROD 25 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	2%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1,67	III
A fluoreszcein-megtartás középértéke	1	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xI, 1xII, 1xIII	

55. táblázat: ORIUS 20 EW ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	4%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	3,3	IV
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,5	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xII, 1xIII, 1xIV	

56. táblázat: PROPLANT ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	2%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,8	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	1	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xI, 2xII	

57. táblázat: PULSAR 40 SL ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	3%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,5	I
A fluoreszcein-megtartás középértéke	0,33	I
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	3xI	

58. táblázat: RACER ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	4%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	1,67	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	

59. táblázat: RELDAN 22 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	2%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	2%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,83	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	0,83	II
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xI, 2xII	

60. táblázat: SCORE 250 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	3%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	4%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,5	I
A fluoreszcein-megtartás középértéke	0,33	I
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	3xI	

61. táblázat SEKATOR ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	4%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	14%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	2,7	IV
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,8	IV
Egyéb megfigyelések	A felhám súlyos fellazulása mindhárom szaruhártya esetén	
A három végpont kombinációja	1xII, 2xIV	

62. táblázat SYSTHANE DUPLO ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	1%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	6%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,7	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,8	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIV	

63. táblázat TANDUS 200 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	7%	II
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	9%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	1,33	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,33	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	2xII, 1xIII	



64. táblázat TOPAS 100 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	1%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	2%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,67	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	3	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xI, 1xII, 1xIV	

65. táblázat VERTIMEC 1,8 EC ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	3%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	17%	II
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	2	III
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2,8	IV
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xII, 1xIII, 1xIV	

66. táblázat WARRANT 200 SL ICE teszt alapján történő irritációs besorolása

Megfigyelés	Érték	Végpont
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 75. percig	3%	I
A szaruhártya-duzzadás középértékének maximuma a 240. percig	4%	I
A szaruhártyahomály középértékének maximuma	0,83	II
A fluoreszcein-megtartás középértéke	2	III
Egyéb megfigyelések	Nincs	
A három végpont kombinációja	1xI, 1xII, 1xIII	

**MTT vizsgálat**

67. táblázat: A sejtpusztulás mértéke adott növényvédő szerrel történt kezelés után

Vizsgált anyag	Hígítás mértéke				
	20x	320x	640x	1280x	2560x
<b>COMMAND 48 EC</b>	92,69%	90,14%	8,3%	0%	0%
<b>CYPERKILL 25 EC</b>	95,2%	94,93%	0%	0%	0%
<b>K-OBIOL 25 EC</b>	94,83%	94,26%	49,21%	1,52%	0%
<b>LEOPARD 5 EC</b>	92,95%	90,72%	16,5%	0%	0%
<b>MIRAGE 45 EC</b>	93,34%	91,79%	91,74%	92,24%	16,24%
<b>MYSTIC 250 EC</b>	90,61%	88,88%	89,02%	89,26%	23,05%
<b>NIMROD 25 EC</b>	93,98%	93,23%	0,79%	0%	0%
<b>PROPLANT</b>	86,83%	25,78%	0%	0%	0%
<b>PULSAR 40 SL</b>	3,08%	0%	0%	0%	0%
<b>RACER</b>	92,07%	93,51%	8,18%	0%	0%
<b>RELDAN 22 EC</b>	94,01%	89,95%	91,69%	74,07%	0%
<b>SYSTHANE DUPLO</b>	92,58%	89,76%	29,02%	0%	0%
<b>TANDUS 200 EC</b>	93,87%	32,07%	14,4%	2,51%	2,63%
<b>TOPAS 100 EC</b>	94,44%	85,94%	0%	0%	0%
<b>WARRANT 200 SL</b>	93,9%	0%	0%	0%	0%