

The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits From development to implementation: 'The long and winding road' – Menk K. Prinsen

Door Pascale L.P. van Loo*

Op 3 oktober jl. promoveerde Dr. Menk Prinsen op zijn 30-jaar durende onderzoek naar de geïsoleerde kippenoogtest als alternatief voor de bekende Draize test in konijnen. Het proefschrift beschrijft de lange weg die is afgelegd van ontwikkeling tot implementatie en acceptatie van de test en de wetenschappelijke, praktische en wetstechnische hordes die hierbij zijn overwonnen.



Afbeelding 1: Advertentie van Spira (www.onegreenplanet.org)

Met de sterke opkomst van de chemische industrie in de 20ste eeuw werd duidelijk dat de omstandigheden op de werkplek nadelige effecten op veiligheid en gezondheid van de mens kon hebben. Kortdurende en langdurige blootstelling aan verschillende chemische stoffen veroorzaakten een scala aan ziektes, variërend van milde niet levensbedreigende schade tot levensbedreigende ziektes als kanker. Naarmate werknemers en consumenten mondiger werden, nam de noodzaak toe om mogelijke risico's van blootstelling aan chemische stoffen te bepalen, de mensen vooraf te waarschuwen voor de gevaren en ze te beschermen. Een van de vele risico's bij het omgaan met (gevaarlijke) stoffen is het in de ogen krijgen van het product. Al in 1961 schreef de Amerikaanse toelatingsautoriteit de 'Food and Drug Administration' (FDA) een test voor met konijnen om stoffen te testen op hun oog irriterende eigenschappen (de zogenaamde Draize test). Het controversiële karakter van de test werd pas bij het grote publiek bekend nadat Henry Spira, lid en oprichter van een dierenrechtenorganisatie, een paginagrote advertentie in de New York Times plaatste met de kop "Hoeveel konijnen maakt Revlon blind omwille van schoonheid" (afb. 1). Binnen een jaar werd

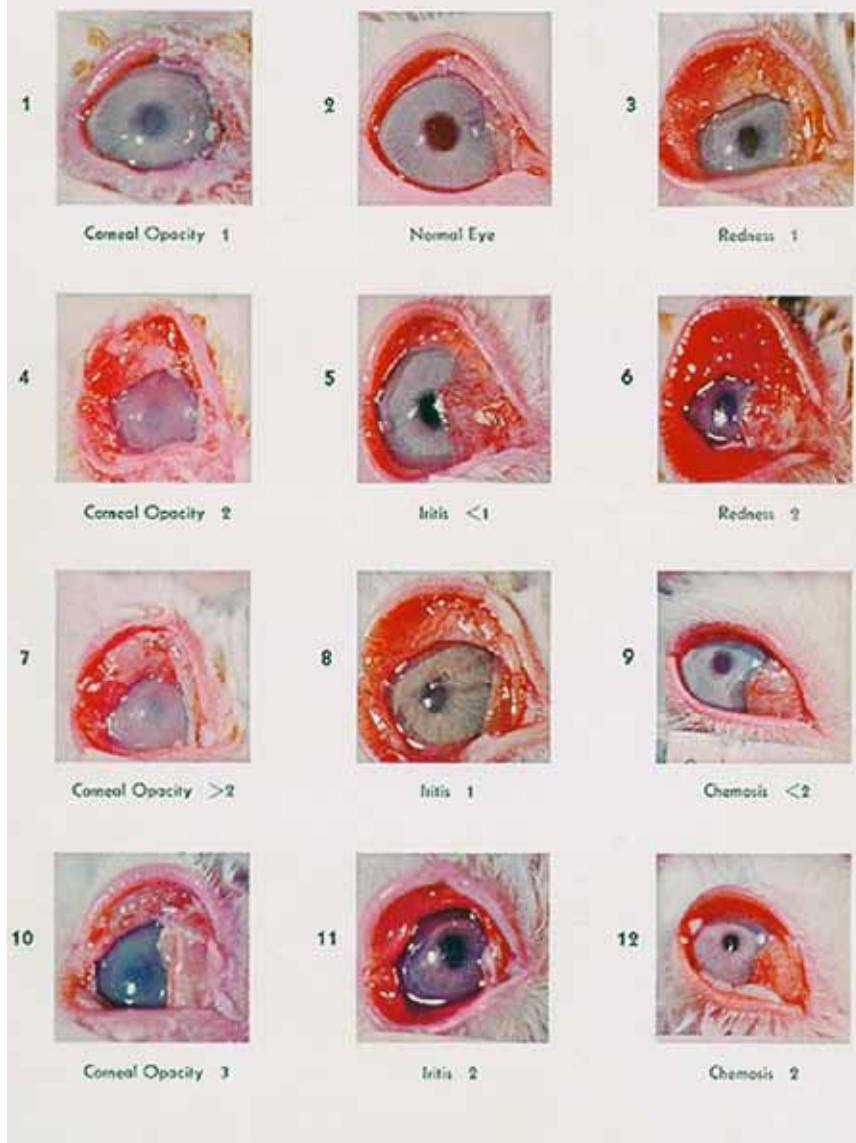
geld gedoneerd door diverse cosmetische bedrijven en werd een centrum voor het ontwikkelen van alternatieven voor proefdier testen opgezet. De ontwikkeling en validatie van alternatieven voor de oogirritatie test in konijnen, die als een relatief simpele test werd beschouwd, bleek een taai en langdurig proces van vele jaren te worden. Sterker nog, de test is nu, na meer dan 30 jaar nog steeds niet volledig vervangen.

Bright eyes, burning like fire

Al in 1944 publiceerde de Amerikaan John Draize een artikel met daarin een beschrijving van onderzoeksmethoden voor het vaststellen van toxiciteit en irritatie van stoffen die op huid en »

Plate 1
Some Typical Scores for Eye Irritancy

Afbeelding 2:
FDA richtlijn voor
het scoren van
oogafwijkingen



slijmvliezen worden toegediend, waaronder de oogirritatie test. Ruim zeventig jaar later is zijn naam nog steeds onlosmakelijk verbonden met deze zeer omstreden test. De uitvoering van de test is vrij simpel en rechttoe rechtaan. De oogleden van het oog worden opgehouden en de proefstof wordt in het onderste, uitgetrokken oogzakje gedeponneerd. Vervolgens worden de oogleden gedurende één seconde gesloten waarna het dier losgelaten wordt. Het andere oog blijft onbehandeld en dient ter controle. Het konijn wordt teruggezet in zijn kooi en is vrij om de proefstof uit zijn oog te verwijderen. De ogen worden tot 72 uur na blootstelling beoordeeld volgens een score schaal en tot drie weken na blootstelling vervolgd om vast te stellen of deze

effecten reversibel (herstellen) of irreversibel zijn. Al bij het eerste gebruik als regulatoire test werd erkend dat het subjectief scoren van de oogeffecten problematisch was. Om het scoren te standaardiseren werd in 1964 door de FDA een gids met foto's uitgebracht die de onderzoeker kon gebruiken bij het scoren van effecten, zoals opaciteit (troebeling) van de cornea, roodheid en zwelling van de oogleden (afb. 2). Internationaal adopteerde de OESO (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) de Draize oogirritatie test in 1981, gevolgd door de Europese Unie in 1984. Sindsdien zijn de richtlijnen verschillende keren aangepast, maar de praktische uitvoering van de test bleef onveranderd. De systemen voor de classificatie en het labelen van de stoffen op basis van de waargenomen oogeffecten waren in verschillende internationale richtlijnen echter zeer verschillend. Dit was zeer nadelig voor het valideren van de alternatieve methoden. Daarom was het implementeren van een geharmoniseerd classificatie systeem in 2007 door de UN (United Nations) een aanzienlijke verbetering.

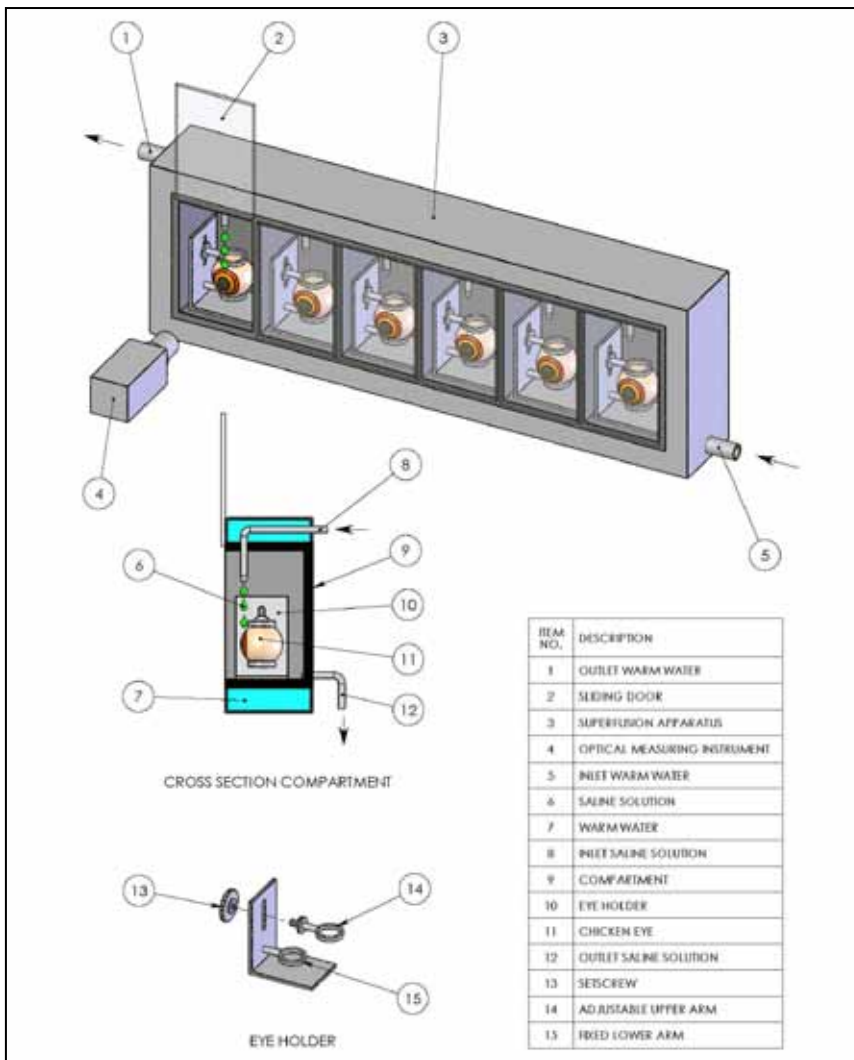
Oog om oog

De eerste aanpassingen in de richtlijnen betroffen vooral een vermindering van het aantal dieren per test en maatregelen om onnodig leed te voorkomen, zoals uitsluiting van stoffen met extreme pH's, huid corrosieve stoffen en een gefaseerde start. Pas in een veel later stadium werden maatregelen genomen om bepaalde onderdelen van de test, die zeer veel leed kunnen veroorzaken, te verbeteren. Het werd bijvoorbeeld pas in 2002 toegestaan om proefstof (vooral vaste stoffen), die tot 24 uur na blootstelling nog in het oogzakje aanwezig kon zijn, na één uur in plaats van 24 uur te verwijderen. In 2012 werd de OECD richtlijn aangepast met duidelijke aanwijzingen voor lokale en systemische pijnverlichting voor de konijnen. In 1981 al werd een methode met geïsoleerde konijnenogen gepubliceerd, om ernstig irriterende stoffen te identificeren. Uit wetenschappelijk oogpunt is het gebruik van geïsoleerde ogen zeer aantrekkelijk, immers er wordt een oog (*ex vivo*) voor een oog (*in vivo*) gebruikt en daarbij worden effecten (parameters) gemeten die direct vertaald kunnen worden naar die van het dier, maar ook naar die van de mens. In de periode 1982-1985 vond de implementatie en validatie van de Isolated Rabbit Eye (IRE) plaats, waarbij 34 stoffen, die net daarvoor waren onderzocht in de Draize test, werden getest op de controle ogen van diezelfde konijnen. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat de IRE een gevoelig en bruikbaar test-systeem was voor het identificeren van oog irriterende stoffen. Niet irriterende stoffen in de IRE, waarbij frequent oogcontact werd verwacht, zouden dan alsnog in de Draize test moeten worden getest.

Kip, ik heb je...

Een belangrijke mijlpaal in de ontwikkeling van de geïsoleerde ogen test was het gebruik van slachtdieren als oog donor. Hoewel in die tijd de meeste onderzoekslaboratoria voldoende, al eerder gebruikte, konijnen waren om de test uit voeren, werd het hergebruik van proefdieren nog steeds als tekortkoming van de methode gezien. Daarom werd de mogelijkheden om ogen van slachtdieren zoals het rund, het varken en de kip te verzamelen en gebruiken, onderzocht. Omdat de geïsoleerde ogentest vergelijkbare resultaten moest leveren t.o.v. de *in vivo* test in konijnen om te worden geaccepteerd als alternatief ('gouden standaard'), viel de keuze op het kippenoog, en niet op de fysiologisch meer op het mensenoog gelijkende varkensoog. Het verkrijgen van kippenogen bleek relatief eenvoudig door de koppen te verzamelen nadat de kippen waren verdoofd aan de slachtlijn. De koppen werden vervoerd naar het laboratorium in plastic dozen om daar de ogen uit de koppen te ontleiden en in het superfusie apparaat te plaatsen. Dit alles gebeurde binnen twee uur na het verzamelen van de koppen aan de slachtlijn. De geschiktheid van het kippenoog werd vastgesteld met 21 referentiestoffen (van niet irriteren tot ernstig irriterend) die al eerder in een validatie studie van de IRE waren getest. Een belangrijke ontwikkeling daarbij was het opstellen van de criteria voor het scoren van de effecten »

Afbeelding 3:
Schematische
presentatie van het
superfusie appa-
raat en oog-houder
(TNO)



en een voorspellingsschema (Prediction Model = PM) voor classificatie op basis van het toen geldende EC systeem voor labeling en classificatie van stoffen.

Pompen of verzuipen

In toenemende mate werd de geïsoleerde kippenoog test (ICE, afb. 3) ook gebruikt als een op zichzelf staande test zonder vervolg door een *in vivo* test. Vooral bedrijven die een veiligheidsprogramma hanteerden waarin geen dier testen meer voorkwamen, waren een enorme stimulans voor de verdere toepassing en ontwikkeling van de ICE. De eerste internationale validatiestudies gaven echter zeer teleurstellende resultaten als gevolg van slecht overeenkomende classificatie scores tussen verschillende richtlijnen, maar aan de tekortkomingen van de Draize test als 'gouden' standaard en mogelijke consequenties daarvan bij de validatie van alternatieven, werd weinig aandacht besteed. Het betreft dan variatie in resultaten als gevolg van verschillen tussen laboratoria en binnen laboratoria over de tijd, maar ook zaken zoals een niet gedefinieerde of gestandaardiseerde blootstellingsduur aan een stof. Doordat een stof in het uitgetrokken oogzakje wordt gedeponeerd waarna het konijn wordt teruggezet in zijn kooi, kan de blootstelling variëren van minuten (bij vloeistoffen) tot uren (24 uur bij poeders), omdat resten van stoffen pas 24 uur na blootstelling verwijderd mogen worden. Deze ongedefinieerde blootstelling is tegenstrijdig met de basis principes van goed toxiciteitsonderzoek; alles valt of staat bij een goed gedefinieerde en gecontroleerde blootstelling. Daarbij,

dit type blootstelling (grote hoeveelheid stof in een oogzakje) is nauwelijks vergelijkbaar met een humane blootstelling. Een ander onderbelichte factor vormde de verzorging van het oog na blootstelling. De opsluiting van bijvoorbeeld vaste stoffen in het oogzakje kan leiden tot een volledige afsluiting van het oog door verkleving van de oogleden vanwege de productie van ontstekings-eiwitten, die een afsluitende korst vormen. De ervaring was dat, als het oog en de oogleden niet regelmatig werden verzorgd (schoonmaken/spoelen met een fysiologische zoutoplossing), een irriterende stof gemakkelijk kon veranderen in een ernstig irriterende stof, met bovendien risico op een secundaire ooginfectie. Een dergelijke, in wezen, minimale verzorging van het blootgestelde oog en de oogleden vond in het algemeen nooit plaats en werd ook niet genoemd in de richtlijnen. Deze omstandigheden zijn ondenkbaar in het geval van humane blootstelling aan irriterende stoffen. Deze gevallen van misinterpretatie van effecten, waarvoor al in de eerste OECD richtlijn voor oogirritatie werd gewaarschuwd, werden niet in overweging genomen bij de validatie van alternatieven, ondanks dat er voldoende aanwijzingen waren voor zo'n infectie in de gebruikte *in vivo* data set.

De conclusie in 2004 was dat na 18 jaar van validatie zonder daadwerkelijk succes, het verder ontwikkelen en valideren van alternatieven zinloos zou zijn als men gebruik bleef maken van de bestaande *in vivo* data of nieuw te genereren *in vivo* data met de bestaande richtlijn. Een meer-sporen beleid werd aanbevolen, waarbij de bestaande OECD richtlijn voor oogirritatie de blootstelling aan vloeibare en vaste stoffen zou standaardiseren en het gebruik van alternatieven voor ernstige oogirritatie zou opnemen (dit werd overigens al toegestaan binnen de EU). Parallel daaraan zouden de *in vitro* methoden meer op mechanistische grondslag ontwikkeld en geoptimaliseerd moeten worden.

De aanhouder wint

In 2009 kwam er eindelijk een doorbraak door de acceptatie van de ICE en BCOP (Bovine Cornea Opacity and (fluoresceïne) Penetration test) door de OECD als richtlijn voor het screenen van stoffen op ernstige oogirritatie. Ondanks het feit dat er een aanzienlijk percentage vals-negatieven was (niet ernstig irriterend in de *in vitro* test maar ernstig irriterend in de *in vivo* test) werd dit niet als een belemmering gezien omdat de niet ernstig irriterende stoffen *in vitro* altijd nog onderzocht moesten worden in de *in vivo* test. Veel van de zogenaamde vals-negatieven in de ICE test laten *in vivo* resultaten zien die verklaard kunnen worden met de beschreven tekortkomingen van de Draize test. In 2011 volgde een nieuw initiatief om ook het screenen van niet-irriterende stoffen door de BCOP op te nemen in de OECD richtlijn van 2009. De ICE werd niet geschikt geacht, voornamelijk omdat een tweetal stoffen die ernstig irriterend waren in de *in vivo* test niet irriterend waren in de ICE. Naar aanleiding daarvan werd door de auteur van het proefschrift de gebruikte dataset voorzien van inhoudelijk commentaar met betrekking tot tekortkomingen of bijzonderheden in de *in vivo* data en heeft hij met succes verzocht om heroverweging van de ICE. In september 2013 werd het screenen van niet-irriterend stoffen door de ICE officieel toegevoegd aan de OECD richtlijn van de ICE. Dit was een groot succes voor de methode en voor de 3V's in het algemeen, maar betekende nog wel dat stoffen die irriterend waren in de ICE (of BCOP) nog steeds *in vivo* getest moeten worden. In de praktijk blijkt dat de branche die het meest te maken heeft met irriterende producten, namelijk die van de huishoudelijke- en industriële schoonmaakmiddelen, om te voldoen aan de regelgeving, al een dierproefvrije strategie toepast bij oogirritatieonderzoek. Het delen van informatie over deze dierproefvrije strategie met andere branches en industrieën is één van de aanbevelingen in het proefschrift.

** Voor het schrijven van dit boekverslag is dankbaar gebruik gemaakt van de Nederlandse samenvatting in het proefschrift van Dr. Prinsen.*

«