آزمون‌های جایگزین آزمون‌های جانوری

هدف اصلی از علم سم شناسی، حفاظت انسان در برابر اثرات نامساعد انواع مختلف مواد شیمیایی مانند داروها، مواد آرایشی و بهداشتی، مواد شیمیایی صنعتی و زراعی است. در دنیای امروز شیمی، اهمیت ارزیابی سمیت موادشیمیایی به طور مستمر افزایش می‌یابد. بیش از ۱۰۰،۰۰۰ نوع ماده شیمیایی در صنعت استفاده می‌گردد و تخمین زده می‌شود سالانه حدود ۲۰۰۰ نوع ماده شیمیایی جدید وارد بازار شود. بر اساس مقررات اتحادیه اروپا، هر ماده شیمیایی جدید در بازار می-بایست، از لحاظ انواع مختلف سم موردآزمایش قرار گیرد. این اثرات می‌تواند در اثر مصرف به طور اتفاقی و غیر مترقبه و یا عمداً و مستقیم به صورت داروها و مواد آرایشی و بهداشتی باشد.

از سال‌های گذشته، جهت ارزیابی سمیت و حساسیت‌های مواد شیمیایی، آزمایشات مختلفی روی جانوران (In Vivo) انجام می‌گرفت. این آزمایشات از چندین سال پیش در اکثر کشورها ممنوع گردیده است، ولی با وجود تلاش‌های فراوان مرکز اروپایی معتبر سازی روش‌های جایگزین آزمایشات جانوری (ECVAM)،[1] انجمن‌های بازرگانی صنایع، شرکت‌های خصوصی و مراکز آکادمیک جهت جایگزینی آزمایشات جانوری (In Vivo) که بتواند در محیط مصنوعی (In vitro) انجام پذیرد، هنوز موفقیت چندانی حاصل نشده است. حتی امروزه نیز آزمایشات بسیاری جهت ارزیابی نهایی مواد شیمیایی و دارویی روی جانوران انجام می‌گیرد.

یکی از مهمترین آزمایشات جانوری آزمایش خرگوش دریز[2] است که در سال ۱۹۴۴ توسط دریز،[3] سم شناس اداره غذا و دارو، انجام گرفت. دریز و همکارانش پروتکل آزمون‌های استاندارد، جهت ارزیابی سمیت چشمی و پوستی را روی خرگوش ابداع کردند. در اوایل دهه ۱۹۶۰ این روش،

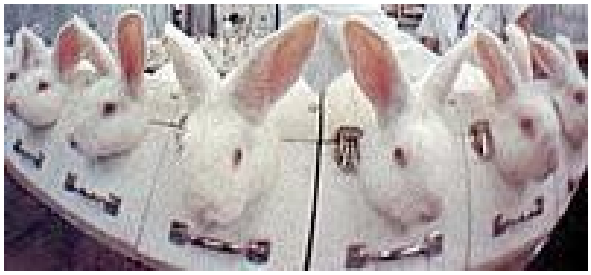
[1] European Centre for Validation of Alternatives

[2] Draize rabbit eye test

[3] John H. Draize

آزمون دریز نام گرفت که با توجه به اینکه آزمایشات مربوط به کدام انـدام اسـت، آزمـون حساسـیت چشمی دریز و آزمون حساسیت پوستی دریز نامیده می‌شود.

در این آزمون، از خرگوش‌های سفید رنگ با چشم‌های قرمز[1] در گروه‌هـای سـه تـا شـش تـایی استفاده می‌شود. ماده مورد آزمـایش بـر روی پوسـت و یـا چشـم خرگـوش هوشـیار قـرار گرفتـه و خرگوش در طی مدت ۲۱ روز برای آزمایش پوست از لحاظ التهـاب و ورم پوسـتی و بـرای آزمـایش چشم از لحاظ قرمزی، تورم، ترشح، زخم، خونریزی، تیرگی و کوری مورد بررسی قرار می‌گیرد. دلیل استفاده از خرگوش‌ها این است که علاوه بر مقرون به صرفه بودن، چشم‌های بزرگی دارند و تغییرات آناتومی و فیزیولوژی چشم آنها به راحتی قابل مشاهده می‌باشد. همچنـین سـاختار مجـرای اشـکی خرگوش‌ها به گونه ای است که از شستشوی مواد خارجی با اشک جلوگیری می‌کند.



نتایج آزمون دریز براساس میزان حساسیت، بدون حساسیت، حساسیت کم، حساسیت ملایـم و حساسیت متوسط طبقه بندی می‌شود.

آزمون دریز، به دلایل بسیاری از جمله مقدار ماده مـورد آزمـایش، در معـرض قـرار دادن مـواد شیمیایی با حیوان، حساس‌تر بودن چشم خرگوش‌ها به مواد شیمیایی نسبت به چشم انسـان، عـدم تکرارپذیری و آزار حیوان، مورد انتقاد شدید می‌باشد. بـه همـین دلیـل در سـال‌هـای اخیـر تـلاش گسترده‌ای جهت یافتن روش جایگزین آزمون دریز در حال انجام است،

[1] Albino rabbit

روش‌های جایگزین آزمون دریز

روش‌های جایگزین جانوری که به طور گسترده به کار می‌روند، به شرح ذیل می‌باشند:

الف- روش‌های ارگانوتایپیک[۱]

۱. آزمون نفوذپذیری و کدورت قرنیه گاو (BCOP)[۲]

۲. آزمون چشم جدا شده خرگوش (IRE)[۳]

۳. آزمون چشم جوجه (CEET)[۴]

۴. آزمون غشاء کوریو- آلانتوییک (CAM)[۵]

ب – روش‌های آزمون سلول و بافت[۶]

۱. آزمون اپی – اکولار (MatTek' S Epi Ocular™ orneal model)[۷]

۲. آزمون جذب قرمز خنثی[۸]

۳. آزمون همولیز گلبول‌های قرمز خون (RBC)[۹]

هرچند تمامی آزمون‌های جایگزین استاندارد نشده‌اند، با این حال در برخی سازمان‌های نظارتی ملی و در برخی صنایع برای اهداف محدود و مشخص، سودمندی آزمون‌های محیط مصنوعی پذیرفته شده است. اطمینان به کاربرد برخی از روش‌های مصنوعی، بستگی به دسترس بودن معیارهای مناسب، اطلاعات گذشته همان مواد، دانستن محدودیت‌های آزمون و تخصص

---

[1] Organotypic methods

[2] Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test

[3] Isolated Rabbit Eye (IRE)

[4] Chicken Enucleated Eye Test (CEET)

[5] Organotypic Methods- Chorio- allantoic membrane methods

[6] Cell and tissue testing methods

[7] Human corneal epithelium models

[8] Neutral Red Uptake

[9] Red blood cell (RED) haemolysis test

آزمونگر دارد. به دلایل ذکر شده معمولا بسیاری از روش‌های محیط مصنوعی مختص یک یا چند شرکت است که جهت محصول و مواد اولیه به کار می‌رود.

الف- روش‌های ارگانوتایپیک

قبل از تشریح روش‌های ارگانوتایپیک، به تشریح مختصری از آناتومی چشم پرداخته می‌شود. قرنیه خارجی‌ترین قسمت کره چشم بوده و در تماس با محیط خارج است. وظیفه اصلی قرنیه محافظت از چشم و حفظ شکل آن می‌باشد. قرنیه انسان شفاف و بدون خون می‌باشد و حدود ۰/۵ میلیمتر ضخامت دارد. قرنیه از ۳ لایه اصلی تشکیل شده است: اپی‌تلیوم[1] در سطح قرنیه، استروما[2] در ضخامت قرنیه و اندوتلیوم[3] که سطح داخلی قرنیه است. قرنیه دارای دو غشا نیز می‌باشد. غشا بومن[4] که بین اپی‌تلیوم سطحی و استروما می‌باشد و غشا دسمه[5] که بین استروما و اندوتلیوم در سطح داخلی است. بیشتر ضخامت قرنیه را استروما تشکیل می‌دهد. اپی‌تلیوم قرنیه در سطح ممکن است در اثر عوامل محیطی یا ضربه آسیب ببیند که قابل ترمیم است ولی اندوتلیوم قرنیه قدرت ترمیم نداشته و در صورت آسیب دیدن آن، شفافیت قرنیه مختل شده و قرنیه ورم می‌نماید. ملتحمه یک لایه شفاف محافظ است که سطح داخلی پلک‌ها و روی سفیدی کره چشم را می‌پوشاند. در ملتحمه رگ‌های خونی و گلبول‌های سفید به مقدار زیادی وجود دارد. این رگ‌ها و سلول‌های دفاعی تا حد زیادی از ورود میکروب‌ها و عوامل بیماری زا به قسمت‌های عمقی چشم جلوگیری می‌کند. به علاوه ترشحات ملتحمه سطح چشم را نرم و مرطوب نگه می‌دارد. عنبیه بخش رنگی پشت قرنیه است که رنگ چشم افراد را تعیین می‌کند. در وسط عنبیه سوراخی به نام مردمک وجود دارد که مقدار نور وارد شده به چشم را

---

[1] Epithelim

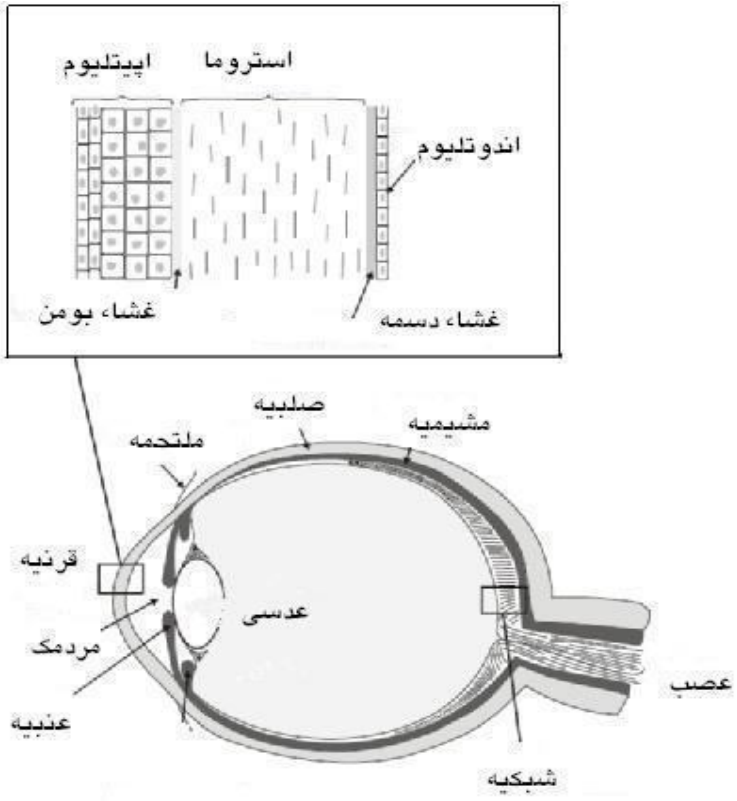
[2] The stroma

[3] endothelium

[4] Bowman 's membrane

[5] descemet's membrane

تنظیم می‌کند. عدسی یک ساختمان شفاف در پشت عنبیه است که در متمرکز کردن دقیق پرتوهای نور بر روی شبکیه به قرنیه کمک می‌کند. ضخامت عدسی چشم در شرایط مختلف تغییر می‌کند و بسته به آنکه شیء مورد نظر در چه فاصله‌ای قرار داشته باشد ضخامت عدسی کم و زیاد می‌شود. شبکیه یک پرده نازک حساس به نور (شبیه فیلم عکاسی) است که در عقب کره چشم قرار دارد. پرتوهای نوری که به شبکیه برخورد می‌کنند به پیام‌های عصبی تبدیل می‌شوند که از طریق عصب بینایی به مغز منتقل می‌شوند و در مغز تفسیر می‌شوند.



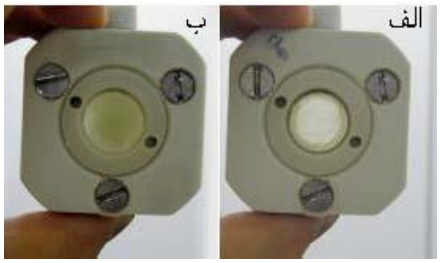
آناتومی چشم

۱- آزمون نفوذپذیری و کدورت قرنیه گاو (BCOP)

در ایـن آزمـایش قرنیـه از چشـم گـاو کشـته شـده جـدا مـی‌شـود و بـه صـورت افقـی در نگهدارنده‌ای که درون کدورت سنج قرار دارد، جاسازی می‌شود. در ایـن آزمـون دو انـدازه‌گیـری انجام می‌گیرد:

- تغییرات انتقال نور

در این مرحله ماده مورد نظر بر روی سطح اپیتلیوم ریخته شده و اندازه‌گیری کدورت انجـام می‌شود.



الف: قرنیه نرمال ب: قرنیه کدر شده

- اندازه گیری نفوذ پذیری با کمک محلول فلورسئین

پس از اندازه گیری کدورت، محلول فلورسئین از بالای محفظه اضافه گردیده و میـزان نفـوذ پذیری قرنیه با ارزیابی چگالی نوری[1] محیط در پایین محفظه به دست می‌آید.

وارد کردن فلورسئین از بالای محفظه

[1] The optical density (O.D.)

آزمون BCOP جهت تشخیص محرک‌های متوسط و قوی مناسب می‌باشد و برای اندازه‌گیری محرک‌های ملایم و بسیار ملایم کاربردی ندارد.

۲- آزمون چشم جدا شده خرگوش (IRE)

این آزمون توسط تعیین کدورت قرنیه و افزایش ضخامت قرنیه بر روی چشم جدا شده خرگوش تعیین می‌گردد. کل کره چشم خرگوش‌های آزمایشگاهی کشته شده، خارج گردیده و محفظه سوپرفیوژن[1] به صورت عمودی قرار می‌گیرد. دما و رطوبت کنترل شده است. جهت حفظ رطوبت، محلول نمکی از قبل گرم شده‌ای، قطره قطره و با فاصله‌های منظم روی قرنیه چکیده می‌شود.

محفظه‌های سوپرفیوژن

سپس چشم در معرض ماده مورد آزمایش قرار می‌گیرد و کدورت همراه با اندازه‌گیری ضخامت قرنیه سنجیده می‌شود.

الف: آزمایش بیومیکروسکوپی لامپ-اسلیت؛ ب: اندازه‌گیری ضخامت قرنیه.

[1] superfusion

در هر آزمایش، میانگین تورم قرنیه سه چشم با چشمی که در معرض ماده شیمیایی قرار نگرفته است، مقایسه می‌شود. اندازه و عمق جراحت قرنیه با معاینات بافت شناسی امکان پذیر است.

این آزمون برای آزمودن همه مواد شیمیایی مخصوصا مواد محرک قوی مناسب است (مواد شیمیایی که باعث ۱۵٪ تورم قرنیه شوند جزءمواد محرک قوی محسوب می‌شوند) و امکان جداسازی محرک‌های میانه – قوی را از محرک‌های ضعیف‌تر فراهم می‌نماید. در ضمن آزمون IRE جراحت قرنیه را پیش بینی می‌کند، اما اطلاعاتی در مورد ملتحمه فراهم نمی‌کند. بررسی-ها نشان می‌دهد نتایج این آزمون در آزمایشگاه مطابقت خوبی را با سایر روش‌ها دارد.

۳- آزمون چشم جوجه (CEET)

در آزمون چشم جوجه از کل کره چشم جوجه تازه ذبح شده استفاده می‌شود. قبل از تشریح، قرنیه سالم و صدمه ندیده‌ای که از لحاظ نگهداری فلورسئین اپیتلیوم قرنیه و کدورت قرنیه مشکل نداشته باشد، انتخاب می‌گردد. چشم‌های سالم به صورت افقی درون محفظه‌های سوپرفیوژن با کنترل دما و رطوبت جاسازی و نگهداری می‌شود. قبل از استفاده ماده شیمیایی، برای هر چشم اندازه‌گیری ضخامت قرنیه، کدورت قرنیه و نگهداری فلورسئین صورت می‌گیرد. سپس چشم‌ها از محفظه خارج شده و به مدت ۱۰ ثانیه در معرض ماده شیمیایی قرار می‌گیرند. پس از خارج شدن ماده شیمیایی، چشم در محفظه قرار می‌گیرد و قرنیه از لحاظ ضخامت قرنیه، کدورت قرنیه و نگهداری فلورسئین بررسی می‌شوند و اثرات مورفولوژیکی بر قرنیه مانند واپاشی اپیتلیوم قرنیه ثبت می‌گردد. برای هر نمونه، آزمایش میانگین تورم قرنیه سه چشم در نظر گرفته می‌شود. نمرات ضخامت قرنیه، کدورت قرنیه و نگهداری فلورسئین، یک اندیکس عددی با محدوده ۲۰۰-۰ را فراهم می‌سازد که مواد شیمیایی غیر محرک تا محرک شدید را طبقه بندی می‌نماید.

۴- آزمون غشاء کوریو- آلانتوییک

آزمون غشاء کوریو- آلانتوییک (CAM) اولین بارتوسط Lucpke در سال ۱۹۸۵ بر روی غشاء تخم جوجه مرغ بارور شده، انجام گرفت و آزمون HET- CAM[1] نامیده می‌شود. این غشا یک غشاء تنفسی عروقی[2] است که اطراف جنین پرنده را پوشانده است و شامل رگ‌های خونی است که از شریان‌ها و وریدهای آلانتوئیک جنین منشعب می‌شوند. این رگ‌ها حاوی اریتروسیت‌ها[3] و لکوسیت‌ها[4] هستند که درگیر واکنش با محرک‌های خارجی می‌شوند. فرض بر اینست که شباهتی بین اثرات حاد ایجاد شده در تماس مواد شیمیایی با رگ‌های خونی کوچک و پروتئین‌های بافت نرم غشا و اثرات ایجاد شده توسط همان مواد در چشم خرگوش وجود دارد. پروتئین‌های دناتوره شده[5] (به صورت لخته نمایان می‌شوند) شناساگری برای تاثیر مواد بر سلول‌های مخاطی غشاکوریو- آلانتوییک محسوب می‌شوند. این گونه تاثیرات با اثرات مخرب بر قرنیه چشم در ارتباط می‌باشند.

در آزمون HET- CAM غشاء کوریو- آلانتوئیک تخم مرغ، در روز نهم جنینی که بافت‌های عصبی و درک درد در آن به وجود نیامده است، به مدت پنج دقیقه در تماس با مواد شیمیایی مورد آزمای قرار گرفته و اثرات مخرب آن از لحاظ خونریزی، تحلیل و انعقاد پروتئین بر روی CAM مورد بررسی قرار می‌گیرد. تغییرات رگ‌های خونی HET- CAM پیش بینی کننده سمیت و آسیب ملتحمه چشم می‌باشد.

---

[1] Hen's egg test on the chorio- allantoic membrane (HET- CAM Assay)

[2] Vasclarized respiratory membrane

۳ اریتروسیت‌ها دارای هموگلوبین بوده و در اتصال با اکسیژن قرمز رنگ و در محیط بدون اکسیژن به رنگ آبی تیره در می‌آیند و نقش مهمی در انتقال اکسیژن و گاز کربنیک دارند

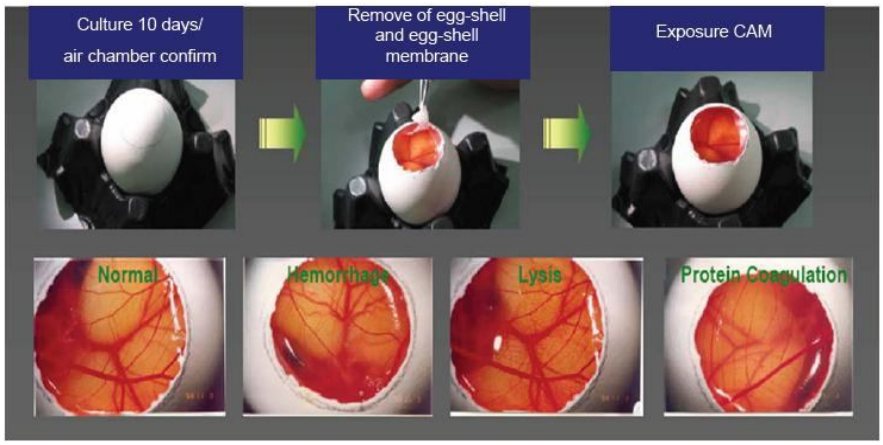
۴ لکوسیت‌ها در دفاع بدن در مقابل عوامل بیگانه دخالت دارند

[5] Denaturation

در آزمون HET-CAM مانند آزمون‌های BCOP، ICE، IRE کدورت و آماس قرنیه چشم مورد ارزیابی قرار نمی‌گیرد.

آزمون HET- CAM در صنعت جهت ارزیابی مواد اولیه و یا فرمولاسیون با حساسیت کم و یا بدون حساسیت به کار می‌رود. هر چند در کشورهای بریتانیا، فرانسه، هلند و آلمان همراه با آزمون جذب قرمز خنثی برای محرک‌های شدید به کار می‌رود.

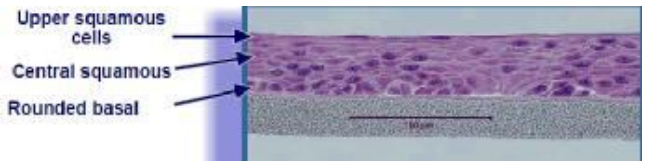
مقایسه مکانیسم پاسخگویی آزمون‌ها نشان می‌دهد، آزمون چشم خرگوش دریز پیش بینی دقیق‌تری داشته و نسبت به تغییراتی که در چشم انسان اتفاق می‌افتد، نزدیکتر است. در آزمون چشم خرگوش دریز میزان حساسیت چشم، نسبت به مواد شیمیایی در مدت ۲۱ روز ارزیابی می‌شود و اثرات بلند مدت آن مورد توجه قرار می‌گیرد. ولی در آزمون HET- CAM در مدت ۵ دقیقه بررسی می‌گردد. اصلی‌ترین مزیت این آزمون ارزان بودن و قابل کاربرد بودن آن برای تقریبا همه مواد شیمیایی است.



مراحل آزمون HET- CAM

ب – روش‌های آزمون سلول و بافت

۱- آزمایش اپی – اکولار (MatTk' S Epi Ocular^{TM} orneal model)



دراین آزمون از سلول‌های کراتینوسیت‌های[۱] اپیدرم انسانی استفاده می‌شود. بدین ترتیب که سلول‌های کراتینوسیت را در آزمایشگاه به صورت لایه‌های موازی پرورش می‌دهند تا شبیه ساختار اپیتلیوم قرنیه چشم گردد.

سپس آزمایشات متعددی از جمله آزمایش MTT[۲] جهت تعیین میزان سمیت و حساسیت روی قرنیه انجام می‌گیرد، که با استفاده از این روش می‌توان مقایسه داده‌های جانوری مقدار ET_{50} (زمان موثر در معرض بودن تا زمانیکه قدرت زیستی بافت به ۵۰ ٪ برسد) را با اطلاعات حاصل از این آزمایش انجام داد. با اندازه‌گیری زمان به جای مقدار دوز مصرفی، می‌توان آزمایشات را بدون رقیق سازی انجام داد. توسط این آزمایش می‌توان هر دو گروه مواد آبدوست و مواد آبگریز را مورد بررسی قرار داده و پتانسیل تحریک متوسط (آسیب سلولی) و تحریک بسیار ملایم (تحریک ملایم قرنیه و ملتحمه) را بررسی نمود. همچنین ساختار بافت شبیه سازی شده، توانایی تعیین محرک‌های بالای متوسط و شدید را با مقدار بسیار کم ET_{50} دارد.

---

[۱] اپیدرم از سلول‌هایی به نام کراتینوسیت تشکیل یافته است که پروتئین سختی به نام کراتین راتولید می‌کنند.

[2] Mitochondrial tetrazolium test

اخیراً شرکت پروکتر و گمبل[1] با به کار گیری بافت ZK1200، مدل پیش بینی کننده‌ای برای مواد مورد نظرش توسعه داده است که این مدل به آزمایش چشم دریز LVET[2] (ماده شیمیایی با غلظت کم) نزدیک است.

۲- آزمون جذب قرمز خنثی

در این روش توانایی ماده مورد آزمایش در جذب رنگ قرمز خنثی اندازه‌گیری می‌شود. آزمون جذب قرمز خنثی بر روی سلول‌های کشت داده شده انجام می‌گیرد. این سلول‌ها در تماس با غلظت‌های مختلفی از ماده مورد آزمایش قرار گرفته و سپس شستشو می‌شوند و برای مدت ۳ ساعت در تماس با رنگ قرمز خنثی قرار داده می‌شوند. رنگ قرمز خنثی در غشای سلول نفوذ کرده و در درون لیزوزم[3] سلول جمع می‌شود. تغییر سطح سلول یا غشای لیزوزوم حساس، باعث کاهش جذب رنگ قرمز خنثی می‌شود.

۳- آزمون همولیز گلبول‌های قرمز خون (RBC)

این آزمون در سال ۱۹۸۷ توسط Pape و همکارانش، بر اساس پتانسیل ماده شیمیایی در تخریب غشای سلولی گلبول‌های قرمز توسعه یافت.

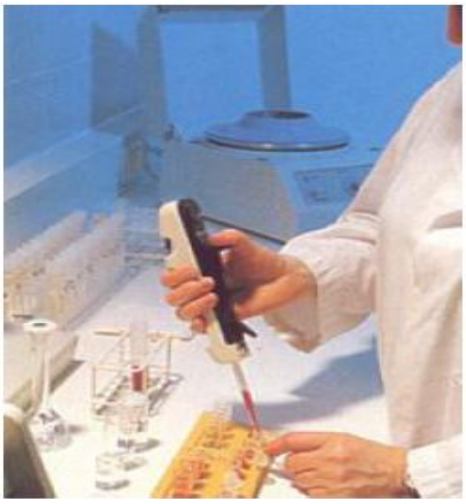
در آزمون RBC از گلبول قرمز خون گاو یا انسان استفاده می‌گردد. خون سیستم پیچیده‌ای متشکل از گلبول‌های قرمز(RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، پلاکت‌ها و پلاسما می‌باشد. گلبول‌های قرمز سلول‌های کوچکی هستند که متشکل از ۵۲٪ پروتئین، ۴۰٪ لیپید و ۸٪ کربوهیدرات می‌باشند. هموگلوبین حدود ۹۷٪ پروتئین‌های گلبول قرمز را تشکیل می‌دهد و به علت وجود آهن به رنگ قرمز می‌باشد.

[1] Procter & Gamgle

[2] Low volume eye test

[3] lysosomes

هموگلوبین به علت داشتن آهن میتواند با اکسیژن و دی‌اکسید کربن ترکیب شده و به ترتیب اکسی هموگلوبین[۱] و کربو آمینوهموگلوبین[۲] تشکیل دهد.



هنگامی که گلبول‌های قرمز در تماس با ماده شیمیایی قرار گیرند، با توجه به میزان اثر ماده شیمیایی بر روی گلبول قرمز غشاء سلول تخریب شده و اکسی هموگلوبین آزاد می‌گردد. هر چه میزان اکسی هموگلوبین آزاد شده بیشتر باشد غلظت رنگ بیشتر است و در نتیجه نشان دهنده تحریک‌زایی بیشتر ماده شیمیایی بر روی گلبول قرمز است.

برای جدا کردن گلبول قرمز، خون تازه تهیه شده و چندین مرتبه سانتریفوژ می‌شود و پس از شستشو، گلبول قرمز آن جدا می‌گردد. شستشو توسط بافر ایزوتونیک[۳] فسفات صورت می‌گیرد.

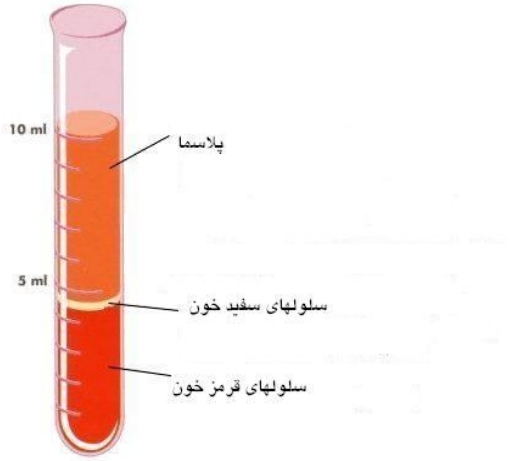
به طور ذاتی گلبول‌های قرمز اجازه عبور پروتئین‌های بزرگ را به پلاسما نمی‌دهند. بنابراین با اضافه کردن محلول هیپوتونیک، فشار اسمزی در محیط خارج پلاسما کاهش یافته و با توجه

[1] oxyhemoglobin

[2] carbaminohemoglobin

[3] Isotonic

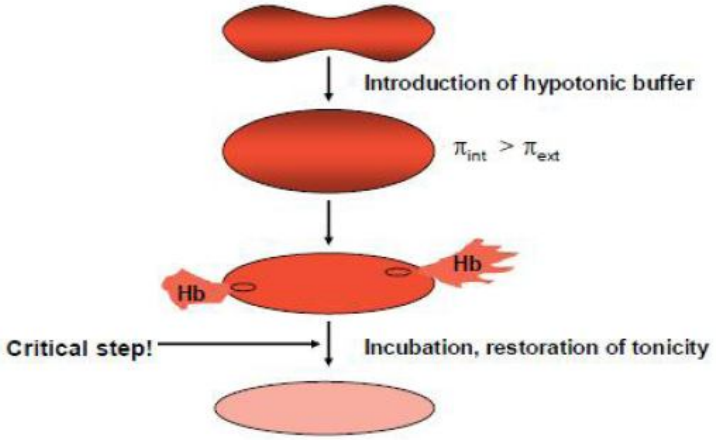
به اینکه در مجاورت هیپوتونیک فشار اسمزی درون گلبول قرمز بیشتر از محیط خارج آن است آب به داخل گلبول قرمز می‌شود و باعث بزرگ شدن گلبول می‌شود.



پس از اینکه فشار اسمزی درونی به قدر کافی زیاد شد، حفره‌های غشا به اندازه‌ای بزرگ می‌شوند که پروتئین‌ها به راحتی از آن عبور می‌کنند. این پدیده زود گذر بوده و حدود ۲۰-۱۵ ثانیه طول می‌کشد.

در مرحله بعد مقدار حجم مساوی با غلظت مشخص ازماده شیمیایی مورد آزمایش به گلبول‌های قرمز اضافه شده و سپس جهت مخلوط نمودن کامل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق شیک می‌شود و محلول بدست آمده سانتریفوز می‌شود.

در نهایت به علت داشتن ویژگی‌های نوری هموگلوبین، می‌توان میزان جذب اکسی هموگلوبین را توسط دستگاه اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری نمود.



شکل ۱۴ نمایش نفوذ هیپوتونیک به داخل گلبول قرمز

هموگلوبین در تماس با ماده شیمیایی دناتوره می‌شود، سپس منحنی کالیبراسیون بر اساس رابطه بین نسبت همولیز و غلظت مواد مورد آزمایش رسم می‌گردد. میزان آزاد سازی هیپوتونیک کامل اکسی هموگلوبین ۱۰۰٪ در نظر گرفته می‌شود و میزان آزاد سازی هیپوتنیک اکسی هموگلوبین هر محلول نسبت به آن سنجیده می‌شود. غلظتی که در آن ۵۰٪ آزاد سازی هیپوتونیک اکسی هموگلوبین صورت می‌گیرد H_{50} نامیده می‌شود.

نسبت میزان همولیز[1] به دناتوراسیون[2] معیار سنجش و مقایسه در این آزمون می‌باشد.

[1] تخریب یا شکسته شدن غشای گلبول قرمز و آزاد شدن هموگلوبین به پلاسمای خون

[2] از بین رفتن خواص پروتئین‌های آزاد

مراجع:

1. Huhtala, A. Corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell culture assays as otential alternatives to animal experimentation
for the evaluation of ocular toxicity. Espoo 2003, Helsinki University of Technology.
2. Eherts, D. An *in-vitro* Tiered Approach Alternative to Live Animal Testing for Determination of Ocular or Dermal Irritation**.** Pennsylvania 2002, Drexel University.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Draize_test#Differences_between_rab
4. ec.europa.eu/enterprise/sectors/cosmetics/files/.../3_eye_irritation_ en.pdf
5. Pape W. J. W., Pfannenbecker U., Argebeaux H., Bracher M., Esdile D. J., Hagino S., Kasai Y., Lewis R. W., Toxicology in Vitro 13 (1999) 343-354
6. Lagarto A., Vega R., Vega Y., Guerra I., Gonzalez R., Toxicology in Vitro 20 (2006) 529–533
7. Okamoto Y., Ohkoshi K., Itagaki H., Tsuda T., Kakishima H., Ogawa T., Kasai Y., Ohuchi J.,Kojima H., Kurishita A., Kaneko
T., Matsushima Y., Iwabuchi Y., Ohno Y., Toxicology in Vitro 13 (1999) 115-124
8. http://www.mattek.com/pages/products/epiocular
9. http://www.skinethic.com/faq.asp
10. iccvam.niehs.nih.gov/methods/.../Revised ETCAMBRDSect2FD.pdf
11. Grover P., Jamil K.,Proc. Indian natn Sci. Acad.(PINSA) B67(2001)1-20