KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/33/EF

af 25. april 2000

om 27. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer (*)

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer [1], senest ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/33/EF [2], særlig artikel 28, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Bilag V til direktiv 67/548/EØF indeholder metoderne til bestemmelse af stoffers og præparaters fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet. Det er nødvendigt at tilpasse dette bilag til den tekniske udvikling.

(2) I artikel 7, stk. 2, i Rådets direktiv 86/609/EØF om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål [3], fastsættes, at »forsøg må ikke udføres, hvis der på rimelig og praktisk måde kan benyttes en anden videnskabeligt tilfredsstillende metode, som ikke medfører anvendelse af dyr, for at opnå de tilstræbte resultater«.

(3) Kommissionen har til hensigt at indføre alternative prøvemetoder, som ikke medfører anvendelse af dyr, i bilag V til direktiv 67/548/EØF, således at disse metoder kan anvendes til prøvning af kemiske stoffer i overensstemmelse med artikel 3, stk. 1, i direktiv 67/548/EØF.

(4) De i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for Tilpasning til den Tekniske Udvikling af Direktiverne om Fjernelse af Tekniske Hindringer for Handelen med Farlige Stoffer og Præparater —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Teksterne i bilag I og II til dette direktiv tilføjes til del B i bilag V til direktiv 67/548/EØF.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne gennemfører senest den 1. oktober 2001 de love og administrative bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. Medlemsstaterne underretter straks Kommissionen herom.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen de vigtigste nationale lovbestemmelser, som de vedtager på det område, der er omfattet af dette direktiv, og en sammenligningstabel mellem dette direktiv og de vedtagne nationale bestemmelser.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tredjedagen for dets offentliggørelse i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. april 2000.

På Kommissionens vegne
Margot WALLSTRÖM
Medlem af Kommissionen

(*) Udstedt før den 26. tilpasning.
[1] EFT 196 af 16.8.1967, s. 1.
[2] EFT L 199 af 30.7.1999, s. 57.
[3] EFT L 358 af 18.12.1986, s. 1.

BILAG I

»B.40. HUDÆTSNING

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

To in vitro-test til måling af hudætsning er blevet anerkendt som videnskabeligt validerede af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM, Det Fælles Forskningscenter, Europa-Kommissionen) (1) (2) (3): måling af transkutan elektrisk modstand (TER) i rottehud og en test, hvor der anvendes en human hudmodel. ECVAM-valideringsundersøgelsen viste, at begge testmetoder var pålidelige med hensyn til at kunne skelne mellem stoffer, der er kendt for at være hudætsende, og stoffer, der er kendt for ikke at være det. Derudover kunne man med forsøgsprotokollen baseret på en human hudmodel skelne korrekt mellem grader af hudætsning (stoffer, der er kendt for at være alvorligt hudætsende, R35, og andre hudætsende stoffer, R34) (2). Beskrivelse og fremgangsmåde for begge metoder er anført nedenfor; valg af test afhænger af brugerens specifikke behov og præferencer.

Se desuden den generelle indledning, del B.

1.2. **Definitioner**

Hudætsning: fremkomsten af irreversibel vævsødelæggelse i huden efter applikation af teststof.

1.3. **Referencestoffer**

Ingen nærmere angivet, men se punkt 1.5.3.4 og 1.7.2.3.

1.4. **Princippet i testmetoden — Rottehud-TER-testen**

Testmaterialet appliceres i op til 24 timer på den epidermale overflade (ydersiden af huden) af hudlapper fra unge rotter, der er humant aflivede. At et stof er ætsende, viser sig ved, at det kan beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som en reduktion i den naturlige TER under en tærskelværdi (5 kΩ) (4) (5). Irriterende og ikke-irriterende stoffer medfører ikke TER under tærskelværdien. Et farvebindingstrin kan føjes til testen ved undersøgelser af overfladeaktive stoffer og neutrale organiske stoffer (se definitioner i reference 6); herved mindskes antallet af falsk positive resultater, som særligt forekommer ved disse stoffer (2) (7).

1.5. **Beskrivelse af testmetode — Rottehud-TER-testen**

1.5.1. *Forsøgsdyr*

Til fremstilling af hudlapper anvendes unge rotter (20-23 dage gamle, Wistar eller lignende stamme). Hårene på ryggen og flanken fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika (f.eks. streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer høje nok til at hæmme bakterievækst). Forsøgsdyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- og fjerdedagen efter den første vask og skal derefter anvendes inden tre dage. (Dyrene må ikke være ældre end 31 dage med henblik på fremstilling af hudlapper).

1.5.2. *Fremstilling af hudlapper*

Forsøgsdyrene aflives humant. Ryghuden fjernes fra dyrene og overflødigt fedtvæv fjernes omhyggeligt. Huden anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet man sikrer sig, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En gummi »O«-ring sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødigt væv klippes af. Rørets og »O«-ringens dimensioner ses på figur 1. Der tætnes med vaseline, så »O«-ringen slutter helt til enden af PTFE-røret. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et ydre kammer, som indeholder en magnesiumsulphatopløsning (154 mM) (figur 2).

1.5.3. *Fremgangsmåde*

1.5.3.1. Applikation af testmaterialet

Flydende teststoffer (150 µl) appliceres på den epidermale overflade inde i røret (figur 2). Drejer det sig om faste stoffer, skal tilstrækkeligt af stoffet påføres hudlappen, så hele overfladen er dækket af stoffet. Deioniseret vand (150 µl) tilsættes oven på stoffet, og røret rystes forsigtigt. Teststoffet skal have maksimal kontakt med huden. Med henblik herpå kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter, eller rive dem til et kornet materiale eller male dem til pulver.

Der bruges tre hudlapper til hvert teststof. Stofferne skal være i kontakt med hudlappen i 24 timer (se ligeledes 1.5.3.4). Stoffet fjernes ved spuling under vandhane med vand med en temperatur på højst 30 °C, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet. Stoffer, der er stivnet i røret, kan eventuelt fjernes ved hjælp af en kraftig stråle vand, der er omkring 30 °C varmt.

1.5.3.2. TER-målinger

TER måles ved hjælp af en lavvoltvekselstrømsdatabro (f.eks. AIM 401 eller 6401 eller tilsvarende). Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70 % ethanol i tilstrækkelig mængde, så hele hudens overflade dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanolet, ved at man vender røret på hovedet, og vævet hydreres nu ved tilsætning af 3 ml magnesiumsulphatopløsning (154 mM). Elektroderne fra databroen anbringes nu på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i kΩ/hudlap (figur 2). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 1. Klemmen (krokodillenæbbet) på den indre (tykke) elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under selve modstandsmålingen, hvorved man sikrer sig, at et konstant stykke af elektroden er neddykket i opløsningen af magnesiumsulphat. Den ydre (tynde) elektrode er anbragt inde i det ydre kammer, så det rører ved kammerbunden. Afstanden mellem den nederste del af den fjedrende klemme og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant, da den har indflydelse på den målte modstand.

Bemærk, at målinger på over 20 kΩ kan skyldes, at teststoffet ligger som en belægning på hudens overflade. Man kan forsøge at fjerne stoffet ved at ryste PTFE-røret i 10 sekunder, mens man dækker åbningen med en tommelfinger iført en gummitut; magnesiumsulphatopløsningen kasseres, og målingen gentages med en ny magnesiumsulphatopløsning.

Gennemsnittet af TER-resultaterne accepteres, dersom værdierne af samtidigt udførte positive og negative kontroller falder inden for de for metoden accepterede grænser. For metode og apparatur, som beskrevet her, er de foreslåede kontrolstoffer og de dertil hørende accepterede grænser:

Kontrol	Stof	Modstandsgrænser (kΩ)
Positiv	10 M saltsyre (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Destilleret vand	10-25

1.5.3.3. Procedure tilpasset overfladeaktive og neutrale organiske stoffer

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 kΩ, kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Herved kan man afgøre, om resultaterne er falsk positive (2).

1.5.3.3.1. Applikation og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B

Efter at den epidermale overflade er blevet behandlet med teststoffet, appliceres 150 µl af en 10 % (w/v)-opløsning af sulforhodamin B i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i 2 timer. Hudlapperne spules under en vandhane i ca. 10 sekunder med vand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundet farvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glassene rystes forsigtigt i 5 minutter for at fjerne yderligere overskydende/ikke-bundet farvestof. Denne renseprocedure gentages, hvorefter hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30 % (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulphat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60 °C til næste dag. Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i 8 minutter ved 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175). 1 ml af supernatanten fortyndes 1 til 5 (v/v) (1 ml + 4 ml) med en 30 % (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens ekstinktion/optical density (OD) måles ved ca. 565 nm.

1.5.3.3.2. Beregning af farveindhold

Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekylvægten = 580). Mængden af sulforhodamin B beregnes for alle hudlapperne, og en gennemsnitlig mængde beregnes ud fra tredobbeltbestemmelserne. Den gennemsnitlige værdi for farvemængde accepteres under forudsætning af, at samtidigt opnåede kontrolværdier falder inden for de for metoden acceptable grænser. Følgende acceptable grænser for farvemængde i kontrollerne er foreslået for metode og apparat som beskrevet her:

Kontrol	Stof	Farvemængdegrænser (µg/lap)
Positiv	10 M saltsyre (36 %)	40-100
Negativ	Destilleret vand	15-35

1.5.3.4. Yderligere informationer

Teststoffer kan også appliceres på hudlapper i kortere tid (f.eks. 2 timer) med henblik på identifikation af stærkt ætsende stoffer. Man fandt imidlertid ved valideringsundersøgelserne af TER-testen, at den overvurderede adskillige stoffers ætsende evne, når de var applicerede på hudlapper i 2 timer (2), skønt den efter 24 timers applikation korrekt kunne identificere de ætsende og de ikke-ætsende stoffer.

Testapparaturets og forsøgsprocedurens egenskaber og dimensioner kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 kΩ, blev bestemt med det apparatur og den fremgangsmåde, der er beskrevet i denne metode. Hvis testbetingelserne ændres betydeligt, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdien for modstand kalibreres ved at teste en række referencestandarder, der vælges blandt de kemikalier, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen (3).

1.6. **Testmetodens princip — Måling ved forsøgsopstilling med human hud**

Teststoffet appliceres i op til 4 timer på en tredimensional human hudmodel, omfattende en rekonstrueret epidermis med et fungerende stratum corneum. Ætsende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellers levedygtighed (f.eks. påvist med MTT-reduktionstesten) under en fastlagt tærskelværdi efter en bestemt eksponeringstid. Testmetodens princip er i overensstemmelse med den hypotese, der siger, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum (ved diffusion eller erosion), og er tilstrækkeligt cytotoksiske til at fremkalde celledød i de underliggende cellelag.

1.7. **Beskrivelse af testmetoden — Forsøgsopstilling med human hud**

1.7.1. *Modeller for human hud*

Modeller for human hud kan hidrøre fra forskellige kilder, men de må opfylde visse kriterier. Modellen må have et fungerende stratum corneum med et underliggende lag af levende celler. Stratum corneums barrierefunktion må være tilstrækkelig. Dette kan vises ved, at hudmodellen ikke påvirkes af stoffer, der er cytotoksiske, men som ikke almindeligvis passerer stratum corneum. Modellens resultater skal være reproducerbare på veldefinerede betingelser.

De levende celler i modellen skal være tilstrækkelig levedygtige til, at de kan skelne klart mellem positive og negative kontroller. Efter at være udsat for en negativ kontrol skal cellernes levedygtighed (f.eks. som den kan måles med mængden af MTT-reduktion, dvs. en OD-værdi) være inden for acceptable grænser for den pågældende model. Vigtigst er det, at den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, må have vist at kunne leve op til internationale valideringsstandarder (se reference 2).

1.7.2. *Fremgangsmåde*

1.7.2.1. Applikation af teststoffet

For flydende stoffer skal der appliceres tilstrækkeligt teststof til, at hudoverfladen dækkes (mindst 25 µl/cm^2). Det samme gælder for faste stoffer, og de skal fugtes, for at sikre god hudkontakt; om nødvendigt skal de males til et pulver, før de appliceres. Applikationsmåden skal kunne anvendes til en lang række kemiske stoffer (for eksempler se reference 2). Teststoffet skal omhyggeligt vaskes af hudoverfladen med fysiologisk saltvand, når eksponeringstiden er gået.

1.7.2.2. Måling af cellers levedygtighed

Enhver kvantitativ, godkendt metode kan bruges til måling af cellers levedygtighed. Den hyppigst anvendte måling er MTT-reduktionstesten, som har vist sig at give nøjagtige og reproducerbare resultater i forskellige laboratorier (2). Hudlappen anbringes i en MTT-opløsning på 0,3 mg/ml ved 20-28 °C i 3 timer. Den bundfældede blå formazan ekstraheres (ekstraktion med opløsningsmidler), og formazankoncentrationen beregnes ud fra måling af OD ved en bølgelængde mellem 545 og 595 nm.

1.7.2.3. Yderligere information

Den anvendte hudmodel og nøje overholdelse af applikationstid og vaskeprocedurer etc. har den største betydning for den målte cellelevedygtighed. Det anbefales, at metoden og modellen, der skal udsige noget om stoffers virkning, kalibreres med en serie standardreferencer, valgt blandt de kemikalier, der er brugt i ECVAM's valideringsundersøgelse (3). Kritisk er intra- og interlaboratoriel reproducerbarhed hvad angår en lang række kemikalier, i overensstemmelse med internationale standarder. Som et minimumskrav skal metoden leve op til kriterierne for videnskabelig gyldighed, som tidligere defineret (2), og resultaterne af en sådan valideringsundersøgelse skal være publicerede i et videnskabeligt tidsskrift med peer-review.

2. DATA

2.1. Behandling af resultaterne

2.1.1. *Rottehud-TER-testen*

De målte resultater for modstand (kΩ) i teststoffet, i positive og negative kontroller og alle standardreferencekemikalierne skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.1.2. *Test med human hudmodel*

OD-værdier og beregnede tal for procentuel cellelevedygtighed for teststof, for positive og negative kontroller og for alle standardreferencekemikalier skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.2. Evaluering og fortolkning af resultater

2.2.1. *Rottehud-TER-testen*

Hvis den gennemsnitlige TER-værdi for teststoffet er større end 5 kΩ, er stoffet ikke ætsende. Hvis TER-værdien er mindre end eller lig med 5 kΩ, og stoffet ikke er et overfladeaktivt stof eller et neutralt organisk stof, er det ætsende.

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 kΩ, kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er større end eller lig med det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36% HCl, er teststoffet en sand positiv og derfor ætsende. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er mindre end det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36% HCl, er teststoffet en falsk positiv og derfor ikke ætsende.

2.2.2. *Test med human hudmodel*

OD fra den negative kontrol repræsenterer 100% cellelevedygtighed; derfor kan de OD-værdier, som måles ved hver undersøgelse, anvendes til beregning af den procentuelle levedygtighed i forhold til den negative kontrol. Den procentuelle cut-off værdi af cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende stoffer (eller som skelner mellem forskellige grader af ætseevne), skal klart defineres i forbindelse den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, før metoden godkendes, og den påfølgende valideringsundersøgelse må vise, at cut-off-værdien er hensigtsmæssig (for eksempel se reference 2).

3. FREMLÆGGELSE AF RESULTATER

Testrapport

Testrapporten skal som et minimum indeholde følgende oplysninger:

Teststof

— Identifikation, data, dets fysiske natur og, hvis relevant, fysisk-kemiske egenskaber. Tilsvarende information skal foreligge for eventuelle referencestoffer

Omstændigheder ved testen

— Detaljer i den anvendte fremgangsmåde

— Beskrivelse af og motivering for eventuelle modifikationer.

Resultater

— Angivelse i tabelform af målte værdier for modstand (TER-testen) eller værdier for den procentuelle levedygtighed (test med human hudmodel) for teststoffet, positive og negative kontroller og eventuelle standardreferencestoffer, og for data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser og gennemsnitsværdier

— Beskrivelse af eventuelle andre observationer.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **REFERENCER**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, s. 275-280.

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, s. 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, s. 471-482.

(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, s. 507-512.

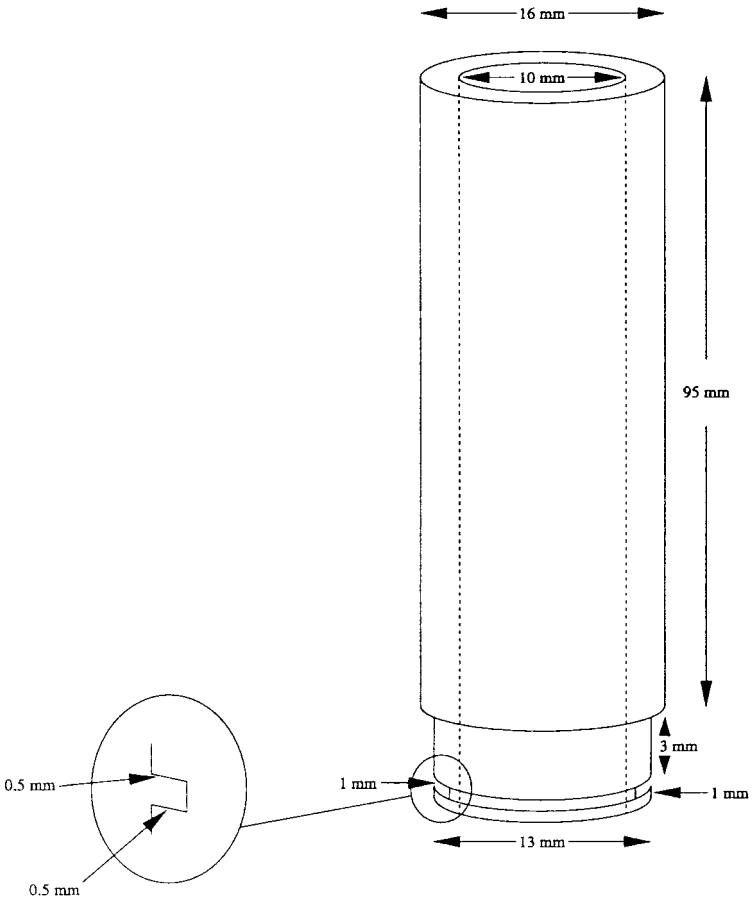
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, s. 191-194.

(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, s. 709-720.

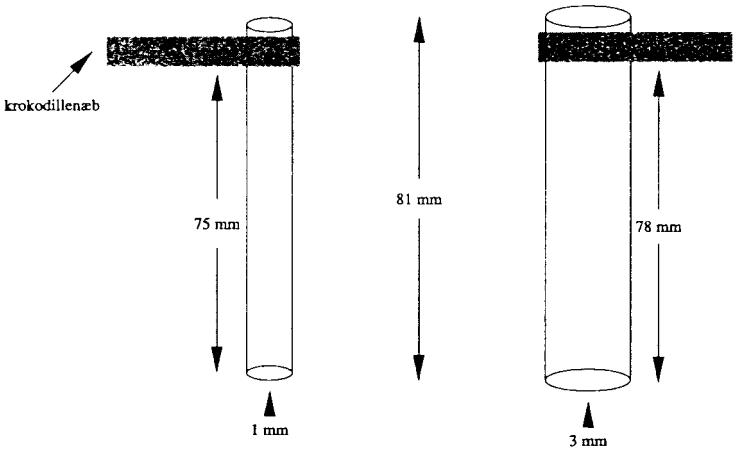
(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, s. 219-255.

Figur 1

PTFE-rørs mål

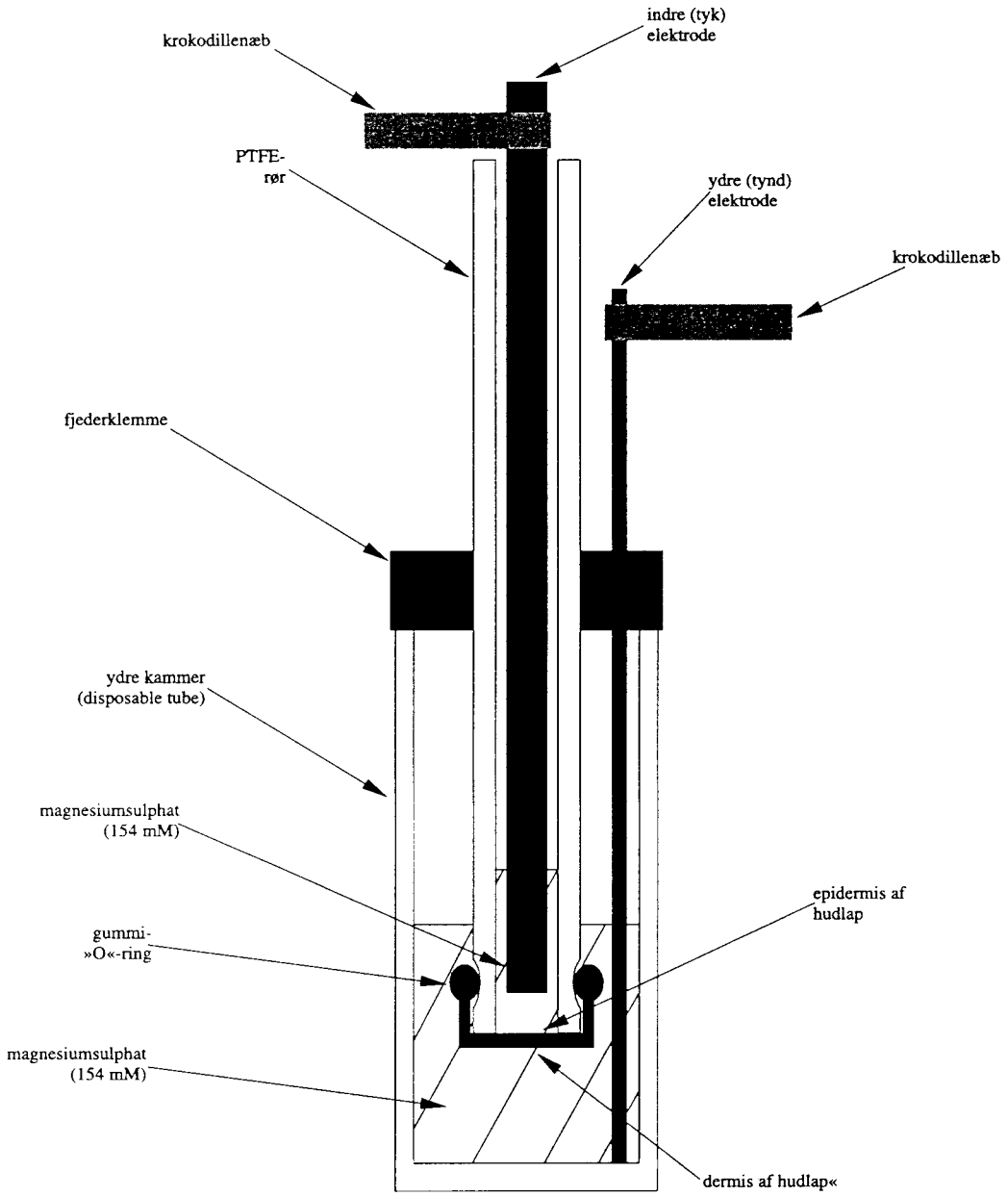


Elektroders mål



Figur 2

Apparatur til rottehud-TER-test



BILAG II

»B.41. FOTOTOKSICITET — IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

Fototoksicitet defineres som det toksiske respons, der fremkaldes på huden, efter at den har været udsat for bestemte kemiske stoffer og en påfølgende eksponering for lys, eller som det respons, der fremkaldes ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Resultater fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bruges til identifikation af et stofs fototoksiske potentiale, dvs. påvisning af eventuel risiko ved teststoffet i forbindelse med bestråling med UV-lys og synligt lys.

Eftersom påvisning af fotocytotoksicitet induceret af den kombinerede virkning af et kemisk stof og lys er det toksikologiske slutprodukt af in vitro-testen, kan den identificere stoffer, der er fototoksiske in vivo efter systemisk indgift og fordeling i huden, og stoffer, som forårsager fotoirritation efter lokal applikation på huden.

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten blev udviklet og valideret i et fælles EU/COLIPA-projekt fra 1992-1997 (1) (2) (3) med det formål at finde frem til et pålideligt in vitro-alternativ til de forskellige in vivo-test, der blev anvendt. I 1996 anbefalede en OECD-workshop at anvende in vitro-metoder til vurdering af fototoksicitet (4).

Resultater fra in vitro NRU-fototoksicitetstesten blev sammenlignet med akutte fototoksicitets-/fotoirritationsvirkninger på dyr og mennesker, og testen har vist sig fortræffelig til at forudsige disse virkninger. Testen er ikke beregnet til påvisning af andre negative virkninger af den kombinerede effekt af kemiske stoffer og lys, f.eks. fotogenotoksicitet, fotoallergi og fotocarcinogenicitet, selv om mange kemikalier med de nævnte egenskaber vil give et positivt resultat med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten. Dertil kommer, at testen ikke er beregnet til vurdering af styrken af fototoksicitet.

En fremgangsmåde til vurdering af kemikaliers toksicitet vises trinvist i tillægget.

1.2. **Definitioner**

Strålingsintensitet: (irradiance) intensiteten af ultraviolet (UV) eller synligt lys som falder på en overflade, målt i W/m^2 eller mW/cm^2.

Lysdosis: mængden (= intensitet × tid) af ultraviolet (UV) eller synlig stråling, som falder på en overflade, udtrykt i joule (= W × s) pr. overfladeenhed, f.eks. J/m^2 eller J/cm^2.

Bølgelængder for UV-lys: betegnelser anbefalet af CIE (»Den Internationale Belysningskommission«): UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Også andre betegnelser bruges: grænsen mellem UVB og UVA placeres ofte ved 320 nm, og UVA bliver sommetider opdelt i UV-A1 og UV-A2, med en grænse ved ca. 340 nm.

Cellernes levedygtighed: parameter, der måler en cellepopulations totale aktivitet (f.eks. farvestoffet Neutral Red's optagelse i levende cellers lysosomer), som, afhængigt af målemetode og testens udformning, korrelerer med det totale antal celler og/eller deres levedygtighed.

Cellernes relative levedygtighed: cellernes levedygtighed udtrykt i forhold til negative kontroller (opløsningsmiddel), som har været gennem hele testproceduren (enten + UV eller − UV), men som ikke er behandlet med et kemisk stof.

Forsøgsmodel, der skal udsige noget om stoffers virkning: en algoritme til beregning af toksisk potentiale ud fra resultaterne af toksicitetstesten. I nærværende retningslinier kan PIF og MPE anvendes til beregning af det fototoksiske potentiale ud fra resultaterne fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

PIF (fotoirritationsfaktor): en faktor, beregnet ud fra sammenlignende målinger af to lige effektive (EC_{50}) cytotoksiske koncentrationer af teststoffet, ved fravær (− UV) eller tilstedeværelse (+ UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

MPE (gennemsnitlig lyseffekt): en ny parameter afledt af matematisk analyse af to responskurvers totale udstrækning fremkommet ved fravær (− UV) eller tilstedeværelse (+ UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

Fototoksicitet: et akut, toksisk respons, der opnås efter førstegangsudsættelse af huden for bestemte stoffer og påfølgende lyspåvirkning, eller som induceres ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Fotoirritation: en underafdeling af udtrykket »fototoksicitet«, som kun beskriver hudens fototoksiske reaktioner på kemikalier, administreret lokalt eller oralt. Disse fototoksiske reaktioner medfører altid uspecifikke celleskader (svarende til solskoldethed).

Fotoallergi: en erhvervet immunologisk reaktionsevne, som ikke fremkommer efter den første behandling med kemikaliet og lys, men hvor hudens reaktionsevne først kan påvises efter en induktionsperiode på 1-2 uger.

Fotogenotoksicitet: et genotoksisk respons fra gener efter udsættelse af celler for en ikke-genotoksisk dosis af UV/synligt lys og et ikke-genotoksisk kemikalie.

Fotocarcinogenicitet: carcinogenicitet induceret ved gentagne applikationer af kemikalie og lys. Udtrykket »foto co-carcinogenese« anvendes, hvis UV-induceret tumordannelse forøges af et kemikalie.

1.3. Referencestoffer

Ud over som positiv kontrol at teste Chlorpromazin sideløbende hver gang, anbefales det med henblik på nyetablering af 3T3 NRU-fototoksicitetstesten som referencestoffer at anvende et udvalg af de kemikalier, der er anvendt i de ringprøverne af denne test (1) (3) (13).

1.4. Indledende betragtninger

Mange kemikalietyper er blevet rapporteret som fototoksiske (5) (6) (7) (8). Det eneste fælles træk er deres evne til at absorbere lysenergi fra sollys. Ifølge fotokemiens første lov (Grotthaus-Draper's lov) kræver en fotoreaktion tilstrækkelig absorption af lyskvanter. Før en biologisk testning udføres efter nærværende retningslinier, bør kemikaliets absorptionsspektrum for UV/synligt lys fastlægges (f.eks. efter OECD Test Guideline 101). Hvis den molære ekstinktions/absorptionskoefficient er mindre end 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1} har kemikaliet ikke noget fotoreaktivt potentiale, og det er overflødigt at undersøge det med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten eller nogen anden biologisk test med henblik på påvisning af fotokemisk effekt (tillæg).

1.5. Testmetodens princip

Man har identificeret fire forskellige mekanismer, hvorved et (kemisk) farvelegeme ved lysabsorption kan fremkalde et fototoksisk respons (7). Alle fire medfører cellebeskadigelse. In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er derfor baseret på sammenligning af et kemisk stofs cytotoksicitet, når det ved undersøgelsen udsættes eller ikke udsættes for UVA/synligt lys i en dosis, der ikke i sig selv er cytotoksisk. Cytotoksicitet forstås i denne test som koncentrationsafhængig reduktion af optagelse af farvestoffet Neutral Red (NR (9)) 24 timer efter behandling med teststoffet og bestråling.

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så der dannes et encellet lag. To mikrotiterplader med 96 brønde hver anvendes pr. teststof. Pladerne præinkuberes med 8 forskellige koncentrationer af det teststoffet i en time. En af pladerne bliver derefter udsat for ikke-cytotoksisk UVA/synligt lys i en dosis på 5 J/cm^2 UVA (+UV-eksperiment), mens den anden plade lægges mørkt (−UV-eksperiment). Derefter erstattes behandlingsmediet med dyrkningsmediet på begge plader, og efter 24 timers inkubation bestemmes cellelevedygtigheden ved den mængde af Neutral Red, der optages (NRU) i løbet af 3 timer. Den relative cellelevedygtighed, udtrykt som procent af de ubehandlede negative kontroller, beregnes for hver af de 8 testkoncentrationer. Med henblik på vurdering af den fototoksiske styrke sammenlignes det koncentrationsafhængige respons med (+UV) eller uden (−UV) bestråling, almindeligvis på EC_{50}-niveauet, dvs. ved den koncentration, som nedsætter cellelevedygtigheden med 50 % i forhold til de ubehandlede kontroller.

1.6. Kvalitetskriterier

Cellernes UVA-følsomhed, historiske data: cellernes følsomhed for UVA bør kontrolleres regelmæssigt. Cellerne udsås med samme tæthed som bliver anvendt i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, bestråles den følgende dag med UVA-doser på 1-9 J/cm^2, og cellelevedygtigheden måles næste dag med NRU-testen. Kvalitetskravet er, at levedygtigheden efter bestråling med 5 J/cm^2 ikke er mindre end 80 % af kontrollen, som var opbevaret mørkt. Ved den højeste UVA dosis på 9 J/cm^2 skal levedygtigheden ikke være mindre end 50 % af den mørke kontrol. Denne kontrolundersøgelse bør gentages for ca. hver 10. cellegeneration.

UVA-følsomhed i den negative kontrol, den foreliggende test: kvalitetskravet er, at den negative kontrol (celler i Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) med eller uden 1 % dimethylsulphoxid (DMSO) eller 1 % ethanol (EtOH)) i +UVA-eksperimentet udviser en cellelevedygtighed, som ikke er mindre end 80 % af de ikke-bestrålede celler i samme opløsning i det parallelt løbende forsøg i mørke (−UVA).

Levedygtighed i de negative kontroller: den absolutte optical density/extinction ($OD_{540\ NRU}$) målt i ekstraktet af NR fra den negative kontrol angiver om de 1×10^4 celler udsåede pr. brønd er vokset med normal fordoblingstid i undersøgelsens to døgn. En undersøgelse accepteres, hvis den gennemsnitlige $OD_{540\ NRU}$ i de ubehandlede kontroller er ≥ 0,2

Positiv kontrol: et kendt fototoksisk kemikalie skal testes sideløbende med hver in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Chlorpromazin (CPZ) blev anvendt som positiv kontrol i EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Nedenstående kriterier blev defineret for accept af testen udført med CPZ i standardproceduren i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten: CPZ bestrålet (+UVA): EC_{50} = 0,1 til 2 μg/ml, CPZ ikke-bestrålet (−UVA): EC_{50} = 7,0 til 90,0 μg/ml. Fotoirritationsfaktoren (PIF), dvs. ændring af EC_{50}, bør være mindst 6.

Andre kendte fototoksiske kemikalier, der passer til teststoffets kemiske gruppe eller opløselighedskarakteristik, kan anvendes som sideløbende positiv kontrol i stedet for CPZ. I så fald skal højeste og laveste værdier for EC_{50} og PIF eller MPE (gennemsnitlig lyseffekt) være tilstrækkeligt definerede som kriterier for accept af testen.

1.7. **Beskrivelse af testmetoden**

1.7.1. *Forberedelser*

1.7.1.1. Celler

En stabil musefibroblastcellelinje — Balb/c 3T3, klon 31 — enten fra ATCC eller fra ECACC blev brugt i valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Andre celler kan med held anvendes med samme testfremgangsmåde, hvis dyrkningsbetingelserne er tilpasset disse cellers særlige behov, men det er nødvendigt at bevise deres ækvivalens.

Cellerne må regelmæssigt undersøges for kontamination med mycoplasma og må kun anvendes, hvis en sådan undersøgelse falder tilfredsstillende ud.

Eftersom følsomheden for UVA har tendens til at forøges med antallet af cellegenerationer, bør Balb/c 3T3-celler med det lavest mulige antal foretrækkes, fortrinsvis mindre end 100. Det er vigtigt, at Balb/c 3T3-cellernes UVA-følsomhed kontrolleres regelmæssigt, som beskrevet under kvalitetskontrol i disse retningslinier.

1.7.1.2. Medier og dyrkningsbetingelser

Passende dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser bør anvendes til rutinedyrkning af celler og under testen. For Balb/c 3T3-cellers vedkommende er det DMEM, suppleret med 10% serum fra nyfødte kalve, 4 mM glutamin, penicillin og streptomycin og en inkubation i fugtig atmosfære ved 37 °C /7,5% CO_2. Det er specielt vigtigt, at betingelserne for dyrkning sikrer at tiden for cellecyklus er indenfor det normale for cellerne.

1.7.1.3. Fremstilling af cellekulturer

Nedfrosne celler sås i et dyrkningsmedium med en passende tæthed og subkultur anlagt mindst én gang, før de bliver anvendt i en in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest.

Til brug i fototoksicitetstesten sås cellerne ud i et dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellekulturen ikke konfluerer ved testens afslutning, dvs. når cellelevedygtigheden måles 48 timer efter udsåning af cellerne. For Balb/c 3T3-celler på en mikrotiterplade med 96 brønde er den anbefalede celletæthed 1×10^4 pr. brønd.

For hvert teststof udsås celler på samme måde i to forskellige mikrotiterplader med 96 brønde, og de føres sideløbende igennem hele testproceduren under identiske dyrkningsbetingelser, bortset fra den tid, hvor den ene plade bestråles (+UVA/synligt lys) og den anden anbringes i mørke (−UVA/synligt lys).

1.7.1.4. Metabolisk aktivering

Medens det for alle in vitro-test til påvisning af genotoksisk og carcinogenotoksisk potentiale er nødvendigt at anvende et stofskifteaktiverende system, kendes der, for så vidt angår fototoksicitet, endnu ikke noget kemikalie, der kræver et sådant stofskifteaktiverende system for at kunne fungere som et fototoksin in vivo eller in vitro. Det er således ikke i nærværende test hverken nødvendigt eller videnskabeligt berettiget at anvende et stofskifteaktiverende system.

1.7.1.5. Teststof/fremstilling

Teststoffer skal være frisk fremstillede lige før brugen, medmindre data for deres stabilitet påviser, at opbevaring kan accepteres. Fremstilling under rødt lys kan være nødvendigt, dersom hurtig fotodegradation kan finde sted.

Teststofferne bør opløses i saltvand med stødpudevirkning, f.eks. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) eller fysiologisk saltvand med phosphatstødpude (PBS), som, for at undgå interferens under bestrålingen, ikke må indeholde proteinkomponenter eller lysabsorberende pH-indikatorer.

Testkemikalier med begrænset opløselighed i vand bør opløses i passende opløsningsmiddel i 100 gange den ønskede slutkoncentration og derefter fortyndes 1:100 med stødpude-saltopløsning. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, skal det forefindes i et konstant volumen på 1 % (v/v) i alle kulturer, dvs. i de negative kontroller såvel som i alle fortyndinger af teststoffet.

Dimethylsulphoxid (DMSO) og ethanol (EtOH) anbefales som opløsningsmidler. Andre opløsningsmidler med lav cytotoksicitet (f.eks. acetone) kan være passende, men de skal omhyggeligt undersøges for særlige egenskaber, f.eks. reaktion med teststoffet, quenching af den fototoksiske effekt, evnen til at opfange radikaler.

Vortexblanding og/eller ultralydbehandling og/eller opvarmning til 37 °C kan anvendes for at øge opløsningsprocessen.

1.7.1.6. UV-bestråling/fremstilling

Lyskilde: valget af en passende lyskilde med passende filter er den mest afgørende faktor i testning for fototoksicitet. UVA og synligt lys ledsages almindeligvis af fotosensibilisering (7) (10), mens UVB er mindre relevant og direkte stærkt cytotoksisk i stigende grad op til 1000 gange fra 313 til 280 nm (11). Som kriterium for valg af den rigtige lyskilde er det vigtigt, at lyskilden udsender bølgelængder, som absorberes af teststoffet, og at lysdosis (opnået indenfor en rimelig tid) er tilstrækkelig til påvisning af stoffer, der er kendt for fotosensibilisering. Yderligere bør de anvendte bølgelængder og doser, inklusive varmepåvirkning (infrarødt lys), ikke være unødigt skadelige for testsystemet.

Lamper med kunstigt sollys regnes for den optimale lyskilde. Lys fra både xenon- og (doteret) kviksølvmetalhalidlysbuer bruges. Sidstnævnte har den fordel, at den udsender mindre varme og er billigere, men den matcher ikke sollyset perfekt. Eftersom alle kunstige sollyskilder udsender betydelige mængder UVB, bør de forsynes med passende filtre for at svække de meget toksiske UVB-bølgelængder.

Til in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bør et bestrålingsspektrum praktisk taget uden UVB anvendes (UVA:UVB $\sim$ 1:20). Et eksempel på den spektrale strålingsfordeling fra det i valideringsundersøgelsen af in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten anvendte kunstige sollys er offentliggjort (3).

Dosimetri: strålingsintensiteten (irradiance) skal regelmæssigt checkes før hver test for fototoksicitet, ved hjælp af et passende bredbåndet UV-meter. UV-meteret skal være kalibreret til lyskilden. Dets funktionsevne skal checkes, til hvilket formål brugen af et reference UV-meter af samme type og identisk kalibrering anbefales. Ideelt er det med større intervaller at bruge et spektroradiometer for at måle den spektrale strålingsintensitet fra den med filter forsynede lyskilde og for at checke kalibreringen af det bredbåndede UV-meter, men til anvendelse af sådant apparatur kræves passende uddannet personale.

En dosis på 5 J/cm^2 UVA blev i valideringsundersøgelsen fastlagt som værende uden cytotoksisk effekt på Balb/c 3T3-celler og tilstrækkeligt kraftig til at aktivere selv svagt fototoksiske kemikalier. For at opnå 5 J/cm^2 inden for en periode på 50 minutter skal strålingsintensiteten sættes til 1,666 mW/cm^2. Hvis man anvender andre celler eller en anden lyskilde, skal UVA-dosis rettes til, så den ikke er skadelig for cellerne, men tilstrækkelig til at påvise standardfototoksiner. Lyseksponerinstiden beregnes på følgende måde:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{lysdosis (J/cm}^2) \times 1000}{\text{strålingsintensitet (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$$

1.7.2. *Testbetingelser*

Højeste koncentration af et teststof bør ikke overskride 100 µl/ml, idet alle fototoksiske kemikalier er fundet ved brug af lavere koncentrationer, medens højere koncentrationer har tendens til at give falsk positive resultater (13). PH i opløsningen med den højeste koncentration af teststoffet bør for at være rimelig ligge mellem 6,5 og 7,8.

De forskellige koncentrationer af et teststof med (+UVA) eller uden (–UVA) lys bør fastlægges i et forudgående forsøg. Koncentrationerne, deres intervaller og deres højeste og laveste grænse skal justeres sådan, at koncentration/respons-kurverne er tilstrækkeligt underbygget af de eksperimentelle data. Geometrisk fortyndingsrække (med en konstant fortyndingsfaktor) bør anvendes.

1.7.3. *Fremgangsmåde* ([1])

1.7.3.1. 1. dag

Der fremstilles en suspension af 1×10^5 celler/ml i et kulturmedium. 100 µl af det rene kulturmedium afpipetteres i de perifere brønde i en mikrotiterplade med 96 brønde til vævskultur, disse udgør de negative kontroller. I de resterende brønde afpipetteres 100 µl af cellesuspensionen med 1×10^5 celler/ml (= 1×10^4 celler/brønd). Der fremstilles 2 plader pr. teststof, den ene til bestemmelse af cytotoksicitet (–UVA) og den anden til bestemmelse af fototoksicitet (+UVA).

Cellerne inkuberes i 24 timer (37 °C /7,5 % CO_2), indtil der har dannet sig et halvt sammenflydende enkeltlag. Denne inkubationsperiode giver cellerne mulighed for at regenerere og vedhæfte sig samt for eksponentiel vækst.

1.7.3.2. 2. dag

Efter inkubationen dekanteres kulturmediet fra cellerne, og der vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS pr. brønd. Der tilsættes 100 µl EBSS/PBS indeholdende den passende koncentration af teststoffet eller kun 100 µl opløsningsmiddel (negativ kontrol). Der anvendes 8 forskellige koncentrationer af teststoffet. Cellerne inkuberes med teststoffet i mørke i 60 minutter (37 °C /7,5 % CO_2).

Under +UVA-forsøget bestråles cellerne ved stuetemperatur i 50 minutter gennem låget på mikrotiterpladen med 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Med en elektrisk vifte hindres dannelse af kondensvand under låget. Den tilsvarende –UVA-plade opbevares i mørke ved stuetemperatur ligeledes i 50 minutter.

Testopløsningen dekanteres, vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS. Kulturmediet erstattes med EBSS/PBS og inkuberes (37 °C /7,5 % CO_2) til næste dag (18-22 timer).

1.7.3.3. 3. dag

Mikroskopisk evaluering

Cellerne undersøges i mikroskop med fasekontrast. Forandringer i cellernes morfologi, som skyldes cytotoksiske virkninger fra teststoffet, noteres. Dette check anbefales for at udelukke fejl i forsøget, men noterne bruges ikke til evaluering af cytotoksicitet eller fototoksicitet.

Neutral Red's optagelse i cellerne

Cellerne vaskes med 150 µl forvarmet EBSS/PBS. Vaskeopløsning fjernes ved at banke let på pladen. 100 µl Neutral Red-opløsning tilsættes, inkuberes i fugtig atmosfære ved 37 °C og 7,5 % CO_2 i 3 timer.

Efter inkubationen fjernes Neutral Red-opløsningen, og cellerne vaskes med 150 µl EBSS/PBS. Der dekanteres og trykkes efter med sugende papir, så alt EBSS/PBS fjernes. (Eventuelt: pladen centrifugeres, så væsken slynges bort).

Der tilsættes nøjagtig 150 µl opløsning af frisk fremstillet ethanol/eddikesyre, som ekstraherer Neutral Red.

Mikrotiterpladen rystes hurtigt på en dertil beregnet shaker i 10 minutter, indtil al Neutral Red er fjernet fra cellerne og har dannet en homogen opløsning.

OD af Neutral Red-ekstraktet måles ved 540 nm i et spektrofotometer, med de negative kontroller som reference. Resultaterne opbevares i et passende filformat (f.eks. ASCII) med henblik på senere analyse.

([1]) Yderligere detaljer findes i reference (12).

2. DATA

2.1. Kvalitative og kvantitative data

Resultaterne af undersøgelsen skal give mulighed for en analyse af koncentration/respons fremkommet med og uden bestråling af UVA/synligt lys. Hvis der påvises cytotoksicitet, skal man anføre højeste og laveste undersøgte koncentration, og de forskellige koncentrationer, der er anvendt, skal tilsammen indtegnes på en kurve over tallene. Da et teststof i mørke (– UVA) kan være uden cytotoksisk effekt i koncentrationer op til de 100 µg/ml, som er sat som grænse, men stærkt cytotoksisk, når det bliver bestrålet (+ UVA), kan det være nødvendigt at undersøge det pågældende stof i forskellige fortyndingsrækker i de to systemer. Hvis der ikke påvises cytotoksicitet, hverken med UVA/synligt lys eller uden UVA/synligt lys, behøver man ikke anvende så mange forskellige koncentrationer i undersøgelsen.

Et klart positivt resultat kræver ikke bekræftelse i en ny undersøgelse, og det samme gælder klart negative resultater, hvis stoffet er undersøgt i tilstrækkeligt høje koncentrationer. I disse tilfælde er det tilstrækkeligt med ét forsøg, hvis der forud herfor er gennemført et eller flere forberedende forsøg, med henblik på at finde de rette koncentrationer.

Usikre resultater, der ligger nær grænseværdien, skal kontrolleres ved at gentage undersøgelsen.

Hvis det er nødvendigt at gentage en undersøgelse, kan det være påkrævet at variere forsøgsbetingelserne for at opnå et klart resultat. Af central betydning i denne sammenhæng er fremstilling af flere opløsninger med teststoffet. En ændring heri (co-solvens, blanding, ultralydbehandling) kan være særdeles relevant ved gentagelsen af en undersøgelse. Alternativt kan en ændring i inkubationstiden før bestråling overvejes. En kortere tid kan være relevant for stoffer, der er ustabile i vandig opløsning.

2.2. Behandling af resultaterne

Hvor det er muligt, fastlægges den koncentration af teststoffet, der giver en 50 % hæmning af celle-NRU (EC_{50}). Dette kan gøres ved anvendelse af passende ikke-lineær regression (fortrinsvis en Hill-funktion eller logistisk regression) på koncentration/respons-data eller andre passende procedurer (14). Før EC_{50} anvendes til videre beregninger, skal beregningerne checkes. Alternativt kan beregningen af EC_{50} foretages grafisk. Det anbefales at anvende sandsynlighedspapir (x-akse: log, y-akse: probit), da koncentration/respons-funktionen ofte vil være næsten lineær efter denne transformation.

2.3. Evaluering af resultaterne (forsøgsmodeller, der skal forudsige noget om stoffers virkning)

2.3.1. *Forsøgsmodel 1, der skal forudsige noget om fotoirritationsfaktoren (PIF)*

Hvis der opnås komplette koncentration/respons-kurver både med lys (+ UVA) og uden (– UVA) lys, kan fotoirritationsfaktoren (PIF) beregnes efter følgende formel:

(a) $$PIF = \frac{EC_{50}\,(-\,UV)}{EC_{50}\,(+\,UV)}$$

PIF < 5 peger ikke på noget fototoksisk potentiale, mens PIF ≥ 5 pege på fototoksisk potentiale.

Hvis et kemikalie kun er cytotoksisk + UVA, men ikke ved undersøgelsen – UVA, kan PIF ikke beregnes, selv om resultatet peger på et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde kan »> PIF« beregnes, hvis (– UV)-cytotoksicitetstesten udføres til og med den højeste testkoncentration (C_{max}), og denne værdi anvendes til beregningen af »> PIF«:

(b) $$> PIF = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{EC_{50}\ (+\,UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »> PIF«, peger enhver værdi > 1 på et fototoksisk potentiale.

Hvis hverken EC_{50} (– UV) og EC_{50} (+ UV) kan beregnes, fordi kemikaliet selv ikke i den højeste testkoncentration udviser cytotoksicitet, er der ikke tale om et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde anvendes et formelt »PIF = *1« til at karakterisere resultatet.

(c) $$PIF = *1 = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{C_{max}\ (+\,UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »PIF = *1«, peges der ikke på noget fototoksisk potentiale.

I tilfældene (b) og (c) skal koncentrationerne fundet i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten nøje tages i betragtning, når der peges på et fototoksisk potentiale.

2.3.2. *Forsøgsmodel 2, der skal udsige noget om den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)*

Alternativt kan anvendes en ny model til påvisning af fototoksisk potentiale. Den er blevet udviklet ud fra data opnået under EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen (15) og blindtestet i en påfølgende in vitro-undersøgelse af UV-filterkemikaliers fototoksicitet (13). Denne model kommer uden om PIF-modellens begrænsninger i de tilfælde, hvor EC_{50} ikke kan findes. Modellen anvender den gennemsnitlige lyseffekt (MPE), et mål, som er baseret på en sammenligning af komplette koncentration/respons-kurver. Humboldt Universitetet i Berlin) har udviklet et computerprogram til MPE-modellen, som kan fås gratis.

2.4. **Tolkning af resultaterne**

Et positivt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten (PIF ≥ 5 eller MPE ≥ 0,1) viser, at teststoffet er fototoksisk. Hvis et sådant resultat er opnået ved koncentrationer under 10 μg/ml, er det sandsynligt, at teststoffet også in vivo er fototoksisk ved lyspåvirkning. Hvis et positivt resultat kun er opnået ved den højeste testkoncentration på 100 μg/ml, kan det være nødvendigt med yderligere overvejelser over stoffets risikoegenskaber eller fototoksicitet. Disse overvejelser kan gå på data vedrørende penetration, absorption og mulig akkumulation af stoffet i huden eller på brugen af en alternativ test, f.eks. en in vitro-hudtest med human hud, med henblik på af- eller bekræftelse af stoffets risikoegenskaber.

Et negativt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten (PIF > 5 eller MPE < 0,1) viser at teststoffet ikke er fototoksisk over for pattedyrceller dyrket på den beskrevne måde. I de tilfælde, hvor stoffet viser negative resultater helt op til den højeste koncentration på 100 μg/ml, betyder et negativt resultat, at stoffet ikke er fototoksisk, og at fototoksicitet in vivo er usandsynlig. Konklusionen vil være den samme, hvis der fremkommer identiske koncentrationstoksicitetssvar (EC_{50}+UV og EC_{50}−UV) ved lavere koncentrationer. Hvis der derimod ikke påvises toksicitet (+UV og −UV), og hvis opløseligheden i vand har begrænset den mulige koncentration til værdier under 100 μg/ml, kan man betvivle testens egnethed til det pågældende stof, og bekræftende undersøgelser må tages i betragtning (f.eks. en in vitro-hudmodel eller en ex vivo-hudmodel eller en in vivo-test).

3. **RAPPORTERING**

Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende information:

Teststoffet:

— Identifikationsdata og CAS-nummer, hvis kendt

— Fysiske egenskaber og renhedsgrad

— Fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen

— Stabilitet og fotostabilitet, hvis kendt

Opløsningsmiddel:

— Begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— Teststoffets opløselighed i opløsningsmidlet

— Mængden (i procent) af opløsningsmiddel i kulturmediet (EBSS eller PBS)

Celler:

— Celletype og oprindelse

— Fravær af mycoplasma

— Antal generationer, hvis kendt

— Cellernes følsomhed for UVA, målt med det strålingsudstyr, som anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten

Testbetingelser (a); inkubation før og efter udsættelsen for kemikaliet:

— Type og sammensætning af dyrkningsmediet

— Omstændigheder ved inkubationen (CO_2-koncentration, temperatur, fugtighed)

— Varighed af inkubationen (før og efter udsættelsen for kemikaliet)

Testbetingelser (b); udsættelsen for kemikaliet

— Begrundelse for valg af koncentrationer af teststoffet både med og uden bestråling med UV/synligt lys

— Begrundelse for den største koncentration anvendt ved undersøgelsen, dersom stoffet er tungtopløseligt, og cytotoksicitet ikke er påvist

— Type og sammensætning af behandlingsmediet (stødpude-salt-opløsningen)

— Varigheden af udsættelsen for det kemiske stof

Testbetingelser (c); bestråling

— Begrundelse for valget af lyskilde

— Lyskildens spektrale strålingskarakteristik

— Det (de) anvendte filterfiltres transmission/absorptions-karakteristik

— Det anvendte spektroradiometers karakteristik og detaljeret beskrivelse af dets kalibrering

— Afstanden mellem lyskilden og testsystemet

— UVA-strålingsintensiteten (irradiance) for den pågældende afstand udtrykt i mW/cm^2

— Varigheden af udsættelsen for UV/synligt lys

— UVA-dosis (strålingsintensitet × tid) udtrykt i J/cm^2

— Temperaturen i cellekulturen under bestrålingen og den tilsvarende cellekultur samtidigt opbevaret i mørke

Testbetingelser (d); NRU-testen

— Sammensætning af Neutral Red-mediet

— Varigheden af inkubationen med NR

— Omstændigheder ved inkubationen (CO_2-koncentration, temperatur, fugtighed)

— Omstændighederne ved ekstraktion af NR (ekstraktionsmiddel, varighed)

— Bølgelængde anvendt ved den spektrofotometriske aflæsning af OD (ekstinktionen) for NR

— Angivelse af eventuel referencebølgelængde

— Indholdet i brønden anvendt til eventuel måling af negative kontroller

Resultater

— Cellelevedygtighed for hver koncentration af teststoffet udtrykt som procent af levedygtigheden i kontrollerne

— Koncentration/respons-kurver (koncentration af teststoffet over for den relative cellelevedygtighed), fremkommet i samhørende eksperimenter, + UVA og − UVA

— Analyse af data af kurverne over koncentration/respons; hvis muligt beregning/kalkulation af EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (− UVA)

— Sammenligning af de to koncentration/respons-kurver, som er fremkommet ved bestråling med og uden UVA/synligt lys, enten ved beregning af fotoirritationsfaktor (PIF), eller beregning af den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)

— Klassifikation af fototoksiciteten

— Kriterier for accept af test (a), samtidig negativ kontrol:

  — Absolut levedygtighed (ekstinktion (OD) for NR-ekstraktet) for bestrålede og ikke-bestrålede celler

  — Forklarende data for den negative kontrol, gennemsnit og standarddeviation

— Kriterier for accept af test (b), samtidig positiv kontrol:

  — EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (− UVA) og PIF for den positive kontrols kemikalie

  — forklarende data for den positive kontrols kemikalie: EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (− UVA) og PIF, gennemsnit og standarddeviation

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **REFERENCER**

(1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, s. 793-796.

(2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, s. 7-8.

(3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA »*In vitro* phototoxicity« validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, s. 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, s. 95-102.

(6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI-XXXV.

(7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, s. 314-348.

(8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, s. 79-110.

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, s. 119-124.

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, s. 515-530.

(11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, s. 1825-1829.

(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project »*In Vitro* Photoirritation«.

(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, s. 679-708.

(14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, s. 127-138.

(15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, s. 445-462.

Tillæg

3T3 NRU-fototoksicitetstestens rolle i et sekvensskema til testning af kemikaliers fototoksicitet

