32000L0033

8.6.2000 ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ L 136/90

SMĚRNICE KOMISE 2000/33/ES

ze dne 25. dubna 2000,

kterou se po dvacáté sedmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek (*)

(Text s významem pro EHP)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 67/548/EHS ze dne 27. června 1967 o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek [1], naposledy pozměněnou směrnicí Evropského parlamentu a Rady 1999/33/ES [2], a zejména na článek 28 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) V příloze V směrnice 67/548/EHS se stanoví metody pro stanovení fyzikálně-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látek a přípravků. Je nezbytné přizpůsobit tuto přílohu technickému pokroku.

(2) Podle čl. 7 odst. 2 směrnice Rady 86/609/EHS ze dne 24. listopadu 1986 o sbližování právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely [3] nesmí být pokus, při němž má být použito zvíře, proveden, je-li rozumně a prakticky dostupná jiná vědecky uspokojivá metoda.

(3) Komise zamýšlí zařadit do přílohy V směrnice 67/548/EHS určité alternativní zkušební metody, při nichž nejsou používána zvířata, s cílem zpřístupnit je pro zkoušení chemických látek podle čl. 3 odst. 1 směrnice 67/548/EHS.

(4) Opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro přizpůsobení technickému pokroku směrnic o odstranění technických překážek obchodu na úseku nebezpečných látek a přípravků,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Text příloh I a II této směrnice se vkládá do části B přílohy V směrnice 67/548/EHS.

Článek 2

1. Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. října 2001. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tyto předpisy přijaté členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

2. Členské státy sdělí Komisi znění hlavních ustanovení vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice, a srovnávací tabulku mezi směrnicí a přijatými vnitrostátními ustanoveními.

Článek 3

Tato směrnice vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Článek 4

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 25. dubna 2000.

Za Komisi

Margot WALLSTRÖM

členka Komise

(*) Přijato před přizpůsobením po dvacáté šesté.

(1) Úř. věst. 196, 16.8.1967, s. 1.

(2) Úř. věst. L 199, 30.7.1999, s. 57.

(3) Úř. věst. L 358, 18.12.1986, s. 1.

PŘÍLOHA I

„B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

1. **METODA**

1.1 **Úvod**

Dvě zkoušky *in vitro* na leptavé účinky na kůži na principu stanovení transkutánního elektrického odporu kůže potkana (TER) a zkouška s využitím modelu lidské kůže byly Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM, Společné výzkumné středisko Evropské Komise) (1, 2, 3) schváleny jako vědecky platné. Validační studie ECVAM prokázala, že oběma zkouškami lze spolehlivě rozlišit známé látky leptající a neleptající kůži. Protokol o zkoušce založené na modelu lidské kůže dále umožnil správně rozlišit stupně žíravých účinků (známé látky způsobující těžké poleptání, R 35 a ostatní látky způsobující poleptání kůže, R 34) (2). Popis a postup obou zkoušek je uveden; volba zkoušky, která má být použita, závisí na specifických požadavcích a prioritách uživatele.

Viz také Obecný úvod, část B.

1.2 **Definice**

Poleptání kůže: nevratné poškození kůže po aplikaci zkoušeného materiálu.

1.3 **Referenční látky**

Nespecifikovány, avšak viz body 1.5.3.4 a 1.7.2.3.

1.4 **Podstata zkušební metody — zkouška TER na kůži potkana**

Zkoušený materiál je až po 24 h aplikován na epidermální stranu terčíků kůže humánně usmrcených mladých potkanů. Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*), která je měřena jako snížení vlastního TER pod prahovou úroveň (5 kΩ) (4, 5). Dráždivé a nedráždivé látky nesnižují TER pod prahovou hodnotu. Do zkušebního postupu pro povrchově aktivní látky a neutrální organické látky (definice viz literatura (6)) lze zařadit stupeň pro stanovení vázání barviva, aby se omezilo množství falešně pozitivních výsledků získaných právě pro tyto druhy chemických látek (2, 7).

1.5 **Popis zkušební metody — zkouška TER na kůži potkana**

1.5.1 *Zvířata*

Terčíky kůže musí být připraveny z mladých (20 — 23 denních) potkanů (Wistar nebo srovnatelný kmen). Hřbetní a boční srst se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté omyjí opatrným otíráním, přičemž se testovací plocha ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí a čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů (k přípravě kůže nesmí být použita zvířata starší než 31 dnů).

1.5.2 *Příprava terčíků kůže*

Zvířata se humánně usmrtí. Z každého zvířete se poté opatrně odstraní hřbetní kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Kůže se poté přeloží přes konec teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 1. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté opatrně pokryje vrstvou vazelíny. Trubička držená pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého (154 mM) (obrázek 2).

1.5.3 *Zkušební postup*

1.5.3.1 Aplikace zkoušeného materiálu

Kapalná zkoušená látka (150 µl) se aplikuje na epidermis uvnitř trubičky (obr. 2). Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 µl) a trubička se lehce protřepe. Mezi látkami a kůží by mělo dojít k maximálnímu styku. U některých látek toho může být dosaženo zahřátím až na 30 °C, aby se zkoušená látka roztavila, nebo rozemletím na zrnitý materiál nebo na prášek.

Ke zkoušce každé látky se použijí tři terčíky kůže. Zkoušená látka se aplikuje po dobu 24 h (viz také bod 1.5.3.4). Zkoušená látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o teplotě nejvýše 30 °C. Odstranění zkoušených látek, které v trubičce ztuhly, lze usnadnit omytím proudem vody teplé až 30 °C.

1.5.3.2 Měření TER

TER se měří nízkonapěťovým impedančním můstkem pro střídavý proud (např. AIM 401 nebo 6401 nebo ekvivalentní). Před měřením se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70 % ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol odstraní převrácením trubice a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku síranu hořečnatého (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v kΩ/terčík kůže (obrázek 2). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 1. Svorka vnitřní (silné) elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku síranu hořečnatého nemění. Vnější (tenká) elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi spodkem pružinové svorky a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 1), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu.

Je třeba si všimnout, že je-li naměřená hodnota vyšší než 20 kΩ, může to být způsobeno vrstvou zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a 10 s se protřepává. Roztok síranu hořečnatého se odstraní a měření se opakuje s čerstvým síranem hořečnatým.

Výsledky TER (střední hodnoty) jsou přijatelné, pokud hodnoty pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozpětí metody. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou doporučeny tyto kontrolní látky a jejich přijatelná rozpětí odporu:

Kontrola	Látka	Rozpětí odporu (kΩ)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková (36 %)	0,5–1,0
Negativní	Destilovaná voda	10–25

1.5.3.3 Upravený postup pro povrchově aktivní látky a neutrální organické látky

Jsou-li hodnoty TER pro povrchově aktivní látky nebo organické látky jakožto zkoušené látky menší nebo rovny 5 kΩ, lze provést na tkáni stanovení průniku barviva. Tímto postupem se zjistí, zda výsledky nejsou falešně pozitivní (2).

1.5.3.3.1 Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B

Po předchozí aplikaci zkoušené látky se na epidermální stranu každého terčíku kůže aplikuje na 2 h 150 µl 10 % roztoku barviva sulforhodaminu B v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 s omývají proudem vody o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20 ml skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 min. protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje, a poté se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30 % roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C. Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 min. při 21 °C (relativní odstředivá síla ~ 175). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30 % (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (*A*) se měří při přibližně 565 nm.

1.5.3.3.2 Výpočet obsahu barviva

Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot A (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže a poté se vypočte jeho střední hodnota. Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou pro uvedení kontrolní látky doporučeny tyto přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (μg/terčík kůže)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková (36 %)	40-100
Negativní	Destilovaná voda	15-35

1.5.3.4 Doplňkové informace

Látky lze rovněž aplikovat na terčíky kůže na kratší dobu (např. 2 hodiny), aby se identifikovaly ty materiály, které jsou silně leptavé. Validační studie však ukázala, že stanovení TER nadhodnocuje leptavé účinky u několika zkoušených chemických látek při jejich aplikaci na terčík kůže po dobu 2 hodin (2), třebaže toto stanovení umožnilo správnou identifikaci látek s leptavými účinky a látek bez leptavých účinků při 24hodinové aplikaci.

Vlastnosti a rozměry zkušebního zařízení a použitý experimentální postup mohou mít vliv na získané hodnoty TER. Práh 5 Ω pro předpověď leptavých účinků byl odvozen z údajů získaných se zařízením a postupem, jež jsou popsány v této metodě. Doporučuje se tedy kalibrovat metodou a určit prahovou hodnotu odporu zkoušením řady referenčních standardů vybraných z chemických látek použitých ve validační studii (3).

1.6 Podstata zkušební metody — stanovení pomocí modelu lidské kůže

Zkoušený materiál je aplikován až po dobu 4 hodin na trojrozměrný model lidské kůže sestávající z rekonstruované epidermis a funkční rohovité vrstvy. Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit při specifikované expoziční době pokles životaschopnosti buněk (stanovený např. použitím zkoušky redukce MTT) pod definovanou prahovou úroveň. Podstata zkoušky je založena na hypotéze, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (difuzí nebo erozí) a jsou dostatečně cytotoxické, aby způsobily smrt buněk v hlubších buněčných vrstvách.

1.7 Popis zkušební metody — stanovení pomocí modelu lidské kůže

1.7.1 *Modely lidské kůže*

Modely lidské kůže mohou pocházet z různých zdrojů, musí však splňovat určitá kritéria. Model musí mít funkční rohovitou vrstvu a vrstvu živých buněk pod ní. Bariérová funkce rohovité vrstvy musí být dostatečná. To lze prokázat demonstrací rezistence modelu k cytotoxickým látkám, které normálně neproniknou rohovitou vrstvou. Musí se prokázat, že model poskytuje za definovaných experimentálních podmínek reprodukovatelné výsledky.

Životaschopnost živých buněk v modelu musí být dostatečně vysoká, aby bylo možné dobře rozlišit pozitivní a negativní kontrolní látky. ivotaschopnost buněk (stanovená např. redukcí MTT, tj. měřením hodnoty absorbance *A*) po expozici negativní kontrolní látce musí být v mezích přijatelných pro daný model. Podobně hodnoty životaschopnosti buněk po expozici pozitivní kontrolní látce (ve srovnání s životaschopností pro negativní kontrolní látku) musí být ve specifikovaných mezích. Nejdůležitější přitom je, aby model odpovídal mezinárodním standardům pro validaci (2).

1.7.2 *Zkušební postup*

1.7.2.1 Aplikace zkoušeného materiálu

U kapalných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby pokrylo povrch kůže (minimálně 25 μl/cm^2). U pevných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby pokrylo kůži, a zkoušená látka by měla být ovlhčena, aby byl zajištěn dobrý styk s kůží; pevné látky by měly být podle potřeby před aplikací rozemlety na prášek. Musí být prokázáno, že aplikační metoda je použitelná pro široké spektrum chemických látek (2). Po uplynutí expoziční doby musí být zkoušený materiál z povrchu kůže opatrně spláchnut fyziologickým roztokem.

1.7.2.2 Měření životaschopnosti buněk

K měření životaschopnosti buněk může být použita jakákoli validovaná kvantitativní metoda. Nejčastěji se používá stanovení redukce MTT, pro níž se v různých laboratořích prokázalo, že poskytuje správné a reprodukovatelné výsledky (2). Terčík kůže se umístí do roztoku MTT o koncentraci 0,3 mg/ml při teplotě 20-28°C na dobu 3 hodin. Sraženina modrého formazanu se poté extrahuje (rozpouštědlem) a koncentrace formazanu se stanoví měřením absorbance *A* při vlnové délce 545 až 595 nm.

1.7.2.3 Doplňkové informace

Použitý model kůže a přesné zaznamenání expoziční doby, postupu oplachování atd. budou mít velký vliv na výsledky životaschopnosti buněk. Doporučuje se, aby metodika a předpovědní model byly kalibrovány zkoušením řady referenčních standardů vybraných z chemických látek použitých ve validační studii ECVAM (3). Je rozhodující, aby použitá metoda v souladu s mezinárodními standardy vykazovala v rámci laboratoře a mezi laboratořemi reprodukovatelnost pro široké spektrum chemických látek. Metoda musí splňovat alespoň již definovaná kritéria pro vědeckou validitu (2) a výsledky takové validační studie musí být publikovány ve vědeckém časopise s předcházející odbornou recenzí.

2. **ÚDAJE**

2.1 **Zpracování výsledků**

2.1.1 *Zkouška TER na kůži potkana*

Hodnoty odporu (kΩ) pro zkoušený materiál, pozitivní a negativní kontrolu a pro všechny standardní referenční chemické látky včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, o středních hodnotách a o odvozené klasifikaci by měly být uvedeny ve formě tabulky.

2.1.2 *Zkouška s modelem lidské kůže*

Hodnoty absorbance *A* a vypočtené hodnoty životaschopnosti buněk v procentech pro zkoušený materiál, pozitivní a negativní kontroly a pro všechny standardní referenční chemické látky včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, o středních hodnotách a o odvozené klasifikaci by měly být uvedeny ve formě tabulky.

2.2 **Hodnocení a interpretace výsledků**

2.2.1 *Zkouška TER na kůži potkana*

Je-li hodnota TER dosažená pro zkoušenou látku větší než 5 kΩ, není látka žíravá. Je-li hodnota TER menší nebo rovna 5 kΩ a nejde o povrchově aktivní látku nebo neutrální organickou látku, je látka žíravá.

U povrchově aktivních látek nebo neutrálních organických látek, které dávají hodnoty TER menší nebo rovné 5 kΩ, lze provést stanovení průniku barviva. Je-li střední obsah barviva v terčíku kůže větší nebo roven střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 36 % HCl jakožto pozitivní kontroly, je zkouška zkoušené látky skutečně pozitivní, a látka je tedy žíravá. Je-li střední obsah barviva v terčíku kůže menší než střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 36 % HCl, je zkouška falešně pozitivní, a látka tedy není žíravá.

2.2.2 *Zkouška s modelem lidské kůže*

Hodnoty obsorbance *A* pro negativní kontrolu představují 100 % životaschopnost buněk; hodnoty absorbance *A* dosažené pro každý zkoušený vzorek lze použít k výpočtu relativní životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole. Hraniční procentuální podíl životaschopnosti buněk, kterým se rozlišují žíravé materiály od zkoušených materiálů, které nejsou žíravé (nebo kterým se rozlišují různé třídy leptavých účinků), musí být pro předpovědní model jasně definován před validací metody a následná validační studie musí potvrdit, že je vhodný (2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje, fyzikální vlastnosti a případně fyzikálně-chemické vlastnosti. Podobné informace by měly být uvedeny pro referenční látky, pokud byly použity.

Zkušební podmínky:

— podrobnosti použitého postupu,

— popis a zdůvodnění jakýchkoli změn.

Výsledky:

— hodnoty odporu (zkouška TER) nebo hodnoty životaschopnosti buněk v procentech (zkouška s modelem lidské kůže) pro zkoušený materiál, pozitivní a negativní kontroly a všechny standardní referenční chemické látky včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech a středních hodnotách, zpracované ve formě tabulky,

— popis jakýchkoli jiných pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, 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, 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, 471-482.

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

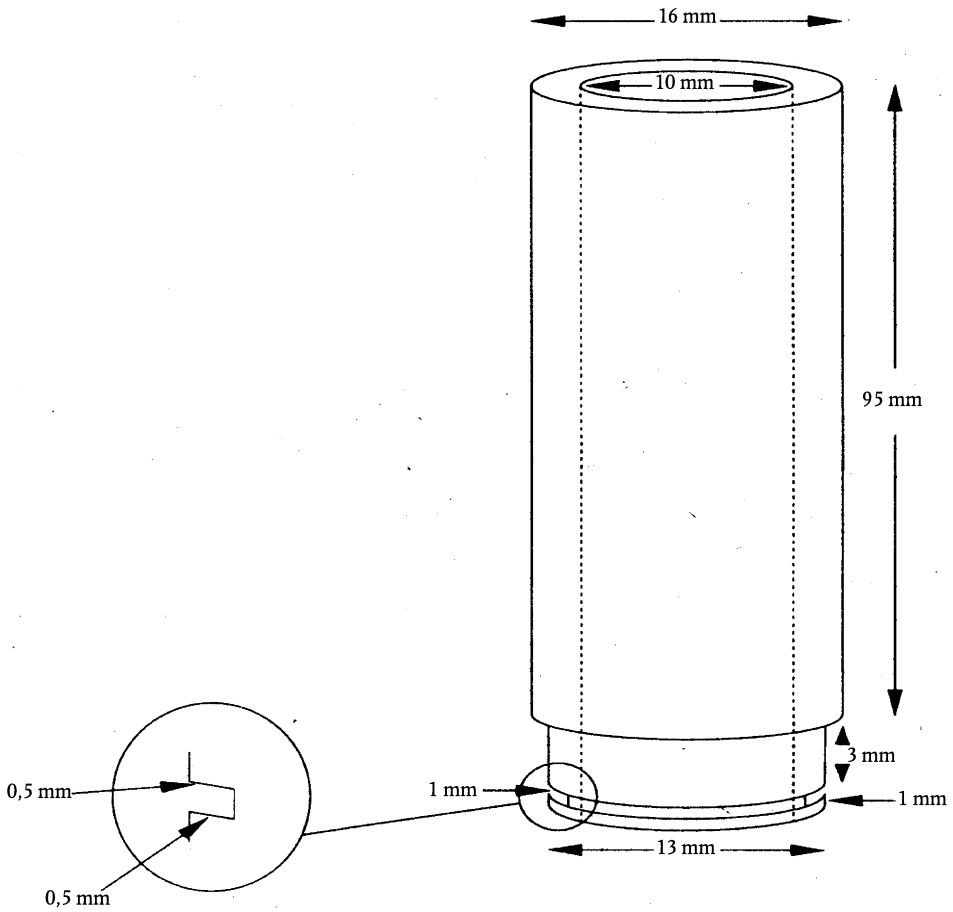
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial, Toxicology *in vitro* 6, 191-194.

(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, 709-720.

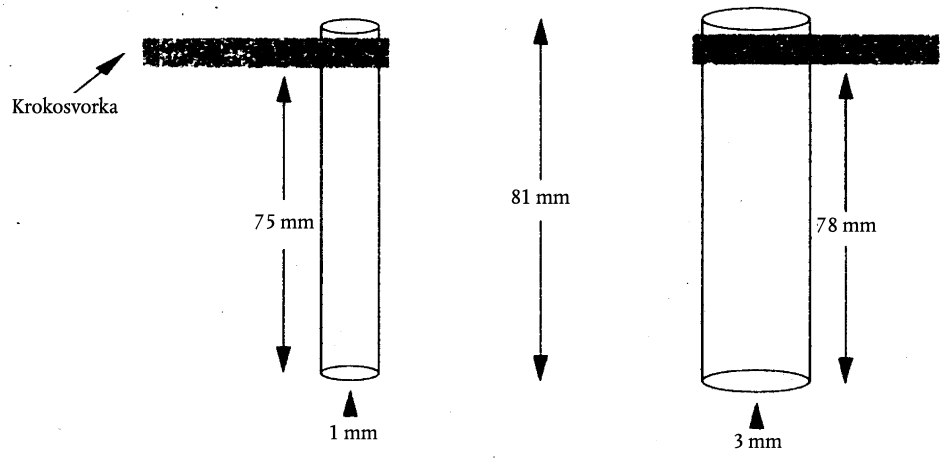
(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., Balls, M. 1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity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

Obrázek 1

Rozměry teflonové trubičky

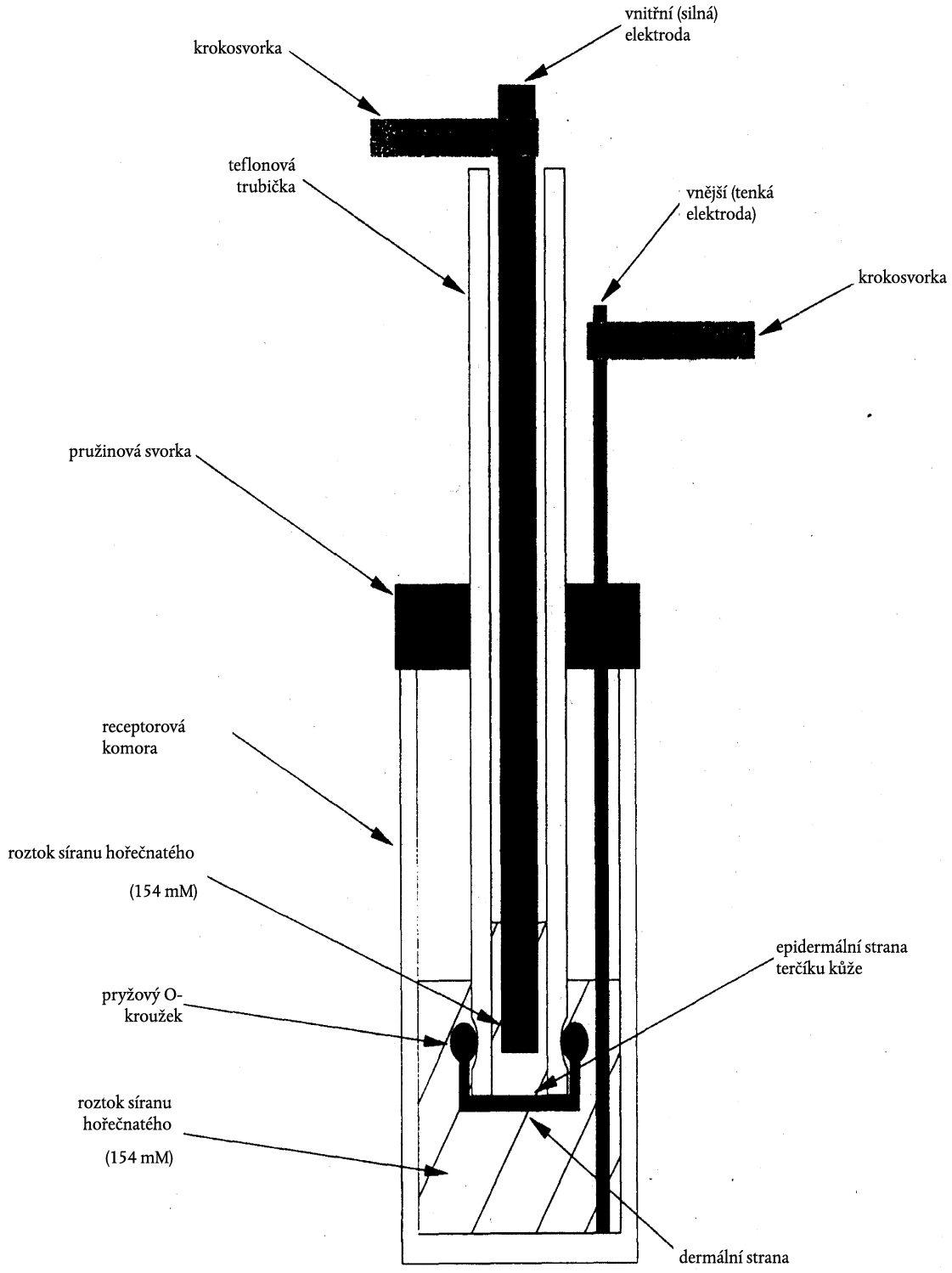


Rozměry elektrod



Obrázek 2

Přístroj pro zkoušku TER na kůži potkana



“

PŘÍLOHA II

„B.41 FOTOTOXICITA — ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU IN VITRO

1. METODA

1.1 Úvod

Fototoxicita je definována jako toxická odezva vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky.

Informace získané ze zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky, tj. existence nebo neexistence možného nebezpečí, které může plynout ze zkoušené látky ve spojení s expozicí UV záření nebo viditelnému světlu.

Protože cílem zkoušky *in vitro* z hlediska toxikologie je stanovení fototoxicity vyvolané kombinovaným působením chemické látky a světla, lze zkouškou identifikovat sloučeniny, které jsou fototoxické *in vivo* po systémovém podání a po nanesení na kůži, a rovněž sloučeniny, které působí po nanesení na pokožku jako fotoiritanty.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla vyvinuta a validována v rámci spojeného projektu EU/COLIPA v letech 1992 — 1997 (1, 2, 3) s cílem vytvořit platnou alternativu *in vitro* k různým používaným zkouškám *in vivo*. V roce 1996 doporučila pracovní skupina OECD koncepci postupných zkoušek *in vitro* pro posuzování fototoxicity (4).

Výsledky ze zkoušek fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byly porovnány s akutními fototoxickými nebo fotoiritačmi účinky *in vivo* u zvířat a u člověka a zkouška se ukázala pro předpověď těchto účinků jako vynikající. Zkouška není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, např. fotogenotoxicity, fotoalergie a fotokarcinogenity, třebaže mnoho chemických látek, které vykazují tyto specifické vlastnosti, bude ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* pozitivně reagovat. Zkouška dále není vyvinuta k tomu, aby umožnila hodnocení stupně fototoxicity.

Koncepce postupného zkoušení fototoxicity chemických látek je uvedena v dodatku.

1.2 Definice

Intenzita ozáření: intenzita ultrafialového nebo viditelného světla dopadajícího na povrch, měřená ve W/m^2 nebo mW/cm^2.

Dávka světelného záření: množství (intenzita × čas) ultrafialového (UV) nebo viditelného záření dopadajícího na povrch, vyjádřená v joulech (W × s) na plochu povrchu, např. J/m^2 nebo J/cm^2.

Vlnová pásma UV světla: označení doporučená komisí CIE (Commission Internationale de l'Eclairage): UVA (315 400 nm), UVB (280 315 nm) a UVC (100 280 nm). Používají se rovněž jiná označení: jako hranice mezi UVB a UVA je často používána hodnota 320 nm a pásmo UVA může být rozděleno na UV-A1 a UV-A2 s hranicí kolem 340 nm.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. příjem vitálního barviva neutrální červeně do buněčných lysosomů) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

Relativní životaschopnost buněk: životaschopnost v poměru k negativním kontrolám (rozpouštědlo), které prošly celým postupem zkoušky (s UV, nebo bez UV), ale nebyly exponovány zkoušeným chemickým látkám.

Předpovědní model: algoritmus používaný pro převod výsledků zkoušek toxicity na předpověď toxického potenciálu. V předložené metodice lze pro převod výsledků zkoušek fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* na předpověď fototoxického potenciálu použít faktor PIF a veličinu MPE.

PIF (photo-irritation factor — fotoiritační faktor): faktor získaný srovnáním dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (EC_{50}) zkoušené látky, a to při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem (+ UV) a bez něho (-UV).

MPE (mean photo effect — střední světelný účinek): nová veličina odvozená z matematické analýzy celého průběhu křivek závislosti účinku na koncentraci získaných při necytotoxickém ozáření UVA/vis světlem (+ UV) a bez něho (-UV).

Fototoxicita: akutní toxická reakce, vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky.

Fotoiritace: nižší úroveň pojmu ‚fototoxicita', který se používá k popisu pouze těch fototoxických reakcí, které se vyskytnou na kůži po expozici chemickým látkám (topické nebo orální). Tyto fototoxické reakce vedou vždy k nespecifickému buněčnému poškození (podobné reakci při opalování).

Fotoalergie: získaná imunologická reaktivita, ke které nedochází při první aplikaci chemické látky a světla a která vyžaduje indukční dobu jeden nebo dva týdny před tím, než lze reakci kůže prokázat.

Fotogenotoxicita: genotoxická odezva pozorovaná z genového hlediska, která je vyvolána po expozici buněk negenotoxické dávce UV/VIS světla a negenotoxické chemické látce.

Fotokarcinogenita: karcinogenita vyvolaná opakovanou aplikací světla a chemické látky. Termín fotokokarcinogenita se používá v případě, kdy je tvorba tumoru indukovaná UV zářením zesílena chemickou látkou.

1.3 Referenční látky

Vedle pozitivní kontrolní chemické látky chlorpromazinu, který by měl být souběžně zkoušen při každé zkoušce, je pro nově vyvinutou zkoušku fototoxicity 3T3 NRU doporučeno použít jako referenční chemické látky výběr z chemických látek použitých při mezilaboratorních srovnáních předložené metody (1, 3, 13).

1.4 Úvodní poznámky

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek (5, 6, 7, 8). Jejich jediným společným rysem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Grotthaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zvážením biologického zkoušení podle předložené metodiky by tedy mělo být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky (např. podle Metodiky OECD 101). Je-li molární absorpční koeficient menší než 10 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$, chemická látka nemá fotoreaktivní potenciál a nemusí být zkoušena zkouškou fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* nebo jakoukoli jinou biologickou zkouškou na nepříznivé fotochemické účinky (dodatek).

1.5 Podstata zkušební metody

Byly identifikovány čtyři mechanismy, kterými může absorpce světla (chemickým) chromoforem vést k fototoxické odezvě (7). Všechny vedou k poškození buňky. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je proto založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při zkoušení s expozicí necytotoxické dávce UVA/VIS světla a bez této expozice. Cytotoxicita je v této zkoušce vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně (NR) (9) 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření.

Buňky Balb/c 3T3 se 24 h kultivují, aby vytvořily monovrstvu. Dvě 96jamkové destičky na jednu zkoušenou chemickou látku se poté 1 h preinkubují osmi různými koncentracemi chemických látek. Poté je jedna ze dvou destiček exponována necytotoxickou dávkou UVA/VIS světla 5 J/cm^2 UVA (+ UV experiment), zatímco druhá destička se udržuje v temnu (-UV experiment). U obou destiček se poté aplikační médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 h inkubace je buněčná životaschopnost stanovena 3hodinovým příjmem neutrální červeně (NRU). Relativní buněčná životaschopnost vyjádřená v procentech vzhledem k neexponované negativní kontrole se vypočte pro každou z osmi zkušebních koncentrací. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé odezvy získané při ozáření (+ UV) a bez ozáření (-UV), obvykle při hodnotě EC_{50}, tj. při koncentraci způsobující 50 % úbytek buněčné životaschopnosti ve srovnání s neexponovanými kontrolami.

1.6 Kritéria jakosti

Citlivost buněk na UVA, dosavadní údaje: citlivost buněk na UVA by měla být pravidelně kontrolována. Buňky se nasadí při intenzitě použité ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*, příští den se ozáří dávkou UVA záření 1 až 9 J/cm^2 a buněčná životaschopnost se stanoví o den později zkouškou NRU. Buňky splňují kritérium jakosti, není-li jejich životaschopnost po ozáření 5 J/cm^2 menší než 80 % životaschopnosti kontroly udržované v temnu. Tato kontrola by měla být opakována vždy po deseti pasážích buněk.

Citlivost buněk negativní kontroly na UVA při samostatné zkoušce: zkouška splňuje kritéria jakosti, jestliže negativní kontroly (buňky v EBSS (Earlův fyziologický roztok) s 1 % dimethylsulfoxidem (DMSO) nebo 1 % ethanolem (EtOH)) nebo bez nich vykazují při + UVA experimentu životaschopnost alespoň 80 % vzhledem k životaschopnosti neozářených buněk v tomtéž rozpouštědle při souběžném experimentu v temnu (-UVA).

Životaschopnost negativní kontroly: absolutní absorbance ($A_{540\ NRU}$) měřená v extraktu NR negativních kontrol naznačí, zda 1×10^4 buněk nasazených na jednu jamku zachovalo při růstu během dvou dnů zkoušky obvyklou dobu zdvojnásobení (*doubling time*). Zkouška splňuje kritérium přijatelnosti, jestliže střední hodnota $A_{540\ NRU}$ neexponovaných kontrol je ≥ 0,2.

Pozitivní kontrola: při každé zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* musí být souběžně zkoušena známá fototoxická chemická látka. Při validační studii EU/COLIPA byl použit jako pozitivní kontrola chlorpromazin (CPZ), a je tedy doporučen. Pro CPZ zkoušený podle standardního postupu při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla definována tato kritéria přijatelnosti zkoušky: pro CPZ ozářený (+ UVA): EC_{50} = 0,1 až 0,2 μg/ml, pro CPZ neozářený (-UVA): EC_{50} = 7,0 až 90,0 μg/ml. Fotoiritační faktor (PIF), tj. posun hodnoty EC_{50}, by měl být alespoň 6.

Namísto CPZ mohou být použity jako souběžné pozitivní kontroly jiné známé fototoxické chemické látky vhodné z hlediska typu nebo rozpustnosti hodnocené zkoušené chemické látky. V takovém případě by měly být na základě dosavadních údajů jako kritéria přijatelnosti zkoušky přiměřeným způsobem definovány rozsahy hodnot EC_{50} a PIF nebo MPE (střední světelný účinek).

1.7 **Popis zkušební metody**

1.7.1 *Příprava*

1.7.1.1 Buňky

Při validační studii byla použita permanentní myší linie fibroplastů — Balb/c 3T3, klon 31 — buď z banky ATCC, nebo z banky ECACC a je tedy doporučena. Jiné buňky nebo buněčné linie mohou být při stejném zkušebním postupu použity za předpokladu, že jsou kultivační podmínky přizpůsobeny specifickým potřebám buněk, ale musí být prokázána jejich rovnocennost.

Buňky by měly být pravidelně kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty, a měly by být použity pouze tehdy, jsou-li výsledky takové kontroly uspokojivé.

Vzhledem k tomu, že citlivost buněk na UV vzrůstá s počtem pasáží, měly by být použity buňky Balb/c 3T3 z pasáže s nejnižším dosažitelným počtem pasáží, nejlépe z nižší než sté pasáže. Je důležité, aby byla citlivost buněk Balb/c 3T3 na UVA pravidelně kontrolována postupem kontroly jakosti popsaným v této metodice.

1.7.1.2 Média a kultivační podmínky

Pro rutinní buněčné pasážování a během zkušebního postupu by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky. U buněk Balb/c 3T3 se jedná o DMEM (Dulbeccova modifikace Eagleova media) obohacené 10 % novorozeneckým telecím sérem, 4mM glutaminem, penicilinem a streptomycinem a inkubaci ve vlhčené atmosféře při 37 °C/7, 5 % CO_2. Zvláště důležité je, aby kultivační podmínky zajistily, aby byl buněčný cyklus uvnitř dosavadního rozpětí pro použité buňky nebo buněčné linie.

1.7.1.3 Příprava kultur

Buňky ze zmrazených kmenových kultur se nasadí do kultivačního média ve vhodné hustotě a alespoň jednou se pasážují před použitím ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Při zkoušce fototoxicity se buňky nasazují do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence do konce zkoušky, tj. do okamžiku, kdy je po 48 h od nasazení stanovována životaschopnost. Pro buňky Balb/c 3T3 kultivované v 96jamkových destičkách je doporučeno inokulum 1×10^4 buněk na jamku.

Pro každou chemickou látku se buňky nasadí stejným způsobem do dvou oddělených 96jamkových destiček, které jsou poté souběžně podrobeny celému postupu zkoušky za stejných podmínek kromě doby, kdy je jedna z destiček ozářena (+UVA/VIS) a druhá je udržována v temnu (-UVA/VIS).

1.7.1.4 Metabolická aktivace

Zatímco použití metabolizujícího systému je obecným požadavkem při všech zkouškách *in vitro* určených pro posouzení genotoxického a karcinogenního potenciálu, není v fototoxikologii dosud známa žádná chemická látka, pro jejíž působení jako toxinu *in vivo* nebo *in vitro* je nezbytná metabolická transformace. Nepovažuje se tedy ani za nezbytné ani za vědecky zdůvodněné, aby byla předložená zkouška provedena se systémem aktivace metabolismu.

1.7.1.5 Zkoušená chemická látka/příprava

Zkoušené chemické látky musí být čerstvě připraveny bezprostředně před použitím, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost skladování. Může-li dojít k rychlé fotodegradaci, musí se příprava látky provádět pod červeným světlem.

Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny ve fyziologickém roztoku, např. v Earlově fyziologickém roztoku (EBSS) nebo ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrem (PBS), který nesmí obsahovat proteinové složky a pH indikátory absorbující světlo, aby nerušily při ozařování.

Zkoušené chemické látky s omezenou rozpustností ve vodě by měly být rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle na 100násobek požadované konečné koncentrace a poté by měly být zředěny v poměru 1:100 fyziologickým roztokem. Použije-li se rozpouštědlo, musí být přítomné v konstantní koncentraci 1 % obj. ve všech kulturách, tj. v negativní kontrole a rovněž ve všech koncentracích zkoušené chemické látky.

Doporučenými rozpouštědly jsou dimethylsulfoxid (DMSO) a ethanol (EtOH). Mohou být použita jiná vhodná méně cytotoxická rozpouštědla (např. aceton), ale měly by být pečlivě posouzeny jejich specifické vlastnosti, např. reakce se zkoušenou chemickou látku, potlačení fototoxických účinků, záchyt radikálů.

Je-li třeba, může být pro usnadnění rozpouštění použito míchání a/nebo ultrazvuk a/nebo zahřátí na 37 °C.

1.7.1.6 Ozáření UV světlem/příprava

Zdroj světla: volba vhodného zdroje světla a vhodné filtrace je kritickým faktorem zkoušení fototoxicity. Záření v pásmu UVA a ve viditelném pásmu je obvykle spojováno s fotosenzibilizací (7, 10), zatímco záření v pásmu UVB je méně relevantní a je přímo vysoce cytotoxické, přičemž jeho cytotoxicita vzrůstá mezi 313 nm a 280 nm 1 000krát (11). Kritéria pro volbu vhodného světelného zdroje by měla zahrnovat důležitý požadavek, aby zdroj světla vyzařoval světlo o vlnových délkách, které zkoušená chemická látka absorbuje, a aby dávka světelného záření (dosažitelná po přijatelnou dobu) byla dostatečná pro detekci známých fotosenzibilizujících látek. Použité vlnové délky a dávky, včetně emise tepla (infračervená oblast), by dále neměly nadměrně poškozovat testovací systém.

Simulace slunečního světla solárními simulátory se považuje za optimální zdroj světla. V solárních simulátorech se používá jak xenonová výbojka, tak vysokotlaká rtuťová halogenová výbojka. Druhá z nich má tu výhodu, že emituje méně tepla a je levnější, avšak její shoda se slunečním světlem není dokonalá. Poněvadž všechny solární simulátory vyzařují významné množství UVB záření, měly by být vhodně filtrovány, aby byly vysoce cytotoxické vlnové délky UVB zeslabeny.

Pro zkoušku fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* by mělo být použito spektrum prakticky zbavené UVB světla (UVA:UVB ~ 20:1). Příklad spektrální distribuce záření filtrovaného solárního simulátoru použitého ve validační studii zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byl publikován v literatuře (3).

Dozimetrie: intenzita světla (intenzita ozáření) se musí pravidelně před každou zkouškou fototoxicity kontrolovat za použití vhodného širokopásmového UV-metru. UV-metr musí být pro daný zdroj kalibrován. Funkčnost UV-metru by měla být kontrolována a za tímto účelem se doporučuje použít druhý referenční stejným způsobem kalibrovaný UV-metr stejného typu. V ideálním případě by měl být v delších časových odstupech použit k měření spektrální intenzity záření filtrovaného zdroje světla a ke kontrole kalibrace širokopásmového UV-metru spektroradiometr, avšak takové přístroje vyžadují odbornou obsluhu školenými osobami.

Dávka 5 J/cm^2 byla při validační studii shledána jako necytotoxická pro buňky Balb/c 3T3 a dostatečně silná k excitaci i slabě fototoxických chemických látek. Pro dosažení 5 J/cm^2 po dobu 50 min. musí být intenzita ozáření nastavena na 1,666 MW/cm^2. Jestliže je použita jiná buněčná linie nebo jiný světelný zdroj, může být dávka UVA záření mírně upravena, aby nepoškozovala buňky a byla dostatečná pro detekci standardních fototoxinů. Doba světelné expozice se vypočte tímto způsobem:

$$t\,(\text{min}) = \frac{\text{dávka světelného záření (J/cm}^2)\ 100}{\text{intenzita ozáření (mW/cm}^2)\ 60} \qquad (1\ \text{J} = .\text{W sec})$$

1.7.2 *Zkušební podmínky*

Maximální koncentrace zkoušené chemické látky by neměla překročit 100 µg/ml, neboť všechny fototoxické chemické látky byly detekovány při nižších koncentracích; při vyšších koncentracích roste výskyt falešně pozitivních výsledků (nadhodnocení). Hodnota pH nejvyšší koncentrace by měla být vyhovující (pH 6,5 — 7,8).

Rozmezí koncentrací chemických látek zkoušených se světlem (+ UVA) a bez světla (-UVA) by měly být náležitě stanoveny v předchozích experimentech pro zjištění rozmezí. Rozsah koncentrační řady a intervaly mezi koncentracemi musí být zvoleny tak, aby byly křivky závislosti odezvy na koncentraci dostatečně podloženy experimentálními údaji. Měla by být použita geometrická řada koncentrací (s konstantním faktorem ředění).

1.7.3 *Zkušební postup* [1]

1.7.3.1 První den

Připraví se buněčná suspenze 1×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu a 100 µl kultivačního média se rozdělí pouze do obvodových jamek 96jamkové destičky (slepý pokus). Do zbývajících buněk se dávkuje po 100 µl buněčné suspenze o hustotě 1×10^5 buněk/ml (1×10^4 buněk na jamku). Pro každou zkoušenou chemickou látku se připraví dvě destičky: jedna pro stanovení cytotoxicity (-UVA) a druhá pro stanovení fotocytotoxicity (+UVA).

Buňky se inkubují 24 h (7,5 % CO_2, 37 °C), dokud nedosáhnou semikonfluentní monovrstvy. Tato inkubační doba umožní regeneraci buněk, jejich přichycení a exponenciální růst.

1.7.3.2 Druhý den

Po inkubaci se kultivační médium z buněk dekantuje a každá jamka se promyje dvakrát 150 µl EBSS/PBS. Přidá se 100 µl EBSS/PBS obsahujících vhodnou koncentraci zkoušené chemické látky nebo pouze rozpouštědlo (negativní kontrola). Aplikuje se 8 různých koncentrací zkoušené chemické látky. Buňky se zkoušenou chemickou látkou se inkubují v temnu po dobu 60 min. (7,5 % CO_2, 37 °C).

K provedení části zkoušky s ozářením UVA se buňky při pokojové teplotě po dobu 50 min. ozařují přes víčko 96jamkové destičky UVA světlem o intenzitě 1,7 MW/cm^2 (5 J/cm^2. Aby nedošlo ke kondenzaci vody pod víčkem, větrá se pomocí ventilátoru. Destičky pro zkoušku bez ozáření UVA se ponechají 50 min. (doba expozice UVA) v temnu při pokojové teplotě.

Zkušební roztok se odstraní a každá jamka se promyje dvakrát 150 µl EBSS/PBS. EBSS/PBS se nahradí kultivačním médiem a inkubuje se přes noc (18-22 h) (7,5 % CO_2, 37 °C).

1.7.3.3 Třetí den

Mikroskopické hodnocení

Buňky se prohlédnou pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Zaznamenají se změny morfologie buněk způsobené cytotoxickým účinkem zkoušené chemické látky. Doporučuje se provádět tuto kontrolu, aby se vyloučily experimentální chyby, avšak záznamy se pro hodnocení cytotoxicity nebo fototoxicity nepoužijí.

Zkouška příjmu neutrální červeně.

Buňky se promyjí 150 µl předehřátého EBSS/PBS a promývací roztok se opatrně odstraní poklepem. Přidá se 100 µl média NR a inkubuje se 3 h při 37 °C ve zvlhčené atmosféře o 7,5 % CO_2.

Po inkubaci se médium NR odstraní a buňky se promyjí 150 µl EBSS/PBS. EBSS/PBS se dekantuje a zcela odsaje (případně lze destičku odstředit v obrácené poloze).

Přidá se přesně 150 µl čerstvě připraveného roztoku ethanolu a kyseliny octové, aby se odstranila NR.

Destička se prudce 10 min. třepe na třepačce, dokud se NR z buněk nevylouží a nevytvoří homogenní roztok.

Spektrometrem se změří absorbance extraktu NR při 540 nm, přičemž se pro srovnání použije slepý pokus. Údaje se uloží ve vhodném formátu (např. ASCII) v počítači pro následnou analýzu.

2. **ÚDAJE**

2.1 **Kvalita a množství údajů**

Údaje by měly umožnit smysluplnou analýzu závislosti odpovědi na koncentraci získané při ozáření UVA/VIS nebo bez něho. Je-li zjištěna cytotoxicita, měl by být rozsah koncentrací a interval mezi nimi nastaven tak, aby bylo možné proložit experimentálními údaji křivku. Vzhledem k tomu, že by zkoušená chemická látka nemusela být až do mezní koncentrace 100 μg/ml určené pro experiment v temnu (-UVA) cytotoxická, ale mohla by být vysoce cytotoxická po ozáření (+UVA), může být nezbytné, aby se rozmezí koncentrací, které mají být v obou částech experimentu zkoušeny, řádově lišily, má-li být splněn požadavek uspokojivé kvality údajů. Není-li v obou částech experimentu (-UVA a +UVA) cytotoxicita zjištěna, stačí provést zkoušku s většími intervaly mezi jednotlivými dávkami až do nejvyšší koncentrace.

Ověření jasně pozitivního výsledku opakovaným experimentem se nepožaduje. Negativní výsledky nemusí být dále ověřovány, jestliže byla zkoušená chemická látka zkoušena za dostatečně vysokých koncentrací. V takových případech stačí jeden hlavní experiment podpořený jednou nebo více předběžnými experimenty pro zjištění rozmezí koncentrací.

Zkoušky s výsledky blízko hraničních hodnot předpovědního modelu by měly být pro kontrolu opakovány.

Je-li opakované zkoušení považováno za nezbytné, může být důležité pro dosažení jasného výsledku změnit experimentální podmínky. Klíčovou proměnnou této zkoušky je příprava roztoků zkoušené chemické látky. Z tohoto důvodu může být změna podmínek (jiné rozpouštědlo, rozmělňování, použití ultrazvuku) nejzávažnějším faktorem zkoušky. Eventuálně může být vzato v úvahu kolísání inkubační doby před ozářením. Zkrácení doby může mít význam u chemických látek nestálých ve vodě.

2.2 **Zpracování výsledků**

Je-li to možné, stanoví se koncentrace zkoušené chemické látky odpovídající 50 % inhibici buněčného příjmu neutrální červeně (NR) (EC_{50}). Lze tak učinit požitím jakékoli vhodné metody nelineární regrese (nejlépe Hillovou funkcí nebo logistickou regresí) údajů závislosti odezvy na koncentraci nebo použitím jiných metod metody proložení (14). Před použitím hodnoty EC_{50} pro další výpočty by měla být vhodným způsobem zkontrolována kvalita proložení. Pro výpočet EC_{50} lze popřípadě použít metodu grafického proložení. V takovém případě se doporučuje použít semilogaritmický papír (měřítko osy x: logaritmické, měřítko osy y: pravděpodobnostní), neboť v mnoha případech bude po této transformaci funkce závislosti odezvy na koncentraci téměř lineární.

2.3 **Hodnocení výsledků (předpovědní modely)**

2.3.1 *Předpovědní model — verze 1: fotoiritační faktor (PIF)*

Jestliže jsou v obou případech jak při ozáření (+UVA), tak bez ozáření (-UVA) získány úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci, lze fotoiritační faktor (PIF) vypočítat podle tohoto vzorce:

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

Hodnota PIF < 5 předpovídá neexistenci fototoxického potenciálu, zatímco hodnota PIF ≥ 5 předpovídá existenci fototoxického potenciálu.

Jestliže je chemická látka cytotoxická pouze při +UVA a není cytotoxická při zkoušce -UVA, nelze hodnotu PIF vypočítat, třebaže jde o výsledek, který svědčí o fototoxickém potenciálu. V takových případech lze vypočítat hodnotu ‚> PIF', jestliže se provede -UV zkouška až po nejvyšší zkušební koncentrace (C_{max}), a tato hodnota se použije pro výpočet ‚> PIF';

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

Lze li získat pouze hodnotu ‚> PIF', předpovídá existenci fototoxického potenciálu jeho hodnota > 1.

Jestliže nelze v důsledku toho, že chemická látka nevykazuje až do nejvyšší zkušební koncentrace žádnou fototoxicitu, vypočítat ani hodnotu EC_{50} (-UV) ani hodnotu EC_{50} (+ UV), svědčí to o neexistenci fototoxického potenciálu. V takových případech se pro charakterizaci výsledku používá formální hodnota ‚PIF = *1';

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

Lze li získat pouze hodnotu ‚PIF = *1', je tato hodnota předpovědí neexistence fototoxického potenciálu.

V případech b) a c) by měly být pro předpověď fototoxického potenciálu opatrně vzaty v úvahu koncentrace dosažené ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

2.3.2 *Předpovědní model verze 2: střední světelný účinek (MPE)*

Alternativně lze použít novou verzi modelu pro předpovídání fototoxického potenciálu, který byl vyvinut s použitím údajů z validační studie EU/COLIPA (15) a byl testován naslepo v následné studii fototoxicity *in vitro* u chemických látek, které se chovají jako UV filtry (13). Tento model nemá omezení jako model PIF v případech, kdy nelze získat hodnotu EC_{50}. Tento model využívá střední světelný účinek (*mean photo effect*) (MPE), veličinu, která je založena na srovnání celých křivek závislosti odezvy na koncentraci. Pro použití modelu byl na Humboldtově univerzitě (Berlín) vyvinut speciální počítačový software, který je volně k dispozici.

2.4 **Interpretace výsledků**

Pozitivní výsledek zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (PIF ≥ 5 nebo MPE ≥ 0,1) znamená, že látka má fototoxický potenciál. Jestliže bylo výsledku dosaženo při koncentracích pod 10 μg/ml, je také pravděpodobné, že látka bude působit za různých expozičních podmínek jako fototoxin *in vivo*. Je-li pozitivního výsledku dosaženo pouze při nejvyšší zkušební koncentraci 100 μg/ml, mohou být pro posouzení nebezpečnosti nebo intenzity fototoxicity nezbytné další úvahy. Ty se mohou týkat údajů o penetraci, absorpci a možné akumulaci chemické látky v kůži nebo zkoušení chemické látky alternativní potvrzující zkouškou, např. za použití modelu lidské kůže *in vitro*.

Negativní výsledek zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (PIF < 5 nebo MPE < 0,1) znamená, že látka nebyla pro savčí buňky za použitých podmínek fototoxická. V případech, kdy bylo možné zkoušet chemickou látku až po nejvyšší koncentraci 100 μg/ml, znamenají negativní výsledky, že chemická látka nemá fototoxický potenciál a fototoxicitu *in vivo* lze pokládat za nepravděpodobnou. V případech, kdy byly při nižších koncentracích obdrženy totožné závislosti toxické odezvy na koncentraci (EC_{50} +UV a EC_{50} -UV), je interpretace údajů stejná. Není-li naproti tomu toxicita prokázána (+UV a -UV) a jsou-li koncentrace omezeny rozpustností ve vodě na hodnoty menší než 100 μg/ml, není patrně zkouška pro zkoušenou látku vhodná a mělo by být zvážena potvrzující zkouška (např. za použití modelu lidské kůže *in vitro* nebo zkouškou *in vivo*).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— identifikační údaje a číslo CAS, je-li známo,

— fyzikální vlastnosti a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti důležité pro provedení studie,

— stálost a fotostabilita, jsou-li známy.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— rozpustnost zkoušené látky v tomto rozpouštědle,

— procentuální koncentrace rozpouštědla v aplikačním médiu (EBSS nebo PBS).

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— nepřítomnost mykoplasmy,

— číslo buněčné pasáže, je-li známo,

— citlivost buněk na UVA stanovená radiometrem použitým ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*

Zkušební podmínky a) — inkubace před aplikací a po ní:

— typ a složení kultivačního média,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2, teplota, vlhkost),

— délka inkubace (zpracování před inkubací a po ní).

Zkušební podmínky b) — aplikace chemické látky:

— zdůvodnění výběru koncentrací zkoušené chemické látky použitých jak při ozáření UV/VIS, tak bez něj,

— v případě, že zkoušená chemická látka vykazuje omezenou rozpustnost a není cytotoxická, zdůvodnění nejvyšší zkušební koncentrace,

— typ a složení působícího média (pufrovaný fyziologický roztok),

— délka aplikace chemické látky.

Zkušební podmínky c) — ozáření:

— zdůvodnění výběru použitého zdroje světla,

— spektrální charakteristiky ozáření ze zdroje světla,

— charakteristiky propustnosti/absorpce použitého filtru (použitých filtrů),

— charakteristiky radiometru a podrobnosti o jeho kalibraci,

— vzdálenost zdroje světla od zkoušeného systému,

— intenzita ozáření UVA v této vzdálenosti, vyjádřená v mW/cm^2,

— délka expozice UV/VIS světlu,

— dávka UVA záření (intenzita × čas), vyjádřena v J/cm^2,

— teplota buněčných kultur během ozařování a teplota buněčných kultur udržovaných v temnu.

Zkušební podmínky d) — zkouška NRU:

— složení média NR,

— doba inkubace NR,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2, teplota, vlhkost),

— podmínky extrakce NR (extrakční činidlo, délka extrakce),

— vlnová délka použitá pro spektrofotometrický odečet absorbance NR,

— druhá (referenční) vlnová délka, je-li použita,

— složení slepého roztoku pro spektrometrii, je-li použit.

Výsledky:

— životaschopnost buněk při každé koncentraci zkoušené chemické látky vyjádřená v procentech střední životaschopnosti kontrol,

— křivky závislosti odezvy na koncentraci (koncentrace zkoušené chemické látky versus relativní životaschopnost buněk) získané při paralelních experimentech +UVA a -UVA,

— analýza křivek závislosti odezvy na koncentraci: je-li to možné, výpočet hodnoty EC_{50} (+UVA) a EC_{50} (-UVA),

— srovnání obou křivek závislosti odezvy na koncentraci získaných s ozářením UVA/VIS a bez něho, a to buď výpočtem fotoiritačního faktoru (photo-irradiation factor) (PIF), nebo výpočtem středního světelného účinku (mean photo effect) (MPE),

— klasifikace fototoxického potenciálu,

— kritéria přijatelnosti zkoušky a) — souběžná negativní kontrola:

  — absolutní životaschopnost (absorbance extraktu NR) ozářených a neozářených buněk,

  — dosavadní údaje pro negativní kontrolu, střední hodnota a směrodatná odchylka,

— kritéria přijatelnosti zkoušky b) — souběžná pozitivní kontrola:

  — hodnoty EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) a PIF-pozitivní kontrolní chemické látky,

  — dosavadní údaje pozitivní kontrolní chemické látky: hodnoty EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) a PIF, střední hodnota a směrodatná odchylka.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

(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., 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, 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, 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., 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, 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, 95-102.

(6) Santamaria, L., 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, XI–XXXV.

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

(8) Spikes, J. D. (1989), Photosensitization. V: *The science of photobiology*, (K. C. Smith, ed.), Plenum Press, New York, 2. vyd., 79-110.

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

(10) Lambert, L. A., Warner, W. G., Kornhauser A. (1996). V: Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, (F. N. Marzulli, H. I. Maibach eds.), Taylor & Francis, Washington DC, 5. vyd., 515-530.

(11) Tyrrell, R. M., 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 Res . 47, 1825-1829.

(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, navrženo 23. prosince 1997 M. Liebschem, schváleno 6. března 1998 týmem Management Team of the EU/COLIPA project ‚*In Vitro* Photoirritation'.

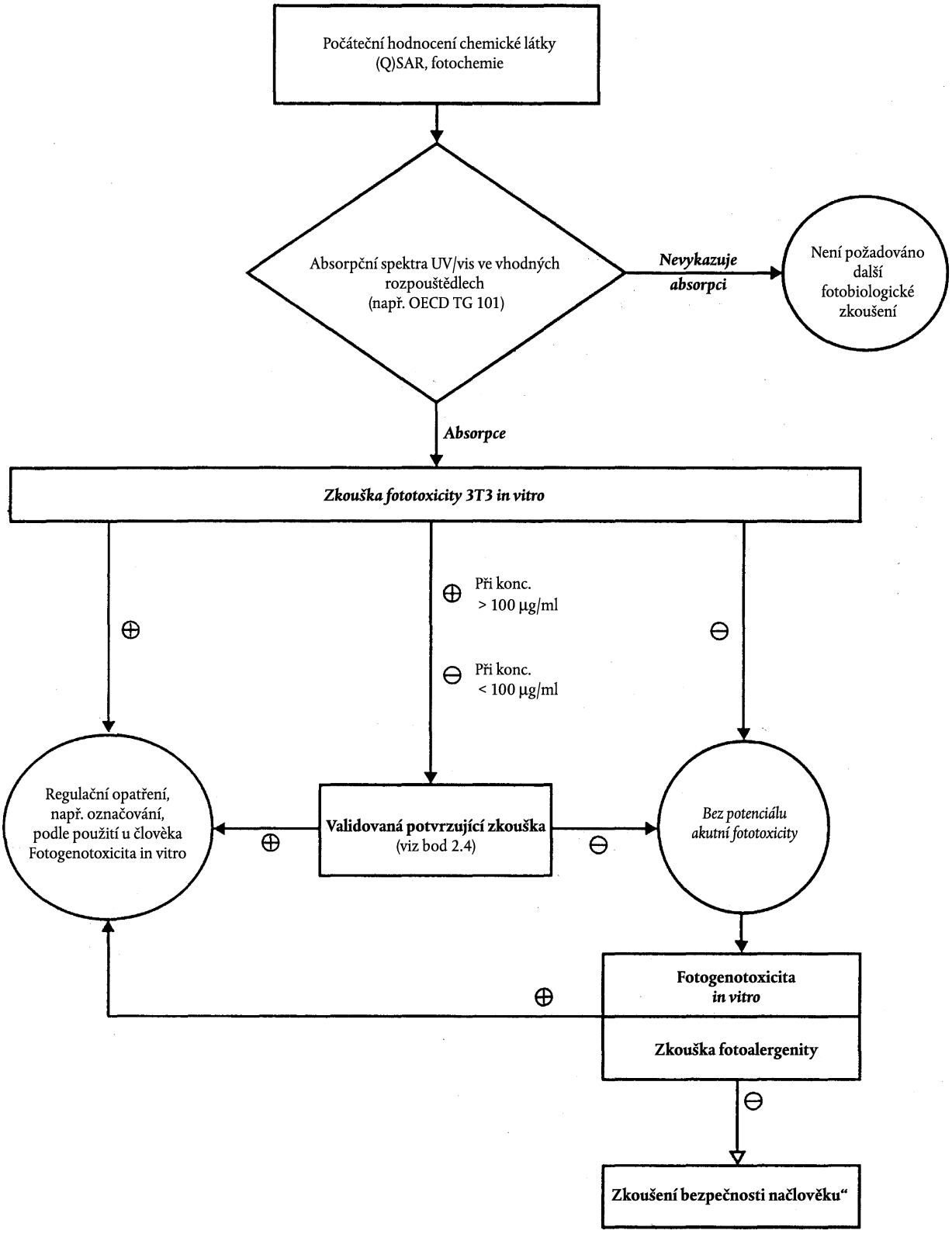
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity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

(14) Holzhütter, H. G., Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, Journal of Biological Systems , 3, 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, 445-462.

Dodatek

Role zkoušky fototoxicity 3T3 NRU v postupném zkoušení fototoxicity chemických látek



(1) Další podrobnosti lze nalézt v literatuře (12).“