32000L0033

KOMISJONI DIREKTIIV 2000/33/EÜ,

25. aprill 2000,

millega kohandatakse kahekümne seitsmendat korda tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta (*)

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 27. juuni 1967. aasta direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, (1) viimati muudetud Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga 1999/33/EÜ, (2) eriti selle artiklit 28,

ning arvestades järgmist:

(1) Direktiivi 67/548/EMÜ V lisas on sätestatud ainete ja valmististe füüsikalis-keemiliste omaduste, toksilisuse ning ökotoksilisuse määramise meetodid. Kõnealust lisa on vaja kohandada tehnika arenguga.

(2) Vastavalt nõukogu 24. novembri 1986. aasta direktiivi 86/609/EMÜ (katseteks ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitsega seotud liikmesriikide õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta) (3) artikli 7 punktile 2 ei kasutata katsete tegemisel loomi, kui on olemas teine teaduslikult rahuldav meetod tulemuse saamiseks mõistlikul ja praktilisel viisil.

(3) Komisjon kavatseb kehtestada direktiivi 67/548/EMÜ V lisas teatavad alternatiivsed uurimismeetodid, milles loomi ei kasutata, et need meetodid oleksid kättesaadavad kemikaalide katsetamisel vastavalt direktiivi 67/548/EMÜ artikli 3 lõikele 1.

(4) Käesolevas direktiivis sätestatud meetmed on kooskõlas ohtlike ainete ja valmististe tehniliste kaubandustõkete kõrvaldamist käsitlevaid direktiive tehnika arenguga kohandava komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Käesoleva direktiivi I ja II lisa tekst lisatakse direktiivi 67/548/EMÜ V lisa B osale.

Artikkel 2

1. Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 1. oktoobriks 2001. Nad teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Kui liikmesriigid need sätted vastu võtavad, lisavad nad nendesse või nende ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Sellise viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

2. Liikmesriigid edastavad komisjonile käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas nende poolt vastuvõetud siseriiklikud põhilised õigusnormid ning käesoleva direktiivi ja vastuvõetud siseriiklike normide vahelise vastavustabeli.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 25. aprill 2000

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Margot WALLSTRÖM

(*) Vastu võetud enne kahekümne kuuendat kohandamist.
(1) EÜT 196, 16.8.1967, lk 1.
(2) EÜT L 199, 30.7.1999, lk 57.
(3) EÜT L 358, 18.12.1986, lk 1.

I LISA

"B.40. NAHASÖÖVITUS

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Alternatiivsete meetodite valideerimise Euroopa keskus (ECVAM, Ühisuuringute Keskus, Euroopa komisjon) on kiitnud heaks kaks nahasöövituse *in vitro* katset (roti naha transkutaanse elektrilise takistuse (TER) määramine ja inimnaha mudelit kasutav katse) kui teaduslikult tõesed (1) (2) (3). ECVAMi valideerimisuuring näitas, et mõlema katsega on võimalik teha usaldusväärselt vahet naha tuntud söövitavate ainete ja mittesöövitavate ainete vahel. Lisaks sellele võimaldab inimese naha mudelil põhineva katse protokoll teha korrektset vahet söövitava toime määrade vahel (tuntud tugevad nahka söövitavad ained, R35, ja muud nahka söövitavad ained, R34) (2). Mõlema katse kirjeldused ja protseduurid on ära toodud, valik selle kohta, millist katset kasutada, oleneb spetsiifilistest nõuetest ja kasutaja eelistusest.

Vt ka üldise sissejuhatuse B osa.

1.2. **Mõisted**

Nahasöövitus — naha kudede pöördumatu kahjustuse tekkimine pärast uuritava materjali pealekandmist.

1.3. **Võrdlusained**

Ei ole määratletud, kuid vt punkte 1.5.3.4 ja 1.7.2.3.

1.4. **Uurimismeetodi põhimõte — roti naha TERi määramine**

Uuritav materjal kantakse kuni 24 tunniks humaanselt hukatud noorte rottide karvadega toornahast võetud nahaketaste epidermisele. Söövitavad materjalid tehakse kindlaks nende võime alusel põhjustada normaalse sarvkihi terviklikkuse ja kaitsefunktsiooni kadumist, mida määratakse iseloomuliku TER vähenemisega alla läviväärtust (5 kΩ) (4) (5). Ärritavad ja mitteärritavad materjalid ei vähenda TERi alla läviväärtust. Pindaktiivsete ainete ja neutraalsete orgaaniliste ühendite (vt määratlust viitest (6)) uurimise protseduuri võib kaasata värvaine sidumisetapi nende keemiliste ühendite korral (2) (7) saadavate spetsiifiliselt valede positiivsete tulemuste arvu vähendamiseks.

1.5. **Uurimismeetodi kirjeldus — roti naha TERi määramine**

1.5.1. *Loomad*

Nahaketaste valmistamiseks vajatakse noori (20–23 päeva vanuseid) rotte (Wistar või samaväärne liin). Dorsaal- ja küljekarvad eemaldatakse hoolikalt väikeste loomade jaoks mõeldud kääridega. Seejärel pestakse loomad ettevaatliku üle pühkides, kattes piirkonna antibiootikumi lahusega (mis sisaldab näiteks streptomütsiini, penitsilliini, klooramfenikooli ja amfoteritsiini kontsentratsioonides, mis toimivad bakterite kasvule inhibeerivalt). Seejärel pestakse loomad antibiootikumidega uuesti kolmandal või neljandal päeval pärast esimest pesemist ning neid kasutatakse mitte hiljem kui kolme päeva pärast (loomad ei tohi toornaha preparaadi ettevalmistamisel olla vanemad kui 31 päeva).

1.5.2. *Nahaketaste ettevalmistamine*

Loomad hukatakse humaansel viisil. Seejärel eemaldatakse iga looma dorsaalnahk ja eemaldatakse liigne rasv seda nahalt ettevaatlikult ära koorides. Nahk paigutatakse polütetrafluoroetüleenist (PTFE) toru otsale nii, et epidermiskiht on toruga kontaktis. Kummist rõngastihend surutakse toru otsale eesmärgiga hoida nahk kohal ning liigne kude lõigatakse maha. Toru ja rõngastihendi mõõtmed on toodud joonisel 1. Seejärel tihendatakse kummist rõngastihendi ja PTFE-toru otsa liitekoht ettevaatlikult vaseliiniga. Toru hoiab magneesiumsulfaadi lahust (154 mM) sisaldavas vastuvõtukambris kohal vedruklamber (joonis 2).

1.5.3. *Katsemenetlus*

1.5.3.1. Uuritava materjali rakendamine

Vedelad uuritavad ained (150 µl) kantakse torus (joonis 2) olevale epidermisele. Kui uuritakse tahkeid materjale, siis kantakse kettale piisav kogus tahket ainet ja tagatakse kogu epidermise pinna katmine sellega. Seejärel lisatakse tahke aine pinnale deioniseeritud vett (150 µl) ja torusid loksutatakse ettevaatlikult. Uuritavad ained peavad olema nahaga võimalikult täielikus kontaktis. Mõnede tahkete ainete korral võib seda saavutada soojendamisel kuni 30 °Cni selleks, et uuritavat ainet sulatada, või jahvatamisega selleks, et saada granuleeritud materjali või pulbrit.

Iga uuritava aine korral kasutatakse kolme nahaketast. Uuritavad ained kantakse peale 24 tunniks (vt ka 1.5.3.4). Uuritav aine eemaldatakse pesemisel kraanivee joaga temperatuuril kuni 30 °C seni, kuni ei eemaldu enam mingit materjali. Torus tahkestunud uuritavate ainete eemaldamist saab kiirendada pesemisel ligikaudu 30 °C temperatuuriga sooja vee joaga.

1.5.3.2. TERi mõõtmised

TER mõõdetakse madalpingelise vahelduvvoolusilla abil (näiteks AIM 401 või 6401 või samaväärsed). Enne elektritakistuse määramist vähendatakse naha pindpinevust, lisades epidermise katmiseks piisava ruumala 70 %list etanooli. Mõne sekundi pärast eemaldatakse etanool, pöörates toru ümber ja kude hüdraaditakse 3 ml magneesiumsulfaadi lahuse (154 mM) lisamisega. Silla elektroodid paigaldatakse nahaketta mõlemale poolele takistuse määramiseks ühikutes kΩ nahaketta kohta (joonis 2). Elektroodi mõõtmed ja elektroodi krokodillklemmist allpool oleva isoleerimata osa pikkus on toodud joonisel 1. Sisemine (jäme) elektroodiklamber lasub takistuse mõõtmise ajal PTFE-toru peal, millega tagatakse magneesiumsulfaadilahusesse uputatud elektroodi pikkuse konstantsus. Välimine (õhuke) elektrood paikneb vastuvõtukambris siis selliselt, et lebab kambri põhjas. Vedruklambri aluse ja PTFE-toru põhja vaheline kaugus hoitakse konstantsena (joonis 1), sest see kaugus mõjutab määratava takistuse väärtust.

Tuleb märkida, et kui mõõdetud takistuse väärtus on üle 20 kΩ, siis võib see olla tingitud nahaketta epidermisel oleva uuritava aine kattekihist. Seda kattekihti võib püüda eemaldada näiteks PTFE-toru sulgemisel kindasõrme kujulise kattega ja ligikaudu 10 sekundi jooksul loksutamisega, magneesiumsulfaadilahus valatakse ära ning takistuse määramist korratakse katset värske magneesiumsulfaadilahusega.

Vastuvõetavad on TERi keskmised tulemused tingimusel, et kaasnevad positiivsed ja negatiivsed kontrollväärtused langevad meetodi jaoks vastuvõetavatesse piiridesse. Soovitatavad kontrollained ja nendega seostatavad vastuvõetavad takistused siinkirjeldatud metodoloogia ja aparatuuri jaoks on:

Kontrollimine	Aine	Takistuse vahemik (kΩ)
Positiivne	10 M vesinikkloriidhape (36 %)	0,5–1,0
Negatiivne	Destilleeritud vesi	10–25

1.5.3.3. Modifitseeritud protseduur pindaktiivsete ainete ja neutraalsete orgaaniliste ühendite korral

Kui uuritavateks aineteks on pindaktiivsed ained või neutraalsed orgaanilised ühendid ja TERi määratud väärtused on väiksemad või võrdsed 5 kΩ, siis tuleb hinnata värvainete sissetungi ulatust kudedes. See protseduur määrab, kas tulemused on vale-positiivsed (2).

1.5.3.3.1. Värvaine sulforodamiin B pealekandmine ja eemaldamine

Pärast esialgset töötlemist uuritava ainega kantakse iga nahaketta epidermise pinnale 2 tunniks 150 µl 10 % (massi-/mahuprotsent) värvaine sulforodamiin B lahjendust destilleeritud vees. Seejärel pestakse nahakettaid toatemperatuurilise kraanivee joaga ligikaudu 10 sekundi jooksul mis tahes liigse/seostumatu värvaine eemaldamiseks. Iga nahaketas eemaldatakse ettevaatlikult PTFE-torult ja paigutatakse viaali (nt klaasist 20 ml stiintsillatsiooniviaali), mis sisaldab destilleeritud vett. Viaale loksutatakse ettevaatlikult 5 minutit mis tahes liigse/seostumata värvaine eemaldamiseks. Seejärel korratakse loputusprotseduuri, pärast mida nahaketta eemaldatakse ja viiakse viaalidesse, mis sisaldavad 5 ml 30 % (massi-/mahuprotsent) naatriumdodetsüülsulfaati destilleeritud vees ja inkubeeritakse ööpäev temperatuuril 60 °C. Pärast inkubeerimist eemaldatakse nahakettad ja visatakse ära ning järelejäänud lahust tsentrifuugitakse 8 minutit temperatuuril 21 °C (suhteline tsentrifugaaljõud ˜175). Seejärel lahjendatakse supernatandist võetud 1 ml proovi 5 korda (maht/maht) (st 1 ml + 4 ml) 30 %lise (massi/mahuprotsent) SDSiga destilleeritud vees. Lahuse optiline tihedus mõõdetakse lainepikkusel ligikaudu 565 nm.

1.5.3.3.2. Värvaine sisalduse arvutamine

Värvaine sulforodamiin B sisalduskettas arvutatakse OD väärtustest (värvaine sulforodamiin B molaarne neeldetegur lainepikkusel 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulmass = 580). Värvaine sulforodamiin B sisaldus määratakse iga nahaketta jaoks ning seejärel arvutatakse värvaine keskmine sisaldus täpsetes koopiates. Värvaine seostumise keskmised tulemused on vastuvõetavad tingimusel, et kaasnevad kontrollväärtused langevad meetodi jaoks vastuvõetavatesse piiridesse. Soovitatavad vastuvõetavad värvaine sisalduse piirid kontrollainete jaoks siinkirjeldatud metodoloogia ja aparatuuri korral on:

Kontrollimine	Aine	Värvaine sisalduse vahemik (µg/ketas)
Positiivne	10 M vesinikkloriidhape (36 %)	40–100
Negatiivne	Destilleeritud vesi	15–35

1.5.3.4. Lisateave

Uuritavaid aineid võib nahaketastele kanda ka lühemateks ajavahemikeks (nt 2 tunniks) eesmärgiga identifitseerida tugevalt söövitavaid materjale. Valideerimisega seotud uurimise käigus on siiski leitud, et TERi määramisel on kalduvus saada mitmesuguste uuritavate kemikaalide pealekandmisel ülehinnatud söövitusvõime nende toimel nahaketastele 2 tunni vältel (2), kuigi see katse võimaldab õigesti identifitseerida söövitavaid ja mittesöövitavaid kemikaale pärast nende 24 tunnilist toimet.

Katseseadme omadused ja mõõtmed ning kasutatav eksperimentaalne protseduur võivad mõjutada saadavaid TERi väärtusi. Söövituse läviväärtus 5 kΩ töötati välja käesolevas meetodis kasutatud eriseadme ja protseduuri abil saadud andmete põhjal. Kui katsetingimusi on olulisel määral muudetud, siis võib kasutada erinevad lävi- ja kontrollväärtusi. Seega on soovitav, et nii metodoloogia kui ka takistuse läviväärtused kalibreeritakse valideerimise uurimisel kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdlusstandardite seeria uuringute põhjal (3).

1.6. **Uurimismeetodi põhimõte — katse inimese naha mudeliga**

Uuritav materjal pannakse pindmiselt kuni 4 tunniks inimnaha kolmemõõtmelisele mudelile, mis kujutab endast imiteerivat epidermis funktsioneerivat sarvkihti. Söövitavad materjalid identifitseeritakse nende võime alusel põhjustada rakkude eluvõimelisuse vähenemist (määratletud näiteks MTT vähenemise katses) allapoole määratletud läviväärtust kindlate toimeaegade jooksul. Määramise põhimõte on kooskõlas hüpoteesiga, et söövitavad kemikaalid on need, mis on võimelised sarvkihti sisse tungima (difusiooni või erosiooni teel) ning mis on piisavalt tsütotoksilised selleks, et põhjustada allolevates rakukihtides olevate rakkude hukkumist.

1.7. **Uurimismeetodi kirjeldus — katse inimese naha mudeliga**

1.7.1. *Inimese naha mudelid*

Inimese naha mudelid võivad olla erineva päritoluga, kuid need peavad vastama teatavatele kriteeriumidele. Mudelis peab olema funktsioneeriv sarvkest koos alloleva elusrakkude kihiga. Sarvkihi kaitsefunktsioon peab olema adekvaatne. Seda saab näidata, demonstreerides mudeli vastupanuvõimet tsütotoksilisusele pärast ainete pealekandmist, mis on tuntud omaduse poolest olla rakkudele tsütotoksiline, kuid mis tavaliselt ei läbi sarvkihti. Mudeli korral peab olema näidatud reprodutseerivate tulemuste saamine kindlaksmääratud eksperimentaalsetes tingimustes.

Mudelis olevate elusrakkude eluvõimelisus peab olema piisavalt kõrge, et teha selget vahet positiivsete ja negatiivsete kontrollainete vahel. Rakkude eluvõimelisus (mõõdetud näiteks MTT vähenemise kaudu, st OD väärtus) pärast allutamist negatiivse kontrollaine toimele peab olema konkreetse mudeli jaoks vastuvõetavates piirides. Analoogiliselt peab rakkude eluvõimelisus positiivse kontrollaine korral (võrreldes selle väärtusega negatiivse kontrolli suhtes) olema kindlaksmääratud piirides. Kõige olulisem on see, et kasutatava prognoosiva mudeli korral peab olema näidatud selle vastavus rahvusvahelisele valideerimisstandardile (2).

1.7.2. *Katsemenetlus*

1.7.2.1. Uuritava materjali pealekandmine

Vedelate materjalide korral tuleb piisav kogus uuritavat ainet kanda naha pinnale (minimaalselt 25 µl/cm^2). Tahkete materjalide korral tuleb piisav kogus uuritavat ainet kanda naha pinnale ning seda tuleb seejärel niisutada, et oleks tagatud hea kokkupuude nahaga, seejuures tuleb vastavaid tahkeid aineid enne pealekandmist jahvatada pulbriks. Peab olema näidatud pealekandmiseks kasutatava meetodi adekvaatsus keemiliste tüüpide laia valiku korral (2). Toimimisaja lõpul tuleb uuritav materjal naha pinnalt füsioloogilise lahusega ettevaatlikult maha pesta.

1.7.2.2. Raku eluvõimelisuse määramised

Raku eluvõimelisuse määramiseks võib kasutada mis tahes kvantitatiivset valideeritud meetodit. Kõige sagedamini kasutatavaks määramiseks on MTT vähenemine, mille korral on näidatud erinevates laboratooriumides täpsete ja reprodutseeruvate tulemuste saamine (2). Nahaketas paigutatakse temperatuuril 20–28 °C 3 tunniks MTT lahusesse kontsentratsiooniga 0,3 mg/ml. Seejärel ekstraheeritakse (solvent-ekstraktsioon) sadestunud sinine formasaansaadus ning formasaani kontsentratsioon määratakse OD mõõtmisega vahemikus 545 ja 595 nm oleval lainepikkusel.

1.7.2.3. Lisateave

Kasutatav naha mudel ning mõjutamise täpne eeskiri ja pesemismenetlus jms omavad suurt mõju raku eluvõime kohta saadud tulemustele. On soovitav, et nii metodoloogia ja prognoosiv mudel kalibreeritakse ECVAM valideerimise uurimisel kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdlusstandardite seeria katsetuste põhjal (3). Otsustavaks on see, et näidatud oleks kasutatud meetodi reprodutseeritavus nii ühes laboratooriumis kui ka erinevates laboratooriumides kemikaalide laia valiku suhtes kooskõlas rahvusvaheliste standarditega. Minimaalseks on see, et meetod peab vastama eelnevalt määratletud teadusliku valiidsuse kriteeriumidele (2) ning taolise valideerimise tulemused tuleb publitseerida kitsa valdkonna teaduslikus ajakirjas.

2. **ANDMED**

2.1. **Tulemuste töötlemine**

2.1.1. *Roti naha TERi määramine*

Uuritava materjali, positiivse ja negatiivse kontrolli ning mis tahes võrdluskemikaali korral saadud takistuse väärtused (kΩ) tuleb esitada tabeli kujul, sealhulgas andmed dubleerivate/korduseksperimentide, keskväärtused ja saadud klassifikatsiooni kohta.

2.1.2. *Määramine inimnaha mudeli korral*

Uuritava materjali, positiivse ja negatiivse kontrolli ning mis tahes võrdluskemikaali korral saadud OD väärtused ja raku eluvõimelisuse kohta arvutatud protsendilised andmed tuleb esitada tabeli kujul, sealhulgas andmed dubleerivate/korduseksperimentide, keskväärtuste ja saadud klassifikatsiooni kohta.

2.2. **Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

2.2.1. *Roti naha TERi määramine*

Kui uuritava aine korral on mõõdetud TERi keskmine väärtus üle 5 kΩ, siis on see aine mittesöövitav. Kui TERi väärtus on väiksem kui 5 kΩ või sellega võrdne ning uuritav aine ei ole pindaktiivne või neutraalne orgaaniline ühend, siis on tegemist söövitava ainega.

Pindaktiivsete ainete või neutraalsete orgaaniliste ühendite korral, kui TERi määratud väärtused on väiksemad või võrdsed 5 kΩ, võib läbi viia värvaine imendumise katse. Kui kettas on värvaine keskmine sisaldus suurem kui ketta keskmine värvaine sisaldus samaaegselt määratud positiivses kontrollis 36 % vesinikkloriidhappes või sellega võrdne, siis on uuritav aine tõeliselt positiivne ning seega söövitav. Kui kettas on värvaine keskmine sisaldus väiksem kui ketta keskmine värvaine sisaldus samaaegselt määratud positiivses kontrollis 36 % vesinikkloriidhappes või sellega võrdne, siis on uuritav aine vale-positiivne ning seega mittesöövitav.

2.2.2. *Määramine inimese naha mudeli korral*

Negatiivse kontrolli korral saadud OD väärtused vastavad rakkude 100 % eluvõimelisusele, seega saab iga uuritava proovi korral saadud OD väärtusi kasutada eluvõimelisuse protsendi arvutamiseks negatiivse kontrolli suhtes. Raku eluvõimelisuse protsendi piirväärtus, mis eraldab söövitavat uuritavat materjali mittesöövitavast (või mis eristab erinevad söövitusklasse), peab olema prognoosivas mudelis enne meetodi valideerimist selgelt määratletud, järgnev valideerimisuuring peab näitama, kas see piirväärtus on sobiv (2).

3. **ARUANDLUS**

Uuringuprotokoll

Uuringuprotokoll peab sisaldama vähemalt järgmist teavet:

Uuritav aine

— identifitseerimiseks vajalikud andmed, agregaatolek ning olulisuse korral ka füüsikalis-keemilised omadused. Analoogiline teave tuleb esitada ka kasutatud võrdlusainete kohta.

Katsetingimused:

— kasutatud katsemenetluse üksikasjad,

— mis tahes modifikatsioonide kirjeldus ja põhjendus.

Tulemused:

— uuritava materjali, positiivse ja negatiivse kontrolli ning mis tahes standardse võrdluskemikaali korral saadud takistuse väärtused (TERi määramine) ja raku eluvõimelisuse kohta arvutatud protsendilised andmed tabeli kujul, sealhulgas andmed dubleerivate/korduseksperimentide ja keskväärtuste kohta,

— mis tahes muude täheldatud toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 507–512.

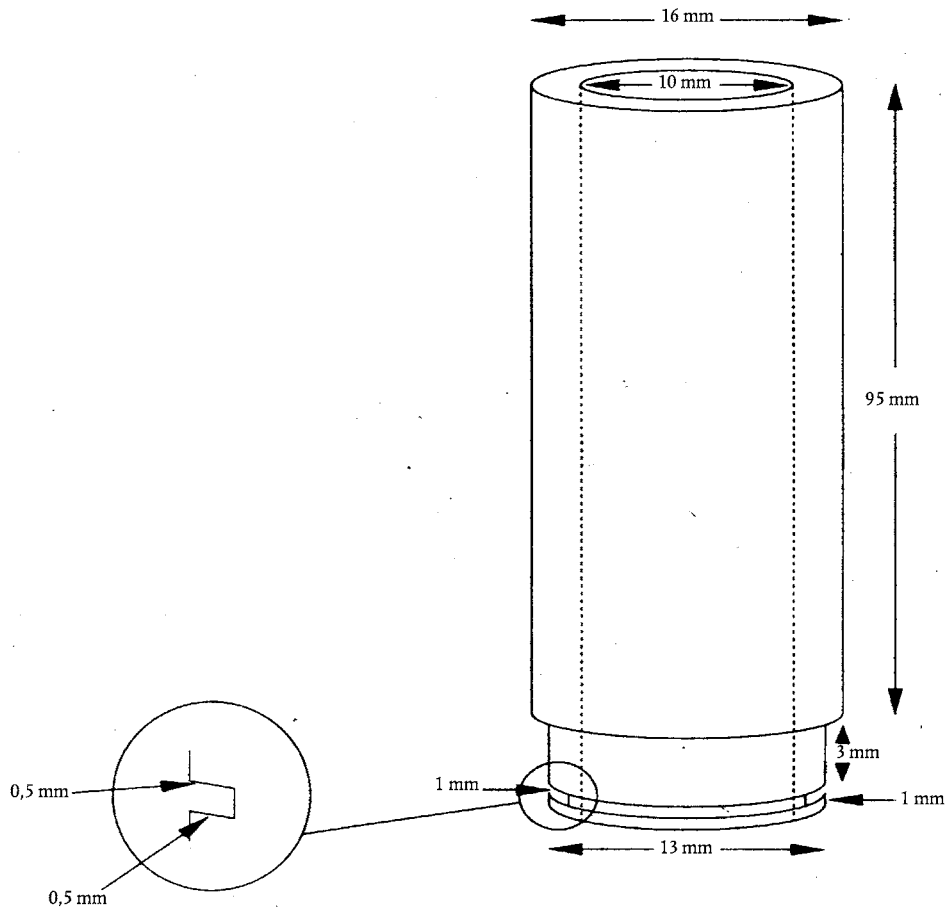
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, pp. 191–194.

(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, pp. 709–720.

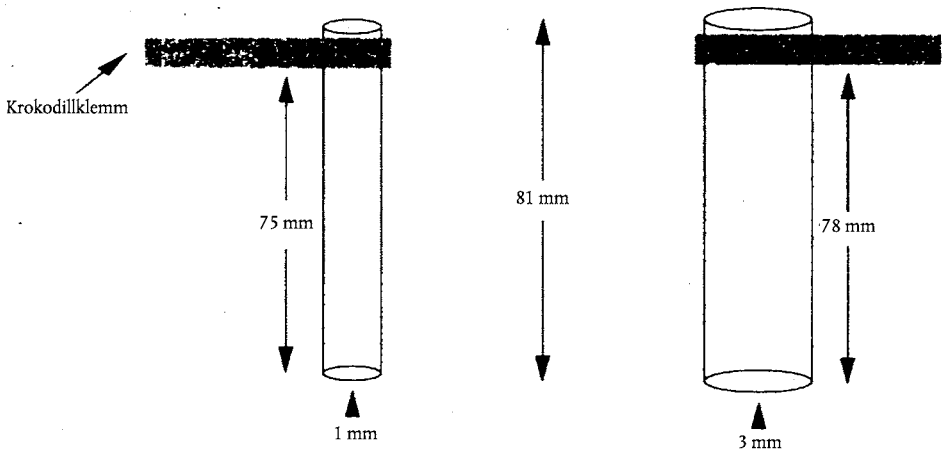
(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity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

Joonis 1

PTFE toru mõõtmed



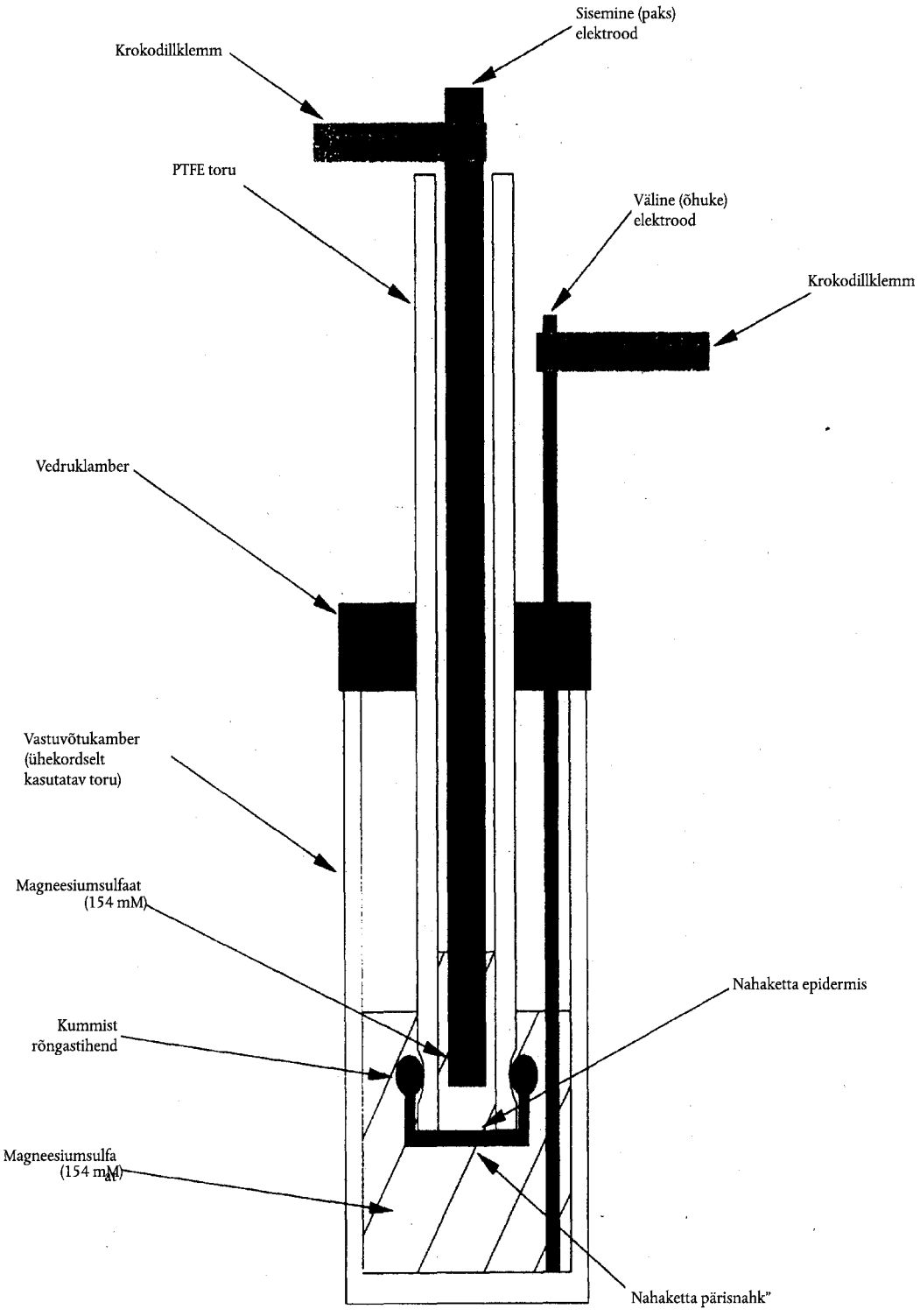
Elektroodi mõõtmed



"

Joonis 2

Seade roti naha TERi määramiseks



II LISA

"B.41. FOTOTOKSILISUS — *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Fototoksilisus on määratletud kui toksiline reaktsioon, mis on esile kutsutud pärast teatava kemikaali esmast toimet nahale ja järgnevat valgustamist, või kui see on indutseeritud analoogiliselt naha kiiritamisega pärast kemikaali süsteemset manustamist.

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katsest saadavat teavet kasutatakse uuritava aine fototoksilisuse potentsiaali identifitseerimiseks, st võimaliku ohu, mis tekib tõenäoliselt uuritavast ainest seoses allumisega UV-kiirguse ja nähtava valguse toimele, olemasolu või selle puudumist.

Kuna *in vitro* katse toksikoloogiliseks lõppeesmärgiks on kemikaali ja valguse kombineeritud toimest indutseeritud fototoksilisuse määramine, siis saab uuringu põhjal identifitseerida nii ühendeid, mis on fototoksilised *in vivo* pärast süsteemset manustamist ja jaotumist nahas, kui ka ühendeid, mis toimivad fotoärritajatena pärast pindmist manustamist nahale.

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katse töötati välja ja valideeriti EL/COLIPA ühisprojekti raames aastatel 1992–1997 (1) (2) (3) eesmärgiga luua valiidne *in vitro* alternatiiv erinevatele kasutuses olevatele *in vivo* uuringutele. 1996. aastal soovitas OECD seminar fototokilisuse hindamiseks *in vitro* katsete astmelist lähenemisviisi (4).

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katse tulemusi võrreldi loomade ja inimeste korral *in vivo* ägeda fototoksilisuse/fotoärritatavuse toimega ning uuringutest ilmnes nende efektide suurepärane prognoositavus. Katse eesmärgiks ei ole mitte muude negatiivsete toimete ennustamine, mis võivad tuleneda kemikaali ja valguse kombineeritud toimest, nt fotogenotoksilisus, fotoallergia ja fotokantserogeensus, kuigi mõned nende spetsiifiliste omadustega kemikaalid annavad positiivse reaktsiooni ka *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse uuringus. Lisaks ei ole katse ette nähtud fototoksilisuse potentsi hindamiseks.

Kemikaalide fototoksilisuse uurimise järjestikuline käsitlus on sätestatud liites.

1.2. **Mõisted**

Kiiritustihedus — pinnale langeva ultraviolettkiirguse (UV) või nähtava valguse intensiivsus, mõõdetud W/m^2 või mW/cm^2.

Valgusdoos — pinnale langeva ultraviolettkiirguse (UV) või nähtava kiirguse hulk (= intensiivsus × aeg), avaldatud džaulides (W × s) pinnaühiku kohta, nt J/m^2 või J/cm^2.

UV-kiirguse lainealad — CIE (Comission Internationale de L'Eclairage) soovituslikud tähistused on: UVA (315—400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Samuti kasutatakse teisi klassifikatsioone: vahe UVB ja UVA vahel paigutatakse sageli 320 nm juurde ning UVA võib jagada UV-A1ks ja UV-A2ks piiriga 340 nm juures.

Raku eluvõimelisus — parameeter, mis mõõdab rakupopulatsiooni summaarset aktiivsust (nt vitaalvärvi neutraalpuna kaasahaaret raku lüsosoomidesse), mis olenevalt mõõdetavast lõpp-punktist ja kasutatud katse kavandamisest korreleerub rakkude koguarvu ja/või vitaalsusega.

Raku suhteline eluvõimelisus — raku eluvõimelisus, mis on avaldatud negatiivse (lahusti) kontrollkatse suhtes, millega on läbitud kogu katsemenetlus (kas + UV või –UV), kuid mille korral ei ole kasutatud töötlemist uuritava kemikaaliga.

Prognoosiv mudel — algoritm, mida kasutatakse toksilisuse katse tulemuste teisendamiseks toksilise potentsiaali ennustamiseks. Käesolevas uuringujuhendis võib kasutada *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse tulemuste teisendamiseks fototoksilisuse potentsiaali ennustamiseks PIFi ja MPEd.

PIF (fotoärritatavuse tegur) — tegur, mis on saadud uuritava kemikaali kahe võrdse efektiivsusega tsütotoksilise kontsentratsiooni (EC_{50}) võrdlemisel UVA/nähtava valgusega mittetsütotoksilise kiirituse puudumisel (– UV) ja olemasolul (+ UV).

MPE (keskmine fotoefekt) — uudne mõõdetav suurus, mis on saadud UVA/nähtava valgusega mittetsütotoksilise kiirituse puudumisel (– UV) ja olemasolul (+ UV) määratud kahe kontsentratsioonilise tunnuskõvera täiskuju matemaatilisel analüüsil.

Fototoksilisus — äge toksiline reaktsioon, mis ilmneb pärast nahale teatava kemikaaliga toimimist ja järgnevat mõjustamist valguskiirgusega, või reaktsioon, mis on indutseeritud analoogiliselt naha kiiritamisest pärast kemikaali süsteemset manustamist.

Fotoärritus — mõiste "fototoksilisus" alammõiste, mida kasutatakse üksnes sellist fototoksiliste reaktsioonide kirjeldamiseks, mis tekivad nahal pärast kemikaalidega kokkupuutumist (pindmiselt või suukaudselt). Selliste fototoksiliste reaktsioonidega kaasneb alati rakkude mittespetsiifiline kahjustus (päikesepõletuselaadsed reaktsioonid).

Fotoallergia — omandatud immunoloogiline reageerimisvõime, mis ei esine esmasel kokkupuutel kemikaali ja valgusega ja mis vajab ühe kuni kahe nädala pikkust induktsiooniperioodi enne nahareaktsiooni avaldumist.

Fotogenotoksilisus — geneetilise tagajärjega genotoksiline vastureaktsioon, mis ilmneb pärast rakkude kokkupuudet UV-kiirguse/nähtava valguse mittegenotoksilise doosi ja mittegenotoksilise kemikaaliga.

Fotokantserogeensus — valguse ja kemikaali korduva toime tagajärjel indutseeritud kantserogeensus. Terminit "foto-kokantserogeensus" kasutatakse juhul, kui UV-kiirgusest indutseeritud kantserogeensus võimendub kemikaali toimel.

1.3. **Võrdlusained**

Lisaks positiivse kontrolli kemikaalile kloorpromasiinile, mida tuleb paralleelselt uurida igas määramises, soovitatakse hiljuti kehtestatud 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutada võrdluskemikaalidena käesoleva uuringu interlaboratoorsetel katsetustel kasutatavate kemikaalide hulgast valitud allkomplekti (1) (3) (13).

1.4. **Esialgsed kaalutlused**

Fototoksilisuse indutseerimisest on teateid mitut tüüpi kemikaalide korral (5) (6) (7) (8). Nende ainsaks ühiseks tunnuseks on nende võime absorbeerida valgusenergiat päikesevalguse piirkonnas. Vastavalt fotokeemia esimesele seadusele (Grotthaus-Draperi seadus) on fotoreaktsiooni toimumiseks vaja valguskvantide neeldumist piisaval hulgal. Seega tuleb arvestada, et enne bioloogiliste uuringute läbiviimist vastavalt käesolevale uuringujuhendile tuleb määrata uuritava kemikaali neeldumisspekter (nt vastavalt OECD Test Guideline 101-le). Kui molaarne ekstinktsioon/neeldetegur on väiksem kui 10 liiter × mol^{-1} × cm^{-1}, siis puudub kemikaalil fotoreaktiivne potentsiaal ning seda ei ole vaja uurida *in vitro* 3T3 NRU fototoksilises katses või mis tahes muus bioloogilises katses ebasoovitavate fotokeemiliste mõjude suhtes (Liide).

1.5. **Uurimismeetodi põhimõte**

Kindlaks on tehtud neli mehhanismi, mille abil valguse neeldumine (keemilise) kromofoori poolt võib põhjustada fototoksilise reaktsiooni (7). Nende kõigi tulemuseks on raku kahjustumine. Seega põhineb *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse kemikaali tsütotoksilisuse võrdlemisel, kui seda on uuritud mittetsütotoksilise UVA-kiirguse/nähtava valguse toimel ja selle puudumisel. Selles katses avaldatakse tsütotoksilisus vitaalvärvi neutraalpuna (NR) (9) kaasahaarde kontsentratsioonist sõltuva vähenemisega 24 tundi pärast mõjutamist uuritava kemikaali ja kiirgusega.

Kultiveerimiskeskkonnas hoitakse Balb/c 3T3 rakke 24 tundi kuni monokihi tekkimiseni. Kaht 96süvendilist plaati iga uuritava kemikaali jaoks inkubeeritakse eelnevalt 1 tund kemikaali kaheksa erineva kontsentratsiooni juures. Seejärel toimitakse kahest plaadist ühele UVA-kiirguse/nähtava valguse mittetsütotoksilise doosiga 5 J/cm^2 UVA (+ UV eksperiment), seejuures hoitakse teine plaat pimeduses (– UV eksperiment). Seejärel asendatakse mõlemal plaadil mõjutuskeskkond kultiveerimiskeskkonnaga ning pärast teist 24 tunnist inkubeerimist määratakse raku eluvõimelisus neutraalpuna kaasahaardega (NRU) 3 tunni jooksul. Raku suhteline eluvõimelisus, väljendatuna protsentides, mõjutamata negatiivse kontrolli suhtes, arvutatakse iga uuritud kaheksa kontsentratsiooni jaoks. Fototoksilisuse potentsiaali prognoosimiseks võrreldakse kiirgusega (+ UV) ja kiirguseta (– UV) katsetes saadud kontsentratsioonsõltuvusi, tavaliselt tasemel EC_{50}, st sellise kontsentratsiooni juures, mis inhibeerib rakkude eluvõimelisust 50 % võrra mõjutamata kontrollkatse suhtes.

1.6. **Kvaliteedinõuded**

Rakkude UVA tundlikkus, ajaloolised andmed – rakke tuleb regulaarselt kontrollida nende tundlikkuse suhtes UVA-kiirgusele. Rakud külvatakse sellise tihedusega, nagu see on *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses, kiiritatakse järgmisel päeval UVA-kiirguse doosiga 1–9 J/cm^2 ja rakkude eluvõimelisus määratakse üks päev hiljem NRU katse abil. Rakud vastavad kvaliteedinõuetele siis, kui nende eluvõimelisus pärast kiiritamist UVA-kiirgusega doosiga 5 J/cm^2 ei ole alla 80 % pimekontrolli eluvõimelisusest. Suurima UVA-kiirgusdoosiga 9 J/cm^2 ei tohi eluvõimelisus olla alla 50 % pimekontrolli omast. Kontrolli tuleb korrata pärast iga 10. rakkude passaaži.

Negatiivsete kontrollrakkude UVA tundlikkus, käesolev katse — uuring vastab kvaliteedinõuetele siis, kui negatiivse kontrollis (rakud Earli tasakaalustatud soolalahuses (EBSS) kas 1 % dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või 1 % etanooliga (EtOH) või ilma nendeta) on + UVA eksperimendi korral eluvõimelisus vähemalt 80 % kiiritamata rakkude omast samas lahustis samaaegses pimekatses (– UVA).

Negatiivse kontrolli eluvõimelisus — negatiivse kontrolli NR ekstraktis mõõdetud absoluutne optiline tihedus ($OD_{540\ NRU}$) näitab, kas igasse süvendisse külvatud 1×10^4 rakku on kasvanud normaalse kahekordistumisajaga kaks päeva kestva uuringu ajal. Katse vastab vastuvõetavuse kriteeriumile, kui keskmine $OD_{540\ NRU}$ väärtus mõjutamata kontrolli korral on ≥ 0,2.

Positiivne kontroll — igas *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses tuleb samaaegselt uurida ka tuntud fototoksilist kemikaali. EL/COLIPA valideerimisuuringus kasutati positiivse kontrollina kloorpromasiini (CPZ) ning seega on see soovitatav. Standardse eeskirjaga *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses uuritava CPZ jaoks määratleti järgmised uuringu vastuvõetavuse kriteeriumid: kiiritatud CPZ (+ UVA): EC_{50} = 0,1 kuni 2,0 µg/ml, CPZ kiiritamata (– UVA): EC_{50} = 7,0 kuni 90,0 µg/ml. Fotoärritusetegur (PIF), st EC_{50} nihe peab olema vähemalt 6.

Teisi tuntud fototoksilisi kemikaale, mis sobivad oma keemilise klassi või lahustuvust iseloomustavate suuruste poolest hindamisele kuuluva uuritava kemikaaliga, võib kasutada samaaegse positiivse kontrollina CPZ asemel. Sellisel juhul tuleb eelnevate andmete alusel adekvaatselt määratleda EC_{50} ja PIF või MPE (keskmine fotoefekt) kui katse vastuvõetavuse kriteeriumid.

1.7. **Uurimismeetodi kirjeldus**

1.7.1. *Valmistised*

1.7.1.1. Rakud

Valideerimisuuringus kasutati hiire fibroblasti raku püsiliini — Balb/c 3T3, kloon 31 — kas ATCCst või ECACCst, seetõttu on see liin soovitatav. Sama katse-eeskirja korral võib edukalt kasutada teisi rakke või rakuliine juhul, kui kultiveerimistingimused on kohandatud rakkude spetsiifilistele vajadustele, kuid samaväärsus peab olema tõestatud.

Rakke tuleb regulaarselt kontrollida mükoplasmaga saastatuse suhtes ning neid võib kasutada üksnes siis, kui taolise kontrolli tulemused on rahuldavad.

Kuna rakkude UVA-tundlikkus võib kasvada passaažide arvu suurenemisega, siis tuleb kasutada väikseima täheldatud passaažide arvuga Balb/c 3T3 rakke, eelistatavalt alla 100. On oluline, et Balb/c 3T3 rakkude UVA tundlikkust kontrollitaks regulaarselt vastavalt selles juhendis kirjeldatud kvaliteedikontrolli menetlusele.

1.7.1.2. Keskkonnad ja kultiveerimistingimused

Tavapärase rakupassaaži ja katse protseduuride käigus tuleb kasutada sobivaid kultiveerimiskeskkondi ja inkubeerimistingimusi. Balb/c 3T3 rakkude korral on nendeks DMEM, millele on lisatud 10 % vastsündinud vasika seerumit, 4 mM glutamiini, penitsilliini ja streptomütsiini, ning niisutatult inkubeerimine 37 °C/7,5 % CO_2 juures. Eelkõige on oluline see, et raku kultiveerimistingimused tagaksid kasutatavate rakkude või kasutatava rakuliini jaoks normaalsesse ajaloolisse vahemikku sattuva elueaga rakud.

1.7.1.3. Kultuuride ettevalmistamine

Kultiveerimiskeskkonda külvatakse külmutatud varukultuurist pärinevad rakud sobiva tihedusega ja neist võetakse enne nende kasutamist *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse vähemalt üks osakultuur.

Fototoksilisuse katse jaoks külvati rakud kultiveerimiskeskkonda sellise tihedusega, et kultuurid ei saavutaks konfluentsust uuringu lõpuks, st ajaks, mil rakkude eluvõimelisus määratakse 48 tundi pärast rakkude külvamist. 96süvendilises plaadis kasvanud Balb/c 3T3 rakkude jaoks on soovitav rakkude tihedus 1×10^4 rakku süvendis.

Iga uuritava kemikaali jaoks külvatakse rakud ühtmoodi kahte eraldiolevasse 96 süvendiga plaati, mida hoitakse kogu uuringu ajal samaaegselt samasugustes kultiveerimistingimustes, välja arvatud see aeg, kui üht plaati kiiritatakse (+ UVA/nähtav) ja teist pimedas hoitakse (– UVA/nähtav).

1.7.1.4. Metaboolne aktiveerimine

Arvestades et metaboliseeruvate süsteemide kasutamine on genotoksilise ja kantserogeense potentsiaali prognoosimisel tavaliseks nõudeks kõigi *in vitro* katsete korral, ei ole kuni tänaseni fototoksikoloogias teada ühtki kemikaali, mille jaoks oleks vaja metaboolset muundumist, et kemikaal toimiks fototoksiinina kas *in vivo* või *in vitro*. Seega pole vaja midagi eeldada ega teaduslikult põhjendada, et seda katset läbi viia metaboolse aktiveerimise süsteemis.

1.7.1.5. Uuritav kemikaal/ettevalmistamine

Uuritavad kemikaalid peavad olema värskelt valmistatud vahetult enne kasutamist, vaatamata sellele, et andmed püsivuse kohta näitavad vastuvõetavust hoiustamisele. Vajalikuks võib osutuda valmistamine punase valguse käes juhul, kui tõenäoliselt võib toimuda kiire fotodegradatsioon.

Uuritavad kemikaalid tuleb lahustada puhverdatud soolalahustes, nt Earli tasakaalustatud soolalahuses, (EBSS) või fosfaatpuhvriga füsioloogilises lahuses (PBS), mis peab kiiritamise ajal segava toime vältimiseks olema vaba valgulistest komponentidest ja valgust absorbeerivast värvilisest H-indikaatorist.

Vees piiratud lahustuvusega uuritavad kemikaalid tuleb lahustada sobivates lahustites 100kordses soovitud lõppkontsentratsioonis ning seejärel lahjendada vahekorras 1:100 puhverdatud soolalahusega. Kui kasutatakse lahustit, siis peab see esinema kõikides kultuurides konstantses ruumalas 1 % (mahuprotsent), st nii negatiivses kontrollis kui ka uuritava kemikaali kõikide kontsentratsioonide korral.

Soovitatavad lahustid on dimetüülsulfoksiid (DMSO) ja etanool (EtOH). Sobivad võivad olla ka teised madala tsütotoksilisusega lahustid (nt atsetoon), kuid neid tuleb põhjalikult hinnata spetsiifiliste omaduste alusel, nt reaktsioonid uuritava kemikaaliga, fototoksilise efekti kustutamine, radikaali püüdvad omadused.

Solubiliseerimise soodustamiseks võib vajadusel kasutada keerissegamist ja/või ultraheliga kiiritamist ja/või soojendamist temperatuurini 37 °C.

1.7.1.6. Kiiritamine UV-ga/ettevalmistamine

Valgusallikas — sobiva valgusallika valik ja sobiv filter on fototoksilisuse määramisel kõige olulisemad tegurid. UVA ja nähtava valguse piirkonnad assotsieeruvad tavaliselt fotosensibilisatsiooniga (7) (10), seejuures on UVB vähem oluline ning on otseselt väga tsütotoksiline, selle tsütotoksilisus suureneb 1 000 korda üleminekul lainepikkuselt 313 nm lainepikkusele 280 nm (11). Sobiva valgusallika valiku kriteeriumid peavad sisaldama põhilise nõudena seda, et valgusallikas kiirgaks lainepikkustel, mis neelduvad uuritavas kemikaalis, ning et valguskiirguse doos (tagatud mõistliku aja piires) on piisav tuntud fotosensibilisaatorite avastamiseks. Lisaks ei tohi kasutatava lainepikkusega valgus ja doosid olla liigselt kahjulikud uuritava süsteemi suhtes, siia kuulub ka soojuslik emissioon (infrapunane piirkond).

Optimaalse valgusallikana käsitletakse päikesevalguse imiteerimist solaarsimulaatoritega. Solaarsimulaatorites kasutatakse nii ksenoonkaarlampe kui ka (dopeeritud) elavhõbe-metallhalogeniidkaarlampe. Viimaste eeliseks on väiksem soojuskiirgus ja odavus, kuid sarnasus päikesevalgusega jätab soovida. Kuna kõik solaarsimulaatorid kiirgavad märgatavas ulatuses ka UVB kiirgust, siis tuleb see sobival viisil filtrida, et nõrgendada ülimalt tsütotoksilise UVB kiirgusele vastavaid lainepikkusi.

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katses tuleb kasutada kiirgusspektrit, mis on praktiliselt vaba UVB osast (UVA:UVB- 1:20). Trükis on avaldatud *in vitro* 3T3 NRU katses valideerimisuuringus kasutatud solaarsimulaatori filtritud kiirguse spektraaljaotus (3).

Dosimeetria — valguse intensiivsust (kiirkiiritustihedust) tuleb enne iga fototoksilisuse määramist regulaarselt kontrollida, kasutades sobivat lairiba UV-meetrit. UV-meeter peab olema kalibreeritud vastavalt allikale. UV-meetri tööd tuleb kontrollida ning selleks on soovitatav teise, samatüübilise ja samamoodi kalibreeritud võrdlus-UV-meetri kasutamine. Ideaalne oleks pikemate ajavahemike järel spektroradiomeetri kasutamine valgusallika filtritud kiirguse spektri mõõtmiseks ja lairiba-UV-meetri kalibratsiooni kontrollimiseks, kuid taolised seadmed vajavad vilunud käsitsemist vastava väljaõppe saanud töötajate poolt.

Valideerimisuuringus määratleti doos 5 J/cm^2 (UVA) olevat mittetsütotoksiline Balb/c 3T3 rakkude suhtes nii piisavalt võimekas ergastama isegi nõrgalt fototoksilisi kemikaale. Selleks, et 50 min jooksul saada 5 J/cm^2, peab kiiritustihedus olema 1,666 mW/cm^2. Kui kasutatakse teist rakuliini või erinevat valgusallikat, siis võib osutuda vajalikuks UVA doosi mõningane kohandamine, kasutades selleks kriteeriumit, et kiirgus ei tohi olla kahjulik rakkudele ja peab samas olema piisav standardsete fototoksiinide avastamiseks. Vajalik valguse toimeaeg arvutatakse järgmiselt:

$$T(\text{min}) = \frac{\text{kiirgusdoos (J/cm}^2) \times 1000}{\text{kiiritustihedus (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W s})$$

1.7.2. *Katsetingimused*

Uuritava kemikaali maksimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 100 µg/ml, sest kõik fototoksilised kemikaalid on avastatud madalamatel kontsentratsioonidel, kuna suuremate kontsentratsioonide korral suureneb vale-positiivsete tulemuste (ülehinnanguliste) esinemissagedus (13). Uuritava kemikaali suurimale kontsentratsioonile vastav pH peab olema rahuldava väärtusega (pH vahemik: 6,5–7,8).

Valguskiirgusega (+ UVA) ja selle puudumisel (– UVA) uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemik tuleb adekvaatselt kindlaks määrata kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemiseks mõeldud eelnevate eksperimentidega. Kontsentratsioonivahemik ja kontsentratsiooniseeriat iseloomustavad sirglõigud tuleb valida selliselt, et vastureaktsiooni kontsentratsioonsõltuvused vastaksid olulisel määral eksperimentaalsetele andmetele. Kontsentratsiooniseeriates tuleb kasutada geomeetrilist jada (konstantse lahjendusteguriga).

1.7.3. *Katsemenetlus* ([1])

1.7.3.1. Esimene päev

Valmistage rakususpensioon 1×10^5 rakku/ml kultiveerimiskeskkonnas ja jaotage 100 µl kultiveerimiskeskkonda ainult 96 süvendiga koekultuuri mikrotiiterplaatide äärmistesse süvenditesse (= tühikatse). Ülejäänud süvenditesse jaotage igasse 100 µl suspensiooni, milles on 1×10^5 rakku/ml (= 1×10^4 rakku/süvendis). Iga kemikaali jaoks valmistage ette kaks plaati: üks tsütotoksilisuse (– UVA) määramiseks, teine fototsütotoksilisuse (+ UVA) määramiseks.

Inkubeerige rakke 24 tundi (7,5 % CO_2, 37 °C) kuni poolkonfluentse monokihi moodustumiseni. Inkubatsiooniperiood võimaldab rakkude taastumist ja kokkukleepumist ning eksponentsiaalset kasvu.

1.7.3.2. Teine päev

Pärast inkubeerimist dekanteerige kultiveerimiskeskkond rakkudelt ära ja peske iga süvendit kaks korda 150 µl EBSS/PBSiga. Lisage 100 µl sobivas kontsentratsioonis uuritavat kemikaali sisaldavat EBSS/PBSi või ainult lahustit (negatiivne kontroll). Kasutage uuritava kemikaali 8 erinevat kontsentratsiooni. Inkubeerige rakke koos uuritav kemikaaliga pimedas 60 minuti jooksul (7,5 % CO_2, 37 °C).

Uuringu (+ UVA) osa tegemiseks kiiritage rakke toatemperatuuril 50 minutit läbi 96 süvendiga plaadi kaane UVA kiirgusega 1,7 mW/cm^2 (= 5 J/cm^2). Tuulutage ventilaatoriga, vältimaks H_2O kondenseerumist kaane all. Hoidke dubleerivaid plaate (– UVA) toatemperatuuril pimedas kastis 50 minutit (= UVAga kiiritamise aeg).

Dekanteerige uuritav lahus ära ning peske kaks korda 150 µl EBSS/PBSiga. Asendage EBSS/PBS kultiveerimiskeskkonnaga ja inkubeerige (7,5 % CO_2, 37 °C) ööpäeva jooksul (18–22 tundi).

1.7.3.3. Kolmas päev

Mikroskoopiline hinnang

Uurige rakke faasikontrastimikroskoobi abil. Märkige üles uuritava kemikaali tsütotoksilisest toimest põhjustatud muutused rakkude morfoloogias. See kontroll on soovitatav katsevigade välistamiseks, kuid neid andmeid ei kasutata tsütotoksilisuse või fototoksilisuse hindamisel.

Neutraalpuna kaasahaarde katse

Peske rakke 150 µl eelsoojendatud EBSS/PBSiga. Eemaldage pesemislahus ettevaatlikult ära valades. Lisage 100 µl NR keskkonda ja inkubeerige 3 tundi temperatuuril 37 °C niiskes atmosfääris, mis sisaldab 7,5 % CO_2.

Pärast inkubeerimist eemaldage NR keskkond, peske rakke 150 µl EBSS/PBSiga. Dekanteerige ja blottige EBSS/PBS täielikult. (Vajadusel: tsentrifuugige pöördplaat.)

Lisage täpselt 150 µl NRi desorbeerimislahust (äsjavalmistatud etanool/äädikhape).

Loksutage mikrotiiterplaati kiiresti 10 minutit mikrotiiterplaatide jaoks mõeldud loksutusseadmes, kuni NR on rakkudest ekstraheeritud ja on moodustunud homogeenne lahus.

Määrake NR ekstrakti optiline tihedus spektrofotomeetriga lainepikkusel 540 nm, kasutades võrdlusena pimekatse süvendeid. Salvestage andmed sobivas failiformaadis (nt ASCII) järgneva analüüsi tarbeks.

2. **ANDMED**

2.1. **Andmete kvaliteet ja hulk**

Andmed peavad võimaldama UVA/nähtava valguskiirgusega ja selle puudumisel saadud kontsentratsioonsõltuvuse mõtestatud analüüsi. Tsütotoksilisuse esinemisel tuleb nii kontsentratsioonide vahemik kui ka üksikutele kontsentratsioonsõltuvustele vastavad sirglõigud valida selliselt, et oleks võimalik eksperimentaalsete andmete lähendamine kõveraga. Tingituna asjaolust, et uuritavad kemikaalid võivad pimekatses (– UVA) mitte olla tsütotoksilised kuni kindla piirkontsentratsioonini 100 µg/ml, kuid väga tsütotoksilised kiiritamisel (+ UVA), võib osutuda vajalikuks andmete kvaliteedi adekvaatsuse nõude täitmiseks kasutada eksperimendi mõlemas osas mitme suurusjärgu võrra erinevaid uuritavaid kontsentratsioone. Kui tsütotoksilisust ei leitud eksperimendi mõlemas osas (– UVA ja + UVA), siis piisab katsete läbiviimisest pikima sirglõiguga juhul üksikdoosist suurima kontsentratsioonini.

Seejuures puudub vajadus ühese positiivse tulemuse verifitseerimiseks korduskatse läbiviimisega. Lisaks ei ole vaja verifitseerida üheselt negatiivset tulemust eeldusel, et uuritava kemikaaliga tehti katse piisavalt suure kontsentratsiooni juures. Taolistel juhtudel piisab ühest põhikatsest, mida kinnitab üks või enam eelkatset sobiva vahemiku leidmiseks.

Katsed rajajoonele vastavate tulemustega prognoosiva mudeli kehtivusraja läheduses kuuluvad verifitseerimiseks kordamisele.

Kui korduskatseid peetakse vajalikuks, siis võib osutuda ühese tulemuse saamiseks vajalikuks katsetingimuste varieerimine. Selles katses on olulisimaks muutujaks uuritava kemikaali lahuste valmistamine. Seega võib katse kordamisel olla kõige olulisem nende tingimuste (kaaslahusti, tritureerimine, ultrahelitöötlus) varieerimine. Alternatiivselt võib kõne alla tulla kiirituseelse inkubatsiooniaja varieerimine. Lühem aeg võib olla oluline vees ebapüsivate kemikaalide korral.

2.2. **Tulemuste töötlemine**

Võimaluse korral tuleb alati määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis vastab rakulise NRU 50 %lisele inhibeerimisele (EC_{50}). Seda võib teha mis tahes sobiva mittelineaarse regressioonanalüüsi alusel (eelistatavalt Hilli funktsioon või logistiline regressioon) kontsentratsioonsõltuvuse andmete põhjal või kasutades muid lähendusmeetodeid (14). Enne EC_{50} kasutamist edasistes arvutustes tuleb hoolikalt kontrollida lähenduse headust. Alternatiivselt võib EC_{50} arvutamiseks kasutada ka graafilisi lähendusmeetodeid. Sel juhul on soovitav tõenäosuspaberi kasutamine (*x*-telg: log, *y*-telg: probit), sest paljudel juhtudel muutub kontsentratsioonsõltuvus pärast sellist teisendust lineaarseks.

2.3. **Tulemuste hindamine (prognoosivad mudelid)**

2.3.1. *Prognoosiv mudel, versioon 1: fotoärritatavuse tegur (PIF)*

Kui mõlemal juhul, nii valguskiirguse esinemisel (+ UVA) kui ka selle puudumisel (– UVA), on saadud täielikud kontsentratsioonsõltuvused, siis saab fotoärritatavuse tegurit (PIF) arvutada järgmise valemi abil:

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

PIF < 5 korral ei prognoosita fototoksilist potentsiaali, kuna PIF ≥ 5 korral prognoositakse fototoksilise potentsiaali olemasolu.

Kui kemikaal osutub tsütotoksiliseks üksnes + UVA korral ning ei ole tsütotoksiline — UVA katsetes, siis ei saa PIFi väärtust arvutada, kuigi see tulemus viitab fototoksilisele potentsiaalile. Taolistel juhtudel saab arvutada "> PIF" juhul, kui (– UV) tsütotoksilisuse katse on tehtud kuni maksimaalse kontsentratsioonini (C_{max}) ning seda väärtust kasutatakse suuruse "> PIF" arvutamiseks;

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

Kui määrata saab üksnes "> PIF", siis prognoosib mis tahes väärtus, mis on > 1, fototoksilist potentsiaali.

Kui nii EC_{50} (– UV) kui ka EC_{50} (+ UV) ei saa arvutada tingituna asjaolust, et kemikaalil ei ilmne mingit tsütotoksilisust kuni katsetes kasutatud suurima kontsentratsioonini, siis on see fototoksilise potentsiaali puudumise tunnuseks. Taolistel juhtudel kasutatakse tulemuse iseloomustamiseks formaalset väärtust "PIF = *1";

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

Kui määrata saab üksnes "PIF = *1", siis prognoosib see fototoksilise potentsiaali puudumist.

Juhtudel b ja c tuleb *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses saavutatud kontsentratsioonid fototoksilise potentsiaali prognoosimisel hoolikalt arvesse võtta.

2.3.2. *Prognoosiv mudel, versioon 2: keskmine fotoefekt (MPE)*

Alternatiivselt võib kasutada fototoksilise potentsiaali prognoosimisel mudeli uudset versiooni, mis töötati välja EL/COLIPA valideerimisuuringu (15) andmete põhjal ja uuriti pimekatse tingimustes järgnevas UV filterkemikaalide *in vitro* fototoksilisuse uuringus (13). See mudel on vaba PIF-mudeli piirangutest juhtudel, kus ei ole võimalik määrata EC_{50}. Mudel kasutab "keskmist fotoefekti", väärtust, mis põhineb täielike kontsentratsioonsõltuvuste võrdlusel. MPE mudeli rakendamiseks töötati Humboldti nim. Ülikoolis (Berliin) välja spetsiaalne arvutitarkvara, mida on sealt võimalik hankida.

2.4. **Tulemuste tõlgendamine**

Positiivne tulemus *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse (PIF ≥ 5 või MPE ≥ 0,1) viitab sellele, et uuritav aine omab fototoksilist potentsiaali. Kui see tulemus on saadud kontsentratsioonidel alla 10 μg/ml, siis on uuritav kemikaal võimeline toimima erinevates kokkupuutetingimustes ka *in vivo* tingimustes fototoksiinina. Kui positiivne tulemus saadi üksnes kõige suurema uuritava kontsentratsiooni, 100 μg/ml korral, võib edasise seisukohtade jaoks osutuda vajalikuks riskianalüüs või fototoksiline võime. Sinna hulka võivad kuuluda sissetungimist iseloomustavad andmed, imendumine ja kemikaali kuhjumine nahas või kemikaali uurimine alternatiivses kinnitavas katses, nt kasutades inimnaha *in vitro* inimnaha mudelit.

Negatiivne tulemus *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses (PIF < 5 või MPE < 0,1) viitab sellele, et uuritav aine ei olnud kultiveeritud imetajarakkudele kasutatud tingimustes fototoksiline. Juhtudel, kus kemikaali saab uurida kuni suurima kontsentratsioonini 100 μg/ml, viitab negatiivne tulemus sellele, et kemikaal ei oma fototoksilist potentsiaali ja fototoksilisuse esinemine *in vivo* on ebatõenäoline. Juhtudel, kus kontsentratsioontoksilisuse identset sõltuvust (EC_{50} + UV ja EC_{50} – UV) täheldati madalamate kontsentratsioonide juures, on andmete tõlgendamine samasugune. Kui aga toksilisust ei ilmnenud (+ UV ja – UV) ja kui vees lahutuvuse tõttu on piirkontsentratsioon alla 100 μg/ml, siis on uuritava aine katses kasutamine küsitav ning kaaluda tuleb kinnitavate uuringute läbiviimist (nt kas *in vitro* naha mudeli või *ex vivo* naha mudeli või *in vivo* katsete alusel).

3. **ARUANDLUS**

Uuringuprotokoll

Uuringuprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Uuritav kemikaal:

— identifitseerimisandmed ja CASi nr, kui see on teada,

— füüsikaline loomus ja puhtus,

— uuringu tegemise seisukohalt olulised füüsikalis-keemilised omadused,

— püsivus ja fotostabiilsus, kui see on teada.

Lahusti:

— lahusti valiku põhjendus,

— uuritava kemikaali lahustuvus selle lahustis,

— lahusti protsendiline sisaldus töötluskeskkonnas (EBSS või PBS).

Rakud:

— tüüp ja rakkude päritolu,

— mükoplasma puudumine,

— rakupassaažide arv, kui see on teada,

— rakkude UVA-tundlikkus, mis on määratud *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutatud kiiritusseadmega.

Katsetingimused (a) — inkubeerimine enne ja pärast töötlemist:

— kultiveerimiskeskkonna tüüp ja koostis,

— inkubeerimistingimused (CO_2 kontsentratsioon, temperatuur, niiskus),

— inkubeerimise kestus (eelinkubeerimine, järelinkubeerimine).

Katsetingimused (b) — kemikaaliga töötlemine:

— UV–/nähtava valguskiirgusega ja ilma selleta kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonide valiku põhjendus,

— uuritava kemikaali piiratud lahustuvuse ja tsütotoksilisuse puudumisel suurima uuritud kontsentratsiooni põhjendus,

— töötlemiskeskkonna tüüp ja koostis (puhverdatud soolalahus),

— kemikaaliga töötlemise kestus.

Katsetingimused (c) — kiiritus:

— kasutatud valgusallika valiku põhjendus,

— valgusallika kiirgustiheduse spektraalkarakteristikud,

— kasutatud filtri(te) läbilaskvus-/neeldumiskarakteristikud,

— kiirgusmõõturite karakteristikud ja nende kalibreerimise üksikasjad,

— valgusallika kaugus uuritavast süsteemist,

— UVA kiirgustihedus sellel kaugusel, ühikutes mW/cm^2,

— UV-/nähtava valguskiirguse toime kestus,

— UVA kiirgusdoos (kiirgustihedus × aeg), ühikutes J/cm^2,

— rakukultuuride temperatuur kiiritamise ajal ja samal ajal pimedas hoitud rakukultuuride temperatuur.

Katsetingimused (d) — NRU-katse:

— NR keskkonna koostis,

— NR inkubeerimise kestus,

— inkubeerimistingimused (CO_2 kontsentratsioon, temperatuur, niiskus),

— NR ekstraheerimistingimused (ekstrahent, kestus),

— NR optilise tiheduse spektrofotomeetrilisel määramisel kasutatud lainepikkus,

— teine lainepikkus (võrdlus), kui seda on kasutatud,

— spektrofotomeetri tühja küveti sisu, kui seda on kasutatud.

Tulemused:

— rakkude eluvõimelisus uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil, avaldatuna protsentides kontrollproovi keskmisest eluvõimelisusest,

— kontsentratsioonsõltuvuse kõverad, (teljestikus uuritava kemikaali kontsentratsioon — rakkude suhteline eluvõimelisus), määratud samaaegsetes + UVA ja – UVA eksperimentides,

— kontsentratsioonsõltuvuskõverate analüüs: võimaluse korral EC_{50} (+ UVA) ja EC_{50} (– UVA) arvutus/määramine,

— UVA–/nähtava valguskiirguse esinemisel ja selle puudumisel mõõdetud kahe kontsentratsioonsõltuvuskõvera võrdlemine kas fotoärritatavusteguri (PIF) määramise või keskmise fotoefekti (MPE) määramise abil,

— fototoksilise potentsiaali klassifitseerimine,

— katse vastuvõtu kriteerium (a) — samaaegne negatiivne kontroll:

  — kiiritatud ja kiiritamata rakkude absoluutne eluvõimelisus (optiline tihedus või NR ekstrakt),

  — eelnevad andmed negatiivse kontrolli, keskväärtuse ja standardhälbe kohta,

— katse vastuvõtu kriteerium (a) — samaaegne positiivne kontroll:

  — positiivse kontrolli kemikaali EC_{50} (+ UVA) ja EC_{50} (– UVA) ning PIF,

  — eelnevad andmed positiivse kontrolli kemikaali kohta: EC_{50} (+ UVA) ja EC_{50} (– UVA) ning PIF, keskväärtus ja standardhälve.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 314–348.

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

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

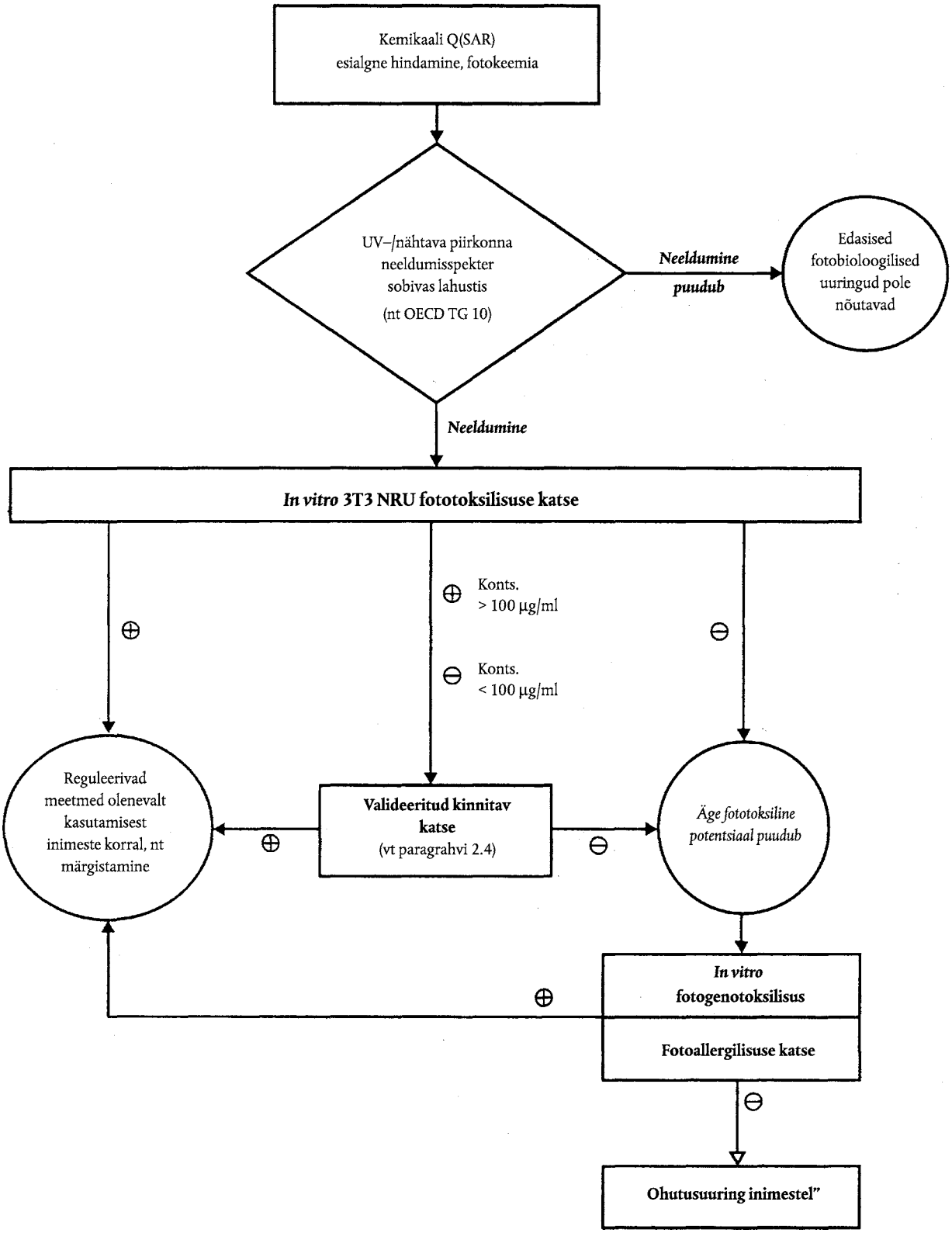
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity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

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

Liide

3T3 NRU osa kemikaalide fototoksilisuse uuringu jadakäsitlusel



(1) Täiendavaid üksikasju võib leida viites 12."