32000L0033

KOMISIJAS DIREKTĪVA 2000/33/EEK

(2000. gada 25. aprīlis),

kas divdesmit septīto reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu (*)

(dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes Direktīvu 67/548/EEK (1967. gada 27. jūnijs) par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 1999/33/EK [2], un jo īpaši tās 28. pantu,

tā kā:

(1) Direktīvas 67/548/EEK V pielikumā ir izklāstītas metodes vielu un preparātu fizikāli ķīmisko īpašību, toksicitātes un ekotoksicitātes noteikšanai. Šis pielikums ir jāpielāgo tehnikas attīstībai.

(2) Saskaņā ar Padomes Direktīvas 86/609/EEK (1986. gada 24. novembris) par dalībvalstu normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz eksperimentāliem un citiem zinātniskiem nolūkiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību [3] 7. panta 2. punktu, ja vēlamā rezultāta iegūšanai ir pieejama cita zinātniski pieņemama un pamatota metode, tad eksperimentu, kas saistīts ar dzīvnieku izmantošanu, neveic.

(3) Komisija paredz Direktīvas 67/548/EEK V pielikumā iekļaut atsevišķas alternatīvas testa metodes, kas nav saistītas ar dzīvnieku izmantošanu, lai tās būtu pieejamas ķīmisko vielu testiem saskaņā ar Direktīvas 67/548/EEK 3. panta 1. punktu.

(4) Šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi Komiteja to direktīvu pielāgošanai tehnikas attīstībai, kuras attiecas uz tehnisko šķēršļu atcelšanu bīstamu vielu un preparātu tirdzniecībā,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Šīs direktīvas I un II pielikuma tekstu pievieno Direktīvas 67/548/EEK V pielikuma B daļai.

2. pants

1. Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvi un administratīvi akti, kas vajadzīgi, lai, vēlākais, līdz 2001. gada 1. oktobrim izpildītu šīs direktīvas prasības. Par to dalībvalstis tūlīt informē Komisiju.

Kad dalībvalstis pieņem šos noteikumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka, kā izdarāmas šādas atsauces.

2. Dalībvalstis dara zināmus Komisijai galvenos savu tiesību aktu noteikumus, ko tās pieņēmušas jomā, uz ko attiecas šī direktīva, un šās direktīvas un pieņemto valsts tiesību aktu noteikumu korelāciju tabulu.

3. pants

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 2000. gada 25. aprīlī

Komisijas vārdā —

Komisijas locekle

Margot WALLSTRÖM

(*) Apstiprināts pirms 26. pielāgošanas.
(1) OV 196, 16.8.1967., 1. lpp.
(2) OV L 199, 30.7.1999., 57. lpp.
(3) OV L 358, 18.12.1986., 1. lpp.

I PIELIKUMS

"B.40. ĀDAS KOROZIJA

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Divus ādas korozivitātes *in vitro* testus — žurku ādas elektriskās pretestības (*TER*) noteikšanu un testu, izmantojot cilvēka ādas modeli, Eiropas Centrs Alternatīvo metožu apstiprināšanai (*ECAMV*, Apvienotais Pētniecības centrs, Eiropas Komisija) ir apstiprinājis kā zinātniski derīgus[1,2,3]. *ECAMV* apstiprināšanas pētījums pierādīja, ka abi testi dod iespēju ticami atšķirt zināmus ādas korodantus no nekorodantiem. Turklāt testa ziņojums, kura pamatā ir cilvēka ādas modelis, deva iespēju labot atšķirību starp korozijas efektu pakāpēm (zināmiem spēcīgiem ādas korodantiem, R35, un citiem ādas korodantiem, R34)[2]. Ir dots abu testu apraksts un procedūras; testa izvēli nosaka lietotāja specifiskās prasības un priekšrocības.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcijas**

Ādas korozija: neatgriezenisku ādas audu bojājumu radīšana pēc testa materiāla pielietošanas.

1.3. **Standartvielas**

Nav konkretizētas, bet skatīt 1.5.3.4. un 1.7.2.3. punktu.

1.4. **Testa metodes būtība — žurkas ādas *TER* noteikšana**

Testa materiālu lieto humāni nogalinātu jaunu žurku ādas epidermas diskiem līdz pat 24 stundām. Korozīvos materiālus nosaka pēc to spējas radīt barjeras funkciju un normāla raga slāņa viengabalainības zudumu, ko mēra kā ādai piemītošās *TER* pazemināšanos zem sliekšņa līmeņa (5 kΩ)[4,5]. Kairinoši un nekairinoši materiāli nepazemina *TER* zem sliekšņa līmeņa. Virsmas aktīvu vielu un neitrālu organisko vielu (definīciju skatīt atsaucē[6]) testa procedūrā var iekļaut krāsvielu saistīšanas stadiju, lai samazinātu konkrēti ar šīm ķīmiskajām vielām iegūtos kļūdaini pozitīvos rezultātus[2,7].

1.5. **Testa metodes apraksts — žurkas ādas *TER* noteikšana**

1.5.1. *Dzīvnieki*

Ādas disku sagatavošanai nepieciešamas jaunas (20 — 23 dienas vecas) žurkas (*Wistar* vai līdzvērtīga dzimta). Muguras un sānu apmatojumu rūpīgi noņem ar mazu, dzīvniekiem paredzētu skuveklīti. Pēc tam, kad ādas laukumu iemērc antibiotiku šķīdumā (piemēram, streptomicīnu, penicilīnu, hloramfenikolu un amfotericīnu saturošā šķīdumā ar koncentrāciju, kas ir efektīva baktēriju augšanas kavēšanai), dzīvniekus mazgā, uzmanīgi noslaukot. Trešajā un ceturtajā dienā pēc pirmās mazgāšanas antibiotiku šķīdumā dzīvniekus mazgā ar antibiotikām vēlreiz un izmanto trīs dienu laikā (ādas preparātu gatavošanai izmantojamie dzīvnieki nedrīkst būt vecāki par 31 dienu).

1.5.2. *Ādas disku sagatavošana*

Dzīvniekus humāni nogalina. Tad noņem dzīvnieka muguras ādu un noņem no tās tauku pārpalikumu, uzmanīgi nokasot. Ādu pārliek pār politetrafluoretilēna (PTFE) caurulītes galu tā, lai nodrošinātu epidermas virsmas saskari ar caurulīti. Lai ādu noturētu vajadzīgajā vietā, caurulītes galā stingri uzmauc "O" veida gumijas gredzenu un audu atlikumu nogriež. Caurulītes un "O" veida gredzena izmēri ir parādīti 1. zīmējumā. Pēc tam "O" veida gumijas gredzenu PTFE caurulītes galā rūpīgi iezież ar vazelīnu un uzmauc uz caurulītes. Uztvērējkamerā, kas satur magnija sulfāta šķīdumu (154 mM), caurulīti nostiprina ar atspēres spaili (2. zīmējums)

1.5.3. *Testa procedūra*

1.5.3.1. Testa materiāla pielietošana

Šķidras testa vielas (150 µl) pielieto, apstrādājot epidermas virsmu caurulītes iekšpusē (2. zīmējums). Testējot cietus materiālus, cieto vielu diskam jāpielieto pietiekamā daudzumā, lai nodrošinātu visu epidermas virsmas nosegšanu. Pēc tam virs cietās vielas pievieno dejonizētu ūdeni (150 µl) un caurulītes viegli sakrata. Starp testa vielām un ādu jābūt maksimālai saskarei. Dažām cietajām vielām to var panākt, testa vielas uzsildot līdz 30 °C, lai izkausētu, vai arī tās sasmalcinot, lai iegūtu granulētu materiālu vai pulveri.

Katrai testa vielai lieto trīs ādas diskus. Testa vielas pielieto 24 stundas (skatīt arī 1.5.3.4.). Testa vielas noskalo, mazgājot ar krāna ūdens strūklu, temperatūrā līdz 30 °C tik ilgi, līdz viss ir noskalots. Caurulītē sacietējušo testa vielu noskalošanu var atvieglot, mazgājot ar siltu ūdens strūklu aptuveni 30 °C temperatūrā.

1.5.3.2. TER mērījumi

TER mēra, izmantojot zemas voltāžas, maiņstrāvas tiltu (piem., AIM 401 vai 6401, vai līdzvērtīgu). Pirms elektriskās pretestības mērīšanas samazina ādas virsmas spriegumu, pievienojot 70 % etanolu tā, lai pārklātu epidermu. Pēc dažām sekundēm etanolu nolej, apgriežot caurulīti otrādi, un tad, pievienojot 3 ml magnija sulfāta šķīduma (154 mM), veic audu hidrēšanu. Lai veiktu diska pretestības mērījumus kΩ/ādas disks, maiņstrāvas tilta elektrodus novieto vienā vai otrā ādas diska pusē (2. zīmējums). Elektroda izmēri un zem žokļspailēm novietotā elektroda garums parādīts 1. zīmējumā. Iekšējā (tievā) elektroda spaile pretestības mērīšanas laikā ir novietota uz PTFE caurulītes gala, lai vajadzīgais elektroda garums būtu iemērkts magnija sulfāta šķīdumā. Ārējais (tievais) elektrods ir novietots uztvērējkameras iekšpusē tā, lai tas balstītos uz kameras pamatnes. Attālumu starp atsperes spailes pamatni un PTFE caurulītes pamatni saglabā nemainīgu (1. zīmējums), jo šis attālums ietekmē iegūtās pretestības lielumu.

Jāatzīmē, ka, ja izmērītais pretestības lielums pārsniedz 20 kΩ, cēlonis tam var būt testa vielas izveidotais diska epidermas virsmas pārklājums. Šo pārklājumu var mēģināt noņemt, piemēram, ar cimdotas rokas īkšķi cieši aizspiežot PTFE caurulīti un apmēram 10 sekundes kratot; magnija sulfāta šķīdumu nolej un pretestības mērījumu atkārto ar svaigu magnija sulfātu.

Vidējos *TER* rezultātus atzīst par derīgiem ar nosacījumu, ka konkurējošie pozitīvie un negatīvie kontroles lielumi ietilpst pieņemamās metodes robežās. Ieteiktās kontrolvielas un ar tām saistītās pieļaujamās pretestības robežas aprakstītajai metodei un iekārtai ir:

Kontrole	Viela	Pretestības diapazons (kΩ)
Pozitīva	10 M sālsskābe (36 %)	0,5 — 1,0
Negatīva	Destilēts ūdens	10 — 25

1.5.3.3. Modificēta procedūra virsmas aktīvām vielām un organiskām vielām

Ja *TER* lielumi testa vielām, kuras ir virsmas aktīvas vielas vai organiskas vielas, ir mazāki vai vienādi ar 5 kΩ, audiem var veikt krāsvielas caurlaidības novērtējumu. Šī procedūra noteiks, vai rezultāti nav kļūdaini pozitīvi[2].

1.5.3.3.1. Sulforodamīna B krāsvielas pielietošana un aizskalošana

Pēc sākotnējās apstrādes ar testējamo vielu katra ādas diska epidermas virsmai pielieto divu stundu apstrādi ar 150 µl sulforodamīna B krāsvielas 10 % (m/V) šķīdumu destilētā ūdenī. Tad ādas diskus mazgā krāna ūdens strūklā pie istabas temperatūras apmēram 10 sekundes, lai noskalotu jebkuru nepiesaistītās krāsvielas pārpalikumu. Katru ādas disku rūpīgi noņem no PTFE caurulītes un ievieto trauciņā (piem., 20 ml stikla sinitilācijas trauciņā), kas satur dejonizētu ūdeni (8 ml). Trauciņus uzmanīgi krata 5 minūtes, lai aizskalotu nepiesaistītās krāsvielas pārpalikumu. Tad atkārto skalošanas procedūru, pēc kuras ādas diskus noņem un ievieto trauciņos, kas satur 5 ml 30 % nātrija dodecilsulfāta (NDS) šķīdumu destilētā ūdenī un atstāj pa nakti inkubēties 60 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas katru ādas disku izņem un izmet, un atlikušo šķīdumu centrifugē 8 minūtes 21 °C temperatūrā (relatīvais centrifūgas spēks ~175). No šķīduma virs nogulsnēm ņem 1 ml paraugu, pēc tam atšķaida attiecībā 1: 5 (V/V) (t.i., 1 ml + 4 ml) ar 30 % (m/V) NDS destilētā ūdenī. Mēra šķīduma optisko blīvumu (OB) aptuveni pie 565 nm.

1.5.3.3.2. Krāsvielas satura aprēķins

Sulforodamīna B krāsvielas saturu diskā aprēķina pēc OB lieluma (sulforodamīna B krāsvielas molārās ekstinkcijas koeficients pie 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulārais svars = 580). Sulforodamīna B krāsvielas saturu nosaka katram diskam un tad atkārtojumiem aprēķina krāsvielas vidējo saturu. Krāsvielas piesaistes vidējos rezultātu atzīst par derīgiem ar nosacījumu, ka paralēlās kontroles lielumi ietilpst pieņemamās metodes robežās. Aprakstītajai metodei un iekārtai pieņemamais krāsvielas satura diapazons kontrolvielām ieteicams:

Kontrole	Viela	Krāsvielas satura diapazons (μg/disks)
Pozitīva	10 M sālsskābe (36 %)	40 — 100
Negatīva	Destilēts ūdens	15 — 35

1.5.3.4. Papildinformācija

Testa vielas var lietot arī īsākai iedarbībai uz ādas diskiem (piem., 2 stundas), lai noteiktu tos materiālus, kas ir ļoti spēcīgi korodanti. Tomēr apstiprināšanas pētījumā atklājās, ka *TER* pārbaude, novērtējot korozivitātes potenciālu, vairākām testa vielām pēc divu stundu pielietojumu ādas diskiem dod paaugstinātus rezultātus[2], kaut arī pēc 24 stundu pielietošanas tā ļauj pareizi noteikt korozīvus un nekorozīvus.

Testa iekārtas īpašības, izmēri un izmantotā eksperimenta procedūra var ietekmēt iegūtos *TER* lielumus. Korozijas robežlielums 5 kΩ noteikts, izejot no datiem, kas iegūti, izmantojot īpašu, šajā metodē aprakstītu iekārtu un procedūru. Ja būtiski maina testa apstākļus, var pielietot atšķirīgus robežlielumus un kontroles lielumus. Tāpēc metodoloģijas izvēli un pretestības robežlielumu kalibrāciju ieteicams veikt, testējot virkni standartvielu, kuras atlasītas no apstiprināšanas pētījumā izmantotajām ķīmiskajām vielām[3].

1.6. **Testa metodes princips — cilvēka ādas modeļa pārbaude**

Testa materiālu pielieto laika periodā pat līdz 4 stundām lokālā veidā cilvēka ādas trīsdimensiju modelim, kurš ietver atjaunotu epidermu ar funkcionālu raga slāni. Korozīvos materiālus nosaka pēc to spējas izraisīt šūnu dzīvotspējas pazemināšanos (kā noteikts, piemēram, izmantojot *MTT* samazināšanās pārbaudi) līdz lielumam, kas mazāks par konkrētajam iedarbības periodam noteikto robežlīmeni. Pārbaudes princips ir saskaņā ar hipotēzi, ka ķīmiskās vielas, kuras ir korodanti, ir tās, kas spēj iespiesties raga slānī (ar difūzijas vai erozijas palīdzību) un kuras ir pietiekami citotoksiskas, lai izraisītu šūnu bojāeju apakšējā šūnu slānī.

1.7. **Testa metodes apraksts — cilvēka ādas modeļa pārbaude**

1.7.1. *Cilvēka ādas modeļi*

Cilvēka ādas modeļi var būt dažādas izcelsmes, bet tiem jāatbilst noteiktiem kritērijiem. Modelim jābūt ar funkcionālu raga slāni, zem kura ir dzīvu šūnu slānis. Raga slānim jābūt ar atbilstošām barjeras funkcijām. To var pierādīt, demonstrējot modeļa noturību pret citotoksiskumu pēc tam, kad pielietotas vielas, kas zināmas kā citotoksiskas, bet kuras parasti netiek cauri raga slānim. Modelim jābūt tādam, kas noteiktos eksperimenta apstākļos spēj dot reproducējamus rezultātus.

Dzīvo šūnu dzīvotspējai modelī jābūt pietiekami augstai, lai varētu labi atšķirt pozitīvās un negatīvās kontrolvielas. Šūnu dzīvotspējai (piemēram, kā mērīts ar *MTT* samazināšanās daudzumu, t.i., OB lielumu) pēc negatīvās kontroles vielas iedarbības jāsamazinās pieņemamās konkrētā modeļa robežās. Līdzīgā veidā pozitīvās kontroles (attiecībā pret tām, kuras ir negatīvās kontroles) vielām šūnu dzīvotspējas vērtībai jābūt tādai, kas ietilpst noteiktās robežās. Vissvarīgāk pierādīt, ka izmantotais prognozes modelis atbilst starptautiskajiem apstiprināšanas standartiem[2].

1.7.2. *Testa procedūra*

1.7.2.1. Testa materiāla pielietošana

Attiecībā uz šķidriem materiāliem testa viela jāpielieto pietiekamā daudzumā, lai nosegtu ādas virsmu (vismaz 25 μl/cm^2). Attiecībā uz cietām vielām testa viela jāpielieto pietiekamā daudzumā, lai nosegtu ādu, un tad tā jāsamitrina, lai nodrošinātu labu saskari ar ādu; vajadzības gadījumā, pirms pielietošanas cietas vielas jāsasmalcina pulverī. Jāparāda, ka pielietošanas metode ir atbilstīga plašam ķīmisko vielu spektram[2]. Iedarbības perioda beigās testa materiālu no ādas virsmas rūpīgi nomazgā ar sāls šķīdumu.

1.7.2.2. Šūnas dzīvotspējas mērījumi

Šūnas dzīvotspējas mērījumiem var izmantot jebkuru kvantitatīvu, apstiprinātu metodi. Visbiežāk izmantotā pārbaude ir *MTT* samazināšanās pārbaude, kura pazīstama kā tāda, kas dažādās laboratorijās devusi precīzus un reproducējamus rezultātus[2]. Ādas diskus ievieto 0,3 mg/ml MTT šķīdumā pie 20 — 28 °C uz 3 stundām. Tad izgulsnēto zilo formazāna produktu ekstraģē (šķīduma ekstrakcija) un formazāna koncentrāciju mēra, nosakot OB pie viļņu garuma starp 545 un 595 nm.

1.7.2.3. Papildinformācija

Izmantotais ādas modelis un precīzs iedarbības laiks un mazgāšanas procedūras utt. ļoti ietekmē šūnas dzīvotspējas rezultātus. Izvēloties metodoloģiju un kalibrējot prognozes modeli, ieteicams veikt virkni testu ar standartvielām, kuras izraudzītas no *ECAMV* apstiprināšanas pētījumā izmantotajām ķīmiskajām vielām[3]. Būtiski, lai ir norādīta izmantotā metode, ko var atkārtot dažādās laboratorijās — plašam ķīmisko vielu spektram un saskaņā ar starptautiskajiem standartiem. Metodei jāatbilst vismaz tiem zinātniskā derīguma kritērijiem, kas noteikti iepriekš[2], un šī derīguma izpētes rezultātiem jābūt publicētiem zinātniskā žurnālā, kura rakstus recenzē.

2. DATI

2.1. Rezultātu apstrāde

2.1.1. *urkas ādas TER* noteikšana

Testa materiāla pretestības lielumus (kΩ), pozitīvas un negatīvas kontroles, kā arī jebkuras standartvielas, tai skaitā atkārtoto eksperimentu datus, vidējos lielumus un iegūtās klasifikācijas, jānorāda tabulas veidā.

2.1.2. *Cilvēka ādas modeļa pārbaude*

Testa materiāla OB lielumus un testa materiālam, pozitīvai un negatīvai kontrolei un jebkurai standartvielai aprēķinātos procentuālos šūnas dzīvotspējas datus, tai skaitā atkārtoto eksperimentu datus, vidējās vērtības un iegūto klasifikāciju, jānorāda tabulas veidā.

2.2. Rezultātu izvērtējums un interpretācija

2.2.1. *urkas ādas TER* noteikšana

Ja vidējais *TER* lielums, kas iegūts testa vielai, ir lielāks nekā 5 kΩ, tad šī viela nav korodants. Ja *TER* lielums ir mazāks vai vienāds ar 5 kΩ un testa viela nav virsmas aktīva viela vai neitrāla organiska viela, tad tā ir korodants.

Virsmas aktīvām vielām vai organiskām vielām, kurām *TER* lielums ir mazāks vai vienāds ar 5 kΩ, var veikt krāsu caurlaidību pārbaudi. Ja vidējais krāsvielas saturs diskam ir lielāks vai vienāds ar 36 % HCl pozitīvas kontroles diska vidējo krāsvielas saturu, kas iegūts paralēlā eksperimentā, tad testa viela ir patiešām pozitīva un tāpēc ir korodants. Ja vidējais krāsvielas saturs diskam ir mazāks nekā 36 % HCl pozitīvu kontroles diskam vidējais krāsvielas saturs, kas iegūts paralēlā eksperimentā, tad testa viela ir kļūdaini pozitīva un tāpēc nav korodants.

2.2.2. *Cilvēka ādas modeļa pārbaude*

Negatīvās kontroles OB lielums atbilst 100 % šūnu dzīvotspējai; tādēļ katra testa paraugam iegūtos OB lielumus var izmantot, lai aprēķinātu procentuālo dzīvotspēju attiecībā pret negatīvo kontroli. Prognozes modeļa šūnu procentuālās dzīvotspējas robežlielumu, kas ļauj atšķirt korozīvus materiālus no tādiem testa materiāliem, kas nav korozīvi (vai atšķirt dažādas korodantu grupas), skaidri jānosaka pirms metodes apstiprināšanas un turpmākā apstiprināšanas pētījumā jāpierāda, ka šis robežlielums ir atbilstošs[2].

3. ZIŅOJUMI

Testa ziņojums

Testa ziņojumā jābūt vismaz šādām ziņām:

Testa viela:

— identifikācijas dati, fizikālā būtība un, ja nepieciešams, fizikāli ķīmiskās īpašības. Līdzīgu informāciju jānodrošina arī attiecībā uz standartvielām, ja tādas izmantotas.

Testa apstākļi:

— sīka informācija par pielietoto testa procedūru,

— jebkuru modifikāciju apraksts un pamatojums.

Rezultāti:

— testa materiālu, pozitīvās un negatīvās kontroles un jebkuras standartvielas pretestības lielumu (*TER* noteikšana) vai procentuālās šūnu dzīvotspējas lielumu (cilvēka ādas modeļa pārbaude) dati tabulas veidā, tai skaitā atkārtoto eksperimentu un vidējo lielumu dati,

— jebkuras citas novērotas iedarbības apraksts.

Rezultātu apspriešana.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

(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. lpp.

(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. lpp.

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

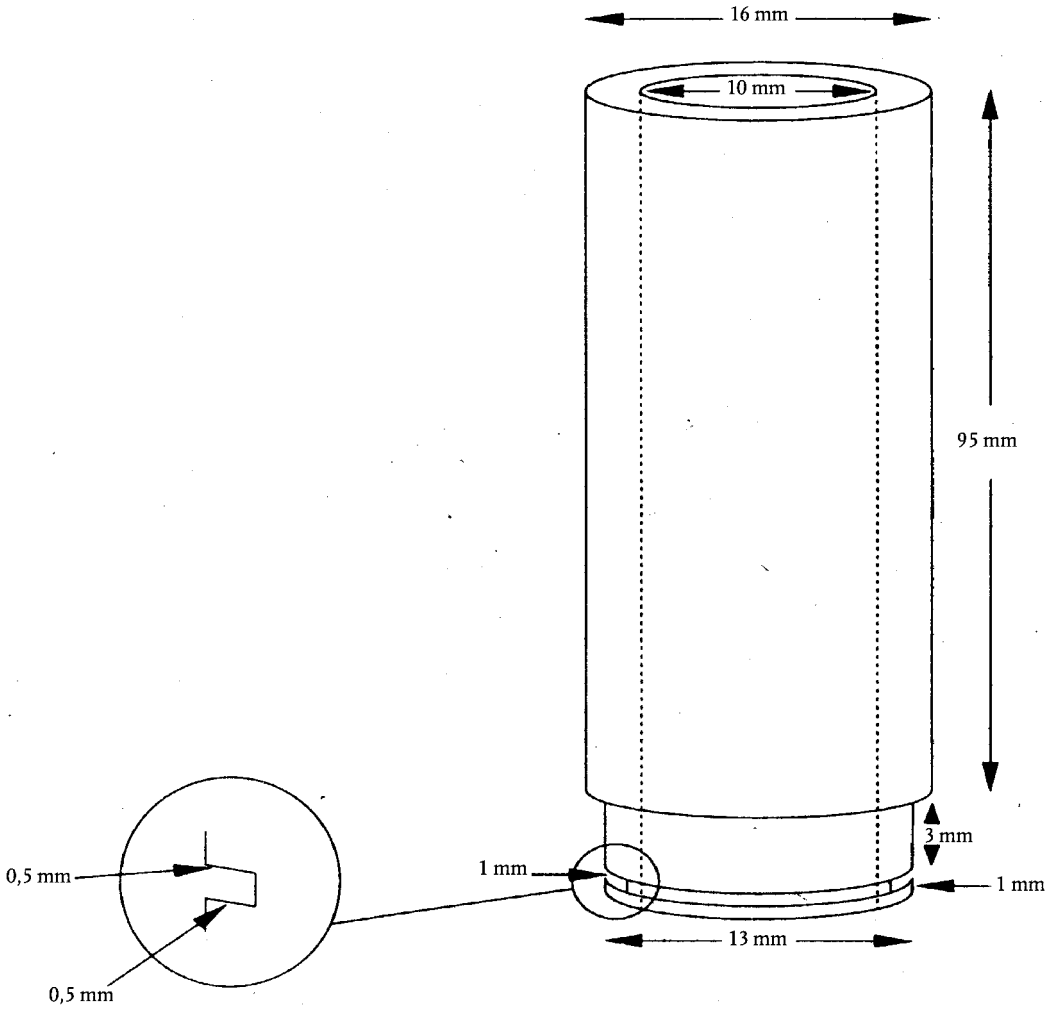
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in vitro* 6, 191-194. lpp.

(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. lpp.

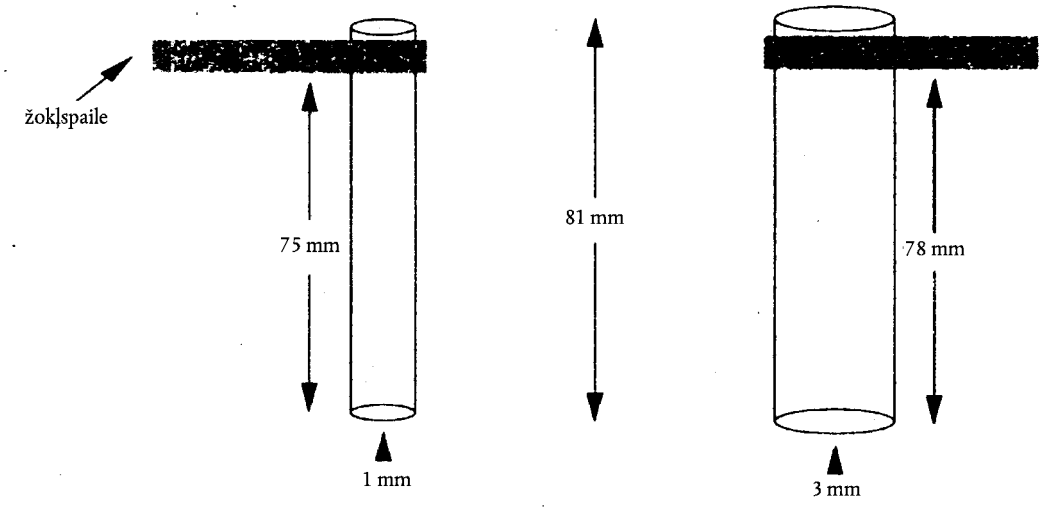
(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity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

1. zīmējums

PTFE caurulītes izmēri.

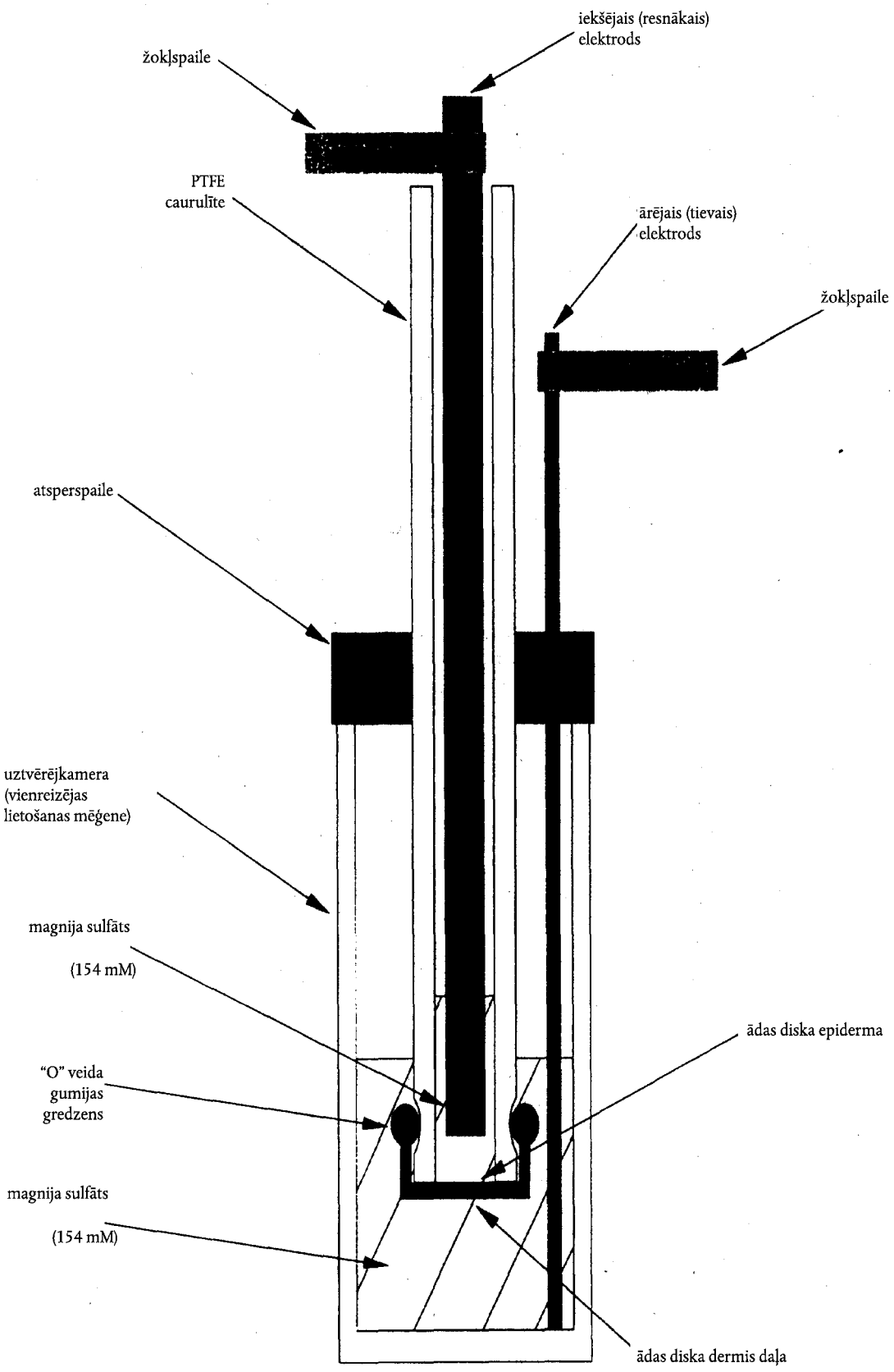


Elektrodu izmēri



2. zīmējums

Iekārta žurkas ādas TER noteikšanai



II PIELIKUMS

"B.41. FOTOTOKSICITĀTE — *IN VITRO* 3T3NRU FOTOTOKSICITĀTES TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Fototoksicitāti definē kā toksisku atbildes reakciju, kas izpaužas pēc atsevišķu vielu pirmās iedarbības uz ādu un tai sekojošās gaismas iedarbības vai ko izraisa līdzīgi — ar ādas apstarošanu pēc sistēmiskas apstrādes ar ķimikālijām.

Informācija, kas iegūta 3T3 NRU *in vitro* fototoksicitātes testā kalpo testa vielas fototoksicitātes potenciāla noteikšanai, t.i., pastāv vai nepastāv draudi, ko varētu izraisīt testa viela kopā ar pakļaušanu UV un redzamās gaismas iedarbībai.

Tā kā *in vitro* testa toksikoloģiskais galamērķis ir ķīmiskās vielas un gaismas kombinētās iedarbības izraisītā fototoksicitātes noteikšana, ar šo testu var noteikt savienojumus, kuri ir fototoksiski *in vivo* pēc sistēmiska pielietojuma un izplatīšanās uz ādas, kā arī savienojumus, kuri pēc lokāla pielietojuma uz ādas darbojas kā fotokairinātāji.

3T3NRU *in vitro* fototoksicitātes testu izstrādāja un apstiprināja apvienotā EU/COLIPA projektā, laikā no 1992. līdz 1997. gadam[1,2,3], lai radītu derīgu *in vitro* alternatīvu dažādajiem lietošanā esošajiem *in vivo* testiem. ESAO 1996. gada seminārā fototoksicitātes novērtēšanai ieteica sērijveida testēšanu *in vitro*[4].

3T3NRU *in vitro* fototoksicitātes testā iegūtos rezultātus salīdzināja ar akūta fototoksicitātes/fotokairinājuma iedarbību *in vivo* dzīvniekiem un cilvēkiem, un pierādīja, ka tests attiecībā uz šo iedarbību uzrāda lielisku prognozējamību. Tests nav paredzēts tam, lai prognozētu citus atgriezeniskus efektus, kurus var izraisīt kombinēta ķīmisko vielu un gaismas iedarbība, piem., fotogenotoksicitāti, fotoalerģiju un fotokancerogēnitāti, kaut arī daudzas ķīmiskās vielas, kuras uzrāda šīs specifiskās īpašības, dos pozitīvu reakciju 3T3NRU *in vitro* fototoksicitātes testā. Tests turklāt nav paredzēts fototoksiskās iedarbības stipruma novērtēšanai.

Secīga pieeja ķimikāliju fototoksicitātes testēšanai ir izklāstīta papildinājumā.

1.2. **Definīcijas**

Starojums: uz virsmu krītošā starojuma ultravioletās (UV) vai redzamās gaismas intensitāte, kas izteikta mērvienībās W/m^2 vai mW/cm^2.

Gaismas deva: uz virsmu krītošā ultravioletā (UV) vai redzamā starojuma daudzums (= intensitāte × laiks), kas izteikts džoulos (= W × laiks uz virsmas laukumu, piem., J/m^2 vai J/cm^2.

UV gaismas viļņu joslas: CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) ieteiktās joslas ir: UVA (315 — 400 nm), UVB (280 — 315 nm) un UVC (100 — 280 nm). Izmanto arī citas gaismas viļņu joslas: sadalījums starp UVB un UVA bieži vien ir pie 320 nm un UVA var iedalīt UV-A1 un UV-A2 ar sadalījumu pie apmēram 340 nm.

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti (piem., vitāli neitrāli sarkanā uzņemšanu šūnu lizosomās), kas atkarībā no mērījumu galamērķa un izmantotā testa plāna korelē ar kopējo šūnu skaitu un/vai šūnu vitalitāti.

Relatīvā šūnu dzīvotspēja: šūnu dzīvotspēja, kas izteikta attiecībā pret negatīviem (šķīdinātāja) kontrolmērījumiem, kuri izmantoti visā testa procedūrā (vai nu + UV, vai – UV), neapstrādājot ar testa ķimikāliju.

Prognozēšanas modelis: algoritms, kas izmantots, lai toksicitātes testa rezultātus pārveidotu toksiskā potenciāla prognozē. Testa vadošajās norādēs PIF un MPE var izmantot, lai 3T3NRU in vitro fototoksicitātes testa rezultātus transformētu fototoksicitātes prognozē.

PIF (fotokairinājuma faktors): faktors, kas iegūts, salīdzinot testu vielu divas vienādi efektīvas citotoksiskās koncentrācijas (EK_{50}), kuras iegūtas, apstarojot (+ UV) ar UVA/redzamo gaismu, kas nav citotoksiska, un bez apstarošanas (– UV).

MPE (vidējais fotoefekts): jauns mērījums, kas iegūts, matemātiski analizējot tādas pilnas divu koncentrāciju iedarbības līknes, kuras iegūtas, apstarojot (+ UV) ar UVA/redzamo gaismu, kas nav citotoksiska, un bez apstarošanas (– UV).

Fototoksicitāte: akūta toksiska reakcija, kura izpaužas pēc atsevišķu vielu pirmās iedarbības uz ādu un tai sekojošās gaismas iedarbības vai ko izraisa līdzīgi — pēc sistēmiskas apstrādes ar ķimikālijām, ādu apstarojot.

Fotokairinājums: termina "fototoksicitāte" paveids, ko lieto, lai aprakstītu tikai tās fototoksiskās reakcijas, kas parādās uz ādas pēc pakļaušanas ķīmisko vielu iedarbībai (lokālai vai orālai). Šīs fototoksiskās reakcijas vienmēr izraisa nespecifisku šūnu bojājumu (saules iedegumam līdzīgas reakcijas).

Fotoalerģija: pazīstama imunoloģiska reakcija, kas neparādās pie ķīmiskās vielas vai gaismas pirmās iedarbības uz ādu un kam, pirms parādās ādas reakcija, nepieciešams vienu vai divu nedēļu ilgs ievadperiods.

Fotogenotoksicitāte: genotoksiska reakcija, ko novēro kā ģenētisku pārejas punktu, kas izpaužas pēc šūnu pakļaušanas tādai UV/redzamās gaismas un negenotoksisku ķimikāliju devai, kas nav genotoksiska.

Fotokancerogēniskums: kancerogēniskums, ko izraisa atkārtota ķīmisko vielu un gaismas iedarbība. Terminu "foto ko-kanceroģenēze" lieto, ja UV izraisīto audzēju rašanos pastiprina ķīmiskās vielas iedarbība.

1.3. Standartvielas

Papildus pozitīvās kontroles ķīmiskajai vielai hlorpromazīnam, kuru paralēli jāpārbauda katrā novērtējumā, jaunizstrādātajam 3T3NRU fototoksicitātes testam ieteicams izmantot šā testa[1,2,13] starplaboratoriju izmēģinājumos lietoto vielu apakšgrupu kā standartvielas.

1.4. Sākotnēji apsvērumi

Literatūrā pazīstami daudzi ķimikāliju veidi, kas izraisa fototoksisku iedarbību[5,6,7,8]. Vienīgā kopējā iezīme ir to spēja absorbēt gaismas enerģiju saules gaismas spektra rajonā. Saskaņā ar fotoķīmijas pirmo likumu (Grothausa-Drapera likums) fotoreakcijai nepieciešama pietiekama gaismas kvantu absorbcija. Tādēļ, pirms bioloģiskās testēšanas, saskaņā ar šā testa norādījumiem jānosaka ķīmiskās vielas UV/redzamās gaismas absorbcijas spektrs (piem., saskaņā ar ESAO Testa norādījumiem 101). Ja molārās ekstinkcijas/absorbcijas koeficients ir mazāks nekā 10 litri × mol^{-1} × cm^{-1}, ķīmiskajai vielai nepiemīt fotoreaktīvais potenciāls un to nav jāpārbauda ar *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testu vai ar kādu citu bioloģisku testu, lai iegūtu atgriezenisku fotoķīmisku efektu (Papildinājums).

1.5. Testa metodes būtība

Noteikti četri darbības mehānismi, pēc kuriem (ķimikālijas) hromofora absorbētās gaismas rezultātā var novērot fototoksisku reakciju[7]. Visu šo mehānismu darbības rezultātā notiek šūnas bojājums. Tādēļ *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testa pamatā ir ķimikāliju citotoksicitātes salīdzināšana, testējot ar UVA/redzamās gaismas iedarbību un bez tās devā, kas nav citotoksiska. Citotoksicitāti šajā testā izsaka kā no koncentrācijas atkarīgu, vitāli neitrāli sarkanā (NR)[9] uzņemšanas samazināšanos 24 stundas pēc apstrādes ar testa ķimikāliju un apstarošanas.

Monoslāņa izveidošanai šūnas Balb/c 3T3 uzglabā barotnē 24 stundas. Katrai testa vielai sagatavo divas 96 iedobju plates un veic iepriekšēju vienu stundu ilgu inkubāciju ar astoņām dažādām ķimikālijas koncentrācijām. Pēc tam vienu no abām platēm pakļauj UVA/redzamās gaismas iedarbībai, kas nav citotoksiska, ar devu 5 J/cm^2 UVA (+ UV eksperiments), bet otru plati tajā laikā uzglabā tumsā (– UV eksperiments). Pēc tam abās platēs apstrādes vidi aizstāj ar šūnu kultūras barotni un pēc nākošās 24 stundu ilgas inkubācijas, izmantojot neitrāli sarkanā piesaisti (NRU), nosaka šūnu dzīvotspēju 3 stundām. Relatīvo šūnu dzīvotspēju, kas izteikta procentos no tukšajām, negatīvajām kontrolēm, aprēķina katrai no astoņām testa koncentrācijām. Lai prognozētu fototoksisko potenciālu, salīdzina koncentrācijas reakcijas, kas iegūtas gaismas starojuma klātbūtnē (+ UV) un bez tā (– UV), parasti pie EK_{50} līmeņa, t.i., koncentrācijās, kas pazemina šūnu dzīvotspēju līdz 50 % cf. attiecībā pret tukšo mēģinājumu.

1.6. Kvalitātes kritēriji

Šūnu UVA jutība, vēsturiski dati: šūnu jutība pret UVA ir regulāri jāpārbauda. Šūnas izsēj ar blīvumu, kāds izmantots *in vitro* 3T3 NRU fototoksicitātes testā, nākošā dienā apstaro ar UVA devās no 1 — 9 J/cm^2, un vienu dienu vēlāk, izmantojot NRU novērtējumu, nosaka šūnu dzīvotspēju. Šūnas atbilst kvalitātes kritērijiem, ja pēc apstarošanas ar 5 J/cm^2 UVA, to dzīvotspēja nav zemāka par 80 % no tumšās kontroles paraugu šūnu dzīvotspējas. Pie lielākās UVA devas 9 J/cm^2 šūnu dzīvotspēja nedrīkst būt zemāka par 50 % no tumšās kontroles. Šo pārbaudi jāatkārto apmēram katrai desmitajai šūnu pārnesei.

Negatīvās kontroles šūnu UVA jutība, kārtējais tests: tests atbilst kvalitātes kritērijiem, ja negatīvās kontroles (šūnas Ērla līdzsvarotā sāls šķīdumā (EBSS) ar 1 % dimetilsulfoksīdu (DMSO) vai bez tā, vai 1 % etanolu (EtOH)) + UVA eksperiments uzrāda dzīvotspēju, kas nav zemāka par 80 % no paralēlā, tumšā eksperimenta (– UVA) neapstarotu šūnu dzīvotspējas tajā pašā šķīdinātājā.

Negatīvās kontroles šūnu dzīvotspēja: absolūtais optiskais blīvums ($OB_{540\ NRU}$), ko mēra negatīvās kontroles NR ekstraktā, uzrāda vai 1×10^4 šūnas, kas izsētas vienā iedobē, divu novērtēšanas dienu laikā ir augušas ar normālu dalīšanas laiku. Tests atbilst pieņemamības kritērijiem, ja tukšā mēģinājuma vidējais $OB_{540\ NRU}$ ir ≥ 0,2.

Pozitīvā kontrole: zināmas fototoksiskas ķīmiskas vielas testē paralēli katra *in vitro* 3T3 NRU fototoksicitātes testam. Hlorpromazīns (HPZ) EU/COLIPA apstiprināšanas pētījumā ir lietots kā pozitīva kontrole un tāpēc ir ieteicams. HPZ, kas testēts, izmantojot standarta protokolu *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testā, noteikti šādi pieņemamības kritēriji: HPZ apstarots (+ UVA): EK_{50} = 0,1 līdz 2,0 μg/ml, neapstarots HPZ (– UVA): EK_{50} = 7,0 līdz 90,0 μg/ml. Fotokairinājuma faktoram (PIF), t.i., EK_{50} nobīdei jābūt vismaz 6.

Pārējās zināmās fototoksiskās ķimikālijas, kas atbilst ķīmisko vielu grupai vai vērtējamo testa ķimikāliju šķīdības rādītājiem, var izmantot kā paralēlās pozitīvās kontroles HPZ vietā. Šajā gadījumā, pamatojoties uz vēsturiskiem datiem, kā testa pieņemamības kritēriji atbilstīgi jānosaka EK_{50} lielumu diapazoni un PIF un MPE (vidējais fotoefekts).

1.7. **Testa metodes apraksts**

1.7.1. *Sagatavošana*

1.7.1.1. Šūnas

Apstiprināšanas pētījumā izmantota permanentā peļu fibroblastu šūnu līnija — Balb/c 3T3, klons 31 — no ATCC vai ECACC un tādēļ ir ieteicama. Ja barotnes apstākļi ir piemēroti specifiskām šūnu vajadzībām, tad ar to pašu testa ziņojumu sekmīgi var izmantot arī citas šūnas vai šūnu līnijas, bet jāparāda, ka tās ir līdzvērtīgas.

Regulāri jāpārbauda, vai šūnu mikoplazma nav kontaminēta, un tā lietojama tikai tad, ja šādu pārbaužu rezultāti ir apmierinoši.

Tā kā, pieaugot pārnešu skaitam, šūnu UVA jutība var paaugstināties, jāizmanto Balb/c 3T3 šūnas no mazākā pieejamā pārnešu skaita, vēlams mazāk nekā 100. Svarīgi, lai veiktu regulāras Balb/c 3T3 šūnu UVA jutības pārbaudes saskaņā ar šajos norādījumos aprakstītajām kvalitātes kontroles procedūrām.

1.7.1.2. Vides un barotnes apstākļi

Parastās šūnu pārnesēs un testa procedūrā jāizmanto atbilstoša barotne un inkubācijas apstākļi. Šūnām Balb/c 3T3 tie ir DMEM, kas papildināti ar 10 % jaundzimušu teļu serumu, 4 mM glutamīna, penicilīnu un streptomicīnu; un mitrinātu inkubāciju pie 37 °C/7,5 % CO_2 . Īpaši svarīgi, lai šūnu barotnes apstākļi nodrošinātu šūnas ciklu izmantoto šūnu vai šūnu līnijas vēsturiski normālā diapazona robežās.

1.7.1.3. Barotnes sagatavošana

Šūnas no saldētām, pieejamām kultūrām izsēj barotnē ar atbilstošu blīvumu un vismaz vienu reizi pārsēj, pirms izmantošanas 3T3NRU fototoksicitātes testā.

Fototoksicitātes testam šūnas barotnē izsēj ar tādu blīvumu, lai kultūras nesaplūst līdz testa beigām, t.i., ja šūnu dzīvotspēja pēc šūnu izsēšanas ir noteikta 48 stundas. Šūnām Balb/c 3T3, kas izaudzētas 96 iedobju platēs, ieteicamais šūnu blīvums ir 1×10^4 šūna iedobē.

Katrai testa ķimikālijai šūnas izsēj vienādi divās atsevišķās 96 iedobju platēs, ar ko pēc tam paralēli pie vienādiem apstākļiem veic visu testu, izņemot laiku, kad vienu no platēm apstaro (+ UVA/redzamā gaisma), bet otru iztur tumsā (– UVA/redzamā gaisma).

1.7.1.4. Metaboliskā aktivācija

Tā kā metabolizējošās sistēmas izmantošana ir vispārēja prasība visiem *in vitro* testiem genotoksicitātes un kancerogēniskuma potenciāla prognozēšanai, tad līdz šim fototoksikoloģijas gadījumā nav pazīstama neviena ķīmiska viela, kurai nepieciešama metaboliska transformācija, lai viela darbotos kā fototoksīns *in vivo* vai *in vitro*. Tādēļ uzskata, ka nav nepieciešamības un zinātniska pamatojuma, lai veiktu doto testu ar metaboliskas aktivācijas sistēmu.

1.7.1.5. Testa ķimikālijas/sagatavošana

Testa ķimikālijām jābūt svaigi sagatavotām tieši pirms lietošanas, ja vien dati par to stabilitāti nenorāda, ka tās var uzglabāt. Ja sagaidāms, ka var notikt strauja fotosabrukšana, tad var būt nepieciešams gatavot preparātus sarkanā gaismā.

Testa vielas jāizšķīdina sāls buferšķīdumā, piem., Ērla līdzsvarotā sāls šķīdumā (EBSS) vai fosfāta buferšķīdumā (FBS), kurā, lai novērstu interferenci apstarošanas laikā, nedrīkst būt olbaltumvielu sastāvdaļas un gaismu absorbējošas pH indikatora krāsas.

Testa ķimikālijas ar ierobežotu šķīdību ūdenī jāizšķīdina atbilstošos šķīdinātājos, koncentrācijā, kas ir simtkārtīga attiecībā pret vajadzīgo gala koncentrāciju, un tad to atšķaida 1:100 ar sāls buferšķīdumu. Ja izmanto šķīdinātāju, tam jābūt ar konstantu tilpumu 1 % (v/v) visās barotnēs, t.i., kā negatīvās kontrolēs, tā arī testa ķimikālijas visu koncentrāciju šķīdumos.

Ieteicamie šķīdinātāji ir dimetilsulfoksīds (DMSO) un etanols (EtOH). Var būt piemēroti arī citi šķīdinātāji ar zemu citotoksicitāti (piem., acetons), bet rūpīgi jāizvērtē to specifiskās īpašības, piem., reakcija ar testa ķimikālijām, fototoksiskā efekta nomākšana, radikāļu piesaistes īpašības.

Ja nepieciešams, šķīdības panākšanai var izmantot virpuļmiksēšanu un/vai apstrādi ar ultraskaņu, un/vai sildīšanu līdz 37 °C temperatūrai.

1.7.1.6. UV apstarošana/sagatavošana

Gaismas avots: fototoksicitātes testā visbūtiskākais faktors ir atbilstīga gaismas avota un filtrēšanas izvēle. UVA un spektra redzamie rajoni parasti saistīti ar fotosensitivizāciju[7,10], bet UVB rajons no 313 līdz 280 nm ir mazāk nozīmīgs un ir izteikti citotoksisks, paaugstinot tā citotoksiskumu par 1 000 kārtām[11]. Kritērijiem atbilstošā gaismas avota izvēlei jāietver būtiska prasība, lai gaismas avots emitē viļņu garumu, ko testa viela absorbē, un lai gaismas deva (sasniedzama piemērotā laikā) būtu pietiekama zināmu fotosensitivizējošu vielu noteikšanai. Turklāt izmantotais viļņu garums un devas nedrīkst būt pārāk postošas testa sistēmai, kura ietver siltuma emisiju (infrasarkanais spektra rajons).

Saules gaismas imitāciju ar saules aizstājējiem uzskata par optimālu gaismas avotu. Kā saules aizstājējus var izmantot gan ksenona lokus gan ierosinātu dzīvsudraba-metāla halogenoīdu lokus. Pēdējam no minētajiem ir priekšrocība, jo tas izstaro mazāk siltuma un ir lētāks, bet atbilstība saules gaismai nav nevainojama. Tā kā visi saules aizstājēji izstaro ievērojamus UVB daudzumus, tiem jālieto piemēroti filtri, lai vājinātu ļoti citotoksisko UVB viļņu garuma starojumu.

In vitro 3T3 NRU fototoksicitātes testam jāizmanto starojuma spektrs, kurā praktiski nav UVB (UVA: UVB ˜ 1: 20). Spektrālā starojuma sadalījuma piemērs filtrētam saules aizstājējam, kas izmantots apstiprināšanas pētījumā *in vitro* 3T3 NRU fototoksicitātes testā ir publicēts[3].

Dozimetrija: pirms katra fototoksicitātes testa regulāri jāpārbauda gaismas (starojuma) intensitāte, izmantojot piemērotu platjoslas UV-mērītāju. UV-mērītājam jābūt kalibrētam attiecībā pret avotu. Jāpārbauda UV-mērītāja darbība, un šādam nolūkam ieteicams izmantot otru, tāda paša veida un identiski kalibrētu standarta UV-mērītāju. Ideālā gadījumā pie lielākiem intervāliem jāizmanto spektroradiometrs, lai mērītu filtrētās gaismas avota spektrālo starojumu un pārbaudītu platjoslas UV-mērītāja kalibrāciju, bet šādiem instrumentiem nepieciešama atbilstoši apmācītu personu prasmīga rīcība.

Apstiprināšanas pētījumā tika noteikta tāda 5 J/cm^2 (UVA) deva, lai tā nebūtu citotoksiska Balb/c 3T3 šūnām un būtu pietiekami spēcīga pat vāju fototoksisku ķimikāliju ierosināšanai. Lai sasniegtu 5 J/cm^2 50 minūšu laikā, starojums jānoregulē uz 1,666 mW/cm^2. Ja izmanto citu šūnu līniju vai atšķirīgu gaismas avotu, tad UVA devu var nedaudz pielāgot, izmantojot kritērijus, kas nosaka, ka devai jābūt nekaitīgai attiecībā uz šūnām un pietiekamai standarta fototoksīnu noteikšanai. Gaismas iedarbības laiku aprēķina šādi:

$$t\,(\text{min}) = \frac{\text{Starojuma deva (J/cm}^2) \times 1000}{\text{Starojums (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W s})$$

1.7.2. *Testa apstākļi*

Tā kā visas fototoksiskās vielas noteiktas zemākās koncentrācijās, tad maksimālā testa ķimikālijas koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 μg/ml, turpretim augstākās koncentrācijās kļūdainu pozitīvu vērtējumu (prognozes pārvērtēšana) iespējamība pieaug[13]. Testa ķimikālijām augstākās koncentrācijās jābūt apmierinošam pH (pH diapazons: 6,5 — 7,8).

Ar gaismu (+ UVA) un bez (– UVA) gaismas testējamām ķimikālijām koncentrācijas robežas jānosaka atbilstošos diapazona noteikšanas priekšmēģinājumos. Diapazonu un koncentrāciju virknei atbilstošo līknes nogriezni pielāgo tā, lai koncentrācijas-reakcijas līknes pietiekami pamatotu ar eksperimentāliem datiem. Jāizmanto koncentrāciju ģeometriska virkne (ar konstantu atšķaidījuma faktoru).

1.7.3. *Testa procedūra ([1]).*

1.7.3.1. Pirmā diena

Sagatavo šūnu suspensiju 1×10^5 šūnas/ml barotnē un 96 iedobju audu kultūras mikrotitrēšanas platē (= tukša) iepilda pa 100 µl barotnes tikai tālākajās iedobēs. Atlikušajās iedobēs, iepilda 100 µl šūnu suspensiju 1×10^5 šūnas/ml (= 1×10^4 šūnas iedobē). Katrai testa vielai sagatavo divas plates: vienu citotoksicitātes noteikšanai (– UVA) un otru fototoksicitātes noteikšanai (+ UVA).

Inkubē šūnas 24 stundas (7,5 % CO_2, 37 °C) līdz brīdim, kamēr tās veido daļēji saplūdušu šūnu monoslāni. Šajā inkubācijas laikā notiek šūnu atjaunošanās, adhēzija un eksponenciāla augšana.

1.7.3.2. Otrā diena

Pēc inkubācijas, barotni no šūnām dekantē un divas reizes mazgā ar *EBSS/PBS*, 150 µl uz iedobi. Pievieno 100 µl no *EBSS/PBS*, kas satur atbilstošas koncentrācijas testa ķimikālijas vai tikai šķīdinātāju (negatīva kontrole). Pielieto 8 dažādas testa vielu koncentrācijas. Šūnas inkubē ar testa vielu tumsā 60 minūtes (7,5 % CO_2, 37 °C).

Lai veiktu novērtēšanas (+ UVA) daļu, šūnas 50 minūtes istabas temperatūrā apstaro caur 96 iedobju plates pārsegu ar 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2. Vēdina ar ventilatoru, lai aizkavētu H_2O kondensāciju zem pārsega. Dublikātplates (– UVA) uzglabā istabas temperatūrā tumšā kastē 50 minūtes (= UVA iedarbības ilgums).

Testa šķīdumu dekantē un divas reizes mazgā ar 150 µl EBSS/PBS. Aizstāj EBSS/PBS ar barotni un inkubē (7,5 % CO_2, 37 °C) visu nakti (18 — 22 stundas).

1.7.3.3. Trešā diena

Mikroskopiskā novērtēšana

Pārbauda šūnas ar fāzu kontrastējošo mikroskopu. Reģistrē testa ķimikālijas citotoksiskā efekta rezultātā radušās šūnu morfoloģijas izmaiņas. Šo pārbaudi iesaka, lai nepieļautu eksperimentālas kļūdas, bet citotoksicitātes un fototoksicitātes novērtēšanai šos pierakstus neizmanto.

Neitrāli sarkanā uzņemšanas tests

Mazgā šūnas ar 150 µl iepriekš uzsildīta EBSS/PBS. Nolej mazgāšanas šķīdumu, uzmanīgi notecinot. Pievieno 100 µl NR barotni un inkubē 3 stundas 37 °C temperatūrā, mitrinātā atmosfērā pie 7,5 % CO_2 .

Pēc inkubācijas noņem NR barotni un mazgā šūnas ar 150 µl EBSS/PBS. Dekantē un pilnībā nosusina EBSS/PBS. (Pēc izvēles: centrifugē izmainīto plati.)

Pievieno precīzi 150 µl NR desorbēta šķīduma (svaigi pagatavots etanols/etiķskābe)

Mikrotitrēšanas plati uz mikrotitrēšanas plates kratītāja strauji krata 10 minūtes, kamēr NR no šūnām ir ekstrahēts un izveidojies homogēns šķīdums.

Spektrofotometrā mēra NR ekstrakta optisko blīvumu pie 540 nm, izmantojot tukšās kivetes kā standartu. Turpmākām analīzēm datus saglabā atbilstošā faila formātā (piem., ASCII).

2. **DATI**

2.1. **Datu daudzums un kvalitāte**

Datiem jābūt tādiem, kas ļauj veikt izsmeļošu analīzi koncentrācijas-reakcijas sakarībai, kas iegūta ar UVA/redzamās gaismas starojumu un bez tā. Ja ir konstatēts citotoksicitāte, tad gan koncentrācijas robežas, gan līknei atbilstošais nogrieznis uz koordinātu ass starp atsevišķām koncentrācijām jāuzdod tādā veidā, lai ļautu līkni piemērot eksperimentāliem datiem. Ņemot vērā, ka testa ķimikālija var nebūt citotoksiska līdz noteiktai robežkoncentrācijai pie 100 µg/ml tumšajā eksperimentā (– UVA), bet būt ar ļoti augstu citotoksicitāti, ja to apstaro (+ UVA), tad, lai izpildītu atbilstošās datu kvalitātes prasības, var būt nepieciešams, lai pārbaudāmo koncentrāciju diapazoni abās eksperimenta daļās atšķiras par vairākām kārtām. Ja citotoksiskums nav konstatēts abās eksperimenta daļās (– UVA un + UVA), tad testēšana, kur līknei atbilstošais nogrieznis starp atsevišķām devām ir liels līdz pat augstākajai koncentrācijai, ir pietiekama.

Viennozīmīgi pozitīva rezultāta gadījumā nav prasīts veikt pārbaudi, izpildot atkārtotu eksperimentu. Pie tam viennozīmīgi negatīvus rezultātus nevajag pārbaudīt, ja testa viela pārbaudīta pietiekami augstās koncentrācijās. Šādos gadījumos ir pietiekams viens galvenais eksperiments, kuru apstiprina viens vai vairāki priekšmēģinājumi diapazona noteikšanai.

Testus ar neviennozīmīgiem rezultātiem, kuri ir tuvu prognozes modeļa galējai robežai, jāatkārto, lai pārbaudītu.

Ja uzskata, ka nepieciešama atkārtota testēšana, tad, lai iegūtu viennozīmīgu rezultātu, eksperimenta apstākļu izmaiņas var būt svarīgas. Galvenais mainīgais šajā testā ir testa vielas šķīdumu sagatavošana. Tādēļ šo apstākļu izmaiņa (līdzšķīdinātājs, sasmalcināšana, apstrāde ar ultraskaņu) var būt vissvarīgākais testa atkārtošanā. Alternatīva ir apsvērt pirms apstarošanas inkubācijas laika izmaiņas. Ūdenī nestabilām ķīmiskām vielām var būt svarīgi izmantot īsāku laiku.

2.2. **Rezultātu apstrāde**

Ja iespējams, nosaka testa vielas koncentrāciju, kas atbilst šūnu NRU (EK_{50}) 50 % kavēšanai. To var izdarīt, pielietojot koncentrācijas-atbildes reakcijas datiem jebkuru atbilstošu nelineāras regresijas procedūru (vēlams Hilla funkciju vai loģisko regresiju) vai izmantojot citas piemērotas procedūras[14]. Pirms EK_{50} izmantošanas turpmākajiem aprēķiniem, atbilstoši jāpārbauda piemērotības kvalitāte. Kā alternatīvu, lai aprēķinātu EK_{50}, var izmantot grafiskās savietošanas metodes. Šajā gadījumā ieteicams lietot puslogaritmisko papīru (x-skala: log, y skala: probiti), kā daudzos gadījumos, pēc šīs transformācijas koncentrācijas atbildes reakcijas funkcija kļūs gandrīz lineāra.

2.3. **Rezultātu izvērtēšana (prognozes modeļi)**

2.3.1. *Prognozes modelis 1. variants: foto kairinājuma faktors (PIF):*

Ja pilnā koncentrācijas reakcijas līknes iegūtas gan gaismas klātbūtnē (+ UVA), gan bez tās (– UVA), foto kairinājuma faktoru (PIF) aprēķina, izmantojot sekojošu formulu:

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

Ja PIF < 5, tad paredzams, ka fototoksiska potenciāla nebūs, bet, ja PIF ≥ 5, paredzams fototoksiskais potenciāls.

Ja viela ir citotoksiska tikai pie + UVA un nav citotoksiska, testējot – UVA, PIF nevar aprēķināt, kaut arī šis ir rezultāts, kas norāda uz fototoksisko potenciālu. Šādos gadījumos a "> PIF" var aprēķināt, ja veikts (– UV) citotoksicitātes tests līdz pat augstākajai testa koncentrācijai (C_{max}) un šo lielumu izmanto "> PIF" aprēķināšanai;

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

Ja vien a "> PIF" var iegūt, tad jebkurš lielums, kas > 1, prognozē fototoksisko potenciālu.

Ja nevar aprēķināt nedz EK_{50}(– UV), nedz EK_{50}(+ UV) tādēļ, ka viela neuzrāda nekādu citotoksicitāti līdz pat testa vielas augstākajai koncentrācijai, tas norāda, ka fototoksiskā potenciāla nav. Šādos gadījumos rezultāta raksturojumam izmanto formālu "PIF = *1";

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

Ja var iegūt tikai "PIF = *1", tas neprognozē fototoksisku potenciālu.

Prognozējot fototoksisko potenciālu, b) un c) gadījumā uzmanīgi jāņem vērā koncentrācijas, kas sasniegtas 3T3NRU fototoksicitātes testā.

2.3.2. *Prognozes modelis, 2. variants: vidējais fotoefekts (MPE)*

Kā alternatīvu fototoksiskā potenciāla prognozēšanai var izmantot jaunu modeļa versiju, kura izstrādāta, izmantojot EU/COLIPA apstiprināšanas pētījuma datus[15] un pārbaudīta ar "aklā" eksperimenta apstākļiem turpmākā pētījumā uz *in vitro* fototoksicitāti UV filtra ķimikālijām[13]. Modelis pārvar PIF modeļa ierobežojumus gadījumos, kad EK_{50} nevar iegūt. Modelis izmanto "vidējo fotoefektu" (MPE) — mērījumu, kura pamatā ir pilnas koncentrācijas reakcijas līkņu salīdzinājums. MPE modeļa pielietošanai Humbolta universitātē (Berlīnē) tika izstrādāts īpaša datorprogramma, kas ir pieejama bez maksas.

2.4. **Rezultātu interpretācija**

Pozitīvs rezultāts *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testā (PIF ≥ 5 vai MPE ≥ 0,1) norāda, ka testa vielai ir fototoksisks potenciāls. Ja šis rezultāts iegūts pie koncentrācijām zem 10 μg/ml, testa ķimikālija iespējams arī reaģēs kā fototoksīns arī dažādos iedarbības apstākļos *in vivo*. Ja pozitīvs rezultāts iegūts tikai pie augstākajām testa koncentrācijām 100 μg/ml, nepieciešami turpmāki apsvērumi fototoksicitātes draudu novērtēšanai. Tie var ietvert datus par caurlaidību, absorbciju un iespējamo ķimikālijas akumulāciju ādā, vai ķimikālijas testēšanu apstiprinošā alternatīvā testā, piem., izmantojot cilvēka *in vitro* ādas modeli.

Negatīvs *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testa rezultāts (PIF < 5 vai MPE < 0,1) norāda, ka testa viela attiecībā uz zīdītāju šūnu kultūrām pielietotajos apstākļos nav bijusi fototoksiska. Gadījumos, kad ķimikāliju var testēt līdz pat augstākajai koncentrācijai 100 μg/ml, negatīvs rezultāts norāda, ka ķimikālijai nav fototoksiskā potenciāla, un mazticami, ka tai būs fototoksicitāte *in vivo*. Gadījumos, kad zemākās koncentrācijās iegūtas identiskas koncentrācijas-toksicitātes reakcijas (EK_{50} + UV un EK_{50} – UV), datu interpretācija būs tāda pati. Pretēji tam, ja fototoksicitāte neparādās (+ UV un – UV) un ja ūdens šķīdība ierobežo koncentrācijas līdz lielumiem, kas mazāki nekā 100 μg/ml, tad testa vielas saderību ar pārbaudi var apšaubīt un jāapsver apstiprinoša testēšana (piem., izmantojot *in vitro* ādas modeli vai *ex vivo* ādas modeli, vai *in vivo* testu).

3. **ZIŅOJUMI.**

Testa ziņojums

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

Testa ķimikālija:

— identifikācijas dati un CAS Nr., ja zināms,

— fizikālā daba un tīrība,

— fizikāli ķīmiskās īpašības, kas būtiskas pētījuma veikšanai,

— stabilitāte un fotostabilitāte, ja zināma.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība šķīdinātājā,

— procentuālais šķīdinātāja daudzums, kas ir apstrādes vidē (EBSS vai PBS).

Šūnas:

— šūnu veids un izcelsme,

— mikoplazmas trūkums,

— šūnu pārnešu skaits, ja zināms,

— šūnu UVA jutība, noteikta ar starojuma iekārtu, kas izmantota *in vitro* 3T3NRU fototoksicitātes testā.

Testa apstākļi a) — inkubācija pirms un pēc apstrādes:

— barotnes veids un sastāvs,

— inkubācijas apstākļi (CO_2 koncentrācija, temperatūra, mitrums),

— inkubācijas ilgums (priekšapstrāde, pēcapstrāde).

Testa apstākļi b) — apstrāde ar ķīmisko vielu:

— loģiskais pamatojums ar UV/redzamās gaismas apstarojumu un bez tā izmantoto testa vielas koncentrāciju izvēlei,

— ja testa vielai ir ierobežota šķīdība un nepiemīt citotoksicitāte, pārbauda augstākās koncentrācijas pamatojumu,

— apstrādes vides veids un sastāvs (sāls buferšķīdums),

— ķīmiskās apstrādes ilgums.

Testa apstākļi c) — starojums:

— izmantotā gaismas avota izvēles pamatojums,

— gaismas avota spektrālā starojuma raksturojums,

— izmantotā filtra (filtru) transmisijas/absorbcijas rādītāji,

— radiometra rādītāji un sīki kalibrācijas dati,

— attālums no gaisma avota līdz testa sistēmai,

— UVA starojums šajā attālumā, izteikts $mW/cm^{2,}$

— UV/redzamās gaismas iedarbības ilgums,

— UVA deva (starojums × laiks), izteikts J/cm^2,

— temperatūra, kas izmantota šūnu kultūrām apstarojuma laikā un šūnu kultūrām, kuras paralēli tika turētas tumsā.

Testa apstākļi d) — NRU tests:

— *NR* vides sastāvs,

— *NR* inkubācijas ilgums,

— inkubācijas apstākļi (CO_2 koncentrācija, temperatūra, mitrums),

— *NR* ekstrakcijas apstākļi (ekstrakcijas šķīdinātājs. ilgums),

— viļņu garums spektrofotometriskiem *NR* optiskā blīvuma nolasījumiem,

— otrais viļņu garums (standarta), ja izmantots,

— tukšā spektrofotometriskā mēģinājuma saturs, ja izmantots.

Rezultāti:

— šūnu dzīvotspēja, kas iegūta pie katras testa vielas koncentrācijas, izteikta procentos no kontrolšūnu vidējās dzīvotspējas,

— koncentrācijas-reakcijas līknes (testa ķimikālijas koncentrācija pret relatīvo šūnu dzīvotspēju), iegūta paralēlos + UVA un – UVA eksperimentos,

— koncentrācijas reakcijas līkņu datu analīze: ja iespējams, EK_{50} (+ UVA) un EK_{50} (– UVA) aprēķini/izskaitļojums,

— salīdzinājums divu koncentrāciju reakcijas līknēm, kas iegūtas ar UVA/redzamās gaismas apstarošanu un bez tās, vai nu aprēķinot fotokairinājuma faktoru (PIF), vai aprēķinot vidējo fotoefektu (MPE),

— fototoksiskā potenciāla klasifikācija,

— testa pieņemamības kritēriji a) — paralēla negatīvā kontrole:

  — apstarotu un neapstarotu šūnu absolūtā dzīvotspēja (NR ekstraktu optiskais blīvums),

  — negatīvās kontroles, vidējās un standarta novirzes vēsturiskie dati,

— testa pieņemamības kritēriji b) — paralēla pozitīvā kontrole:

  — pozitīvās kontroles vielu EK_{50} (+ UVA) un EK_{50} (– UVA) un PIF,

  — pozitīvās kontroles ķimikāliju vēsturiskie dati: EK_{50} (+ UVA) un EK_{50} (– UVA) un PIF, vidējās un standarta novirzes.

Rezultātu apspriešana.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

(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), EEK/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in vitro* 8, 793 — 796. lpp.

(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. lpp.

(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, 305 — 327. lpp.

(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. lpp.

(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, XI — XXXV. lpp.

(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, 314 — 348. lpp.

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

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

(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, 515 — 530. lpp.

(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, 1825 — 1829. lpp.

(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".

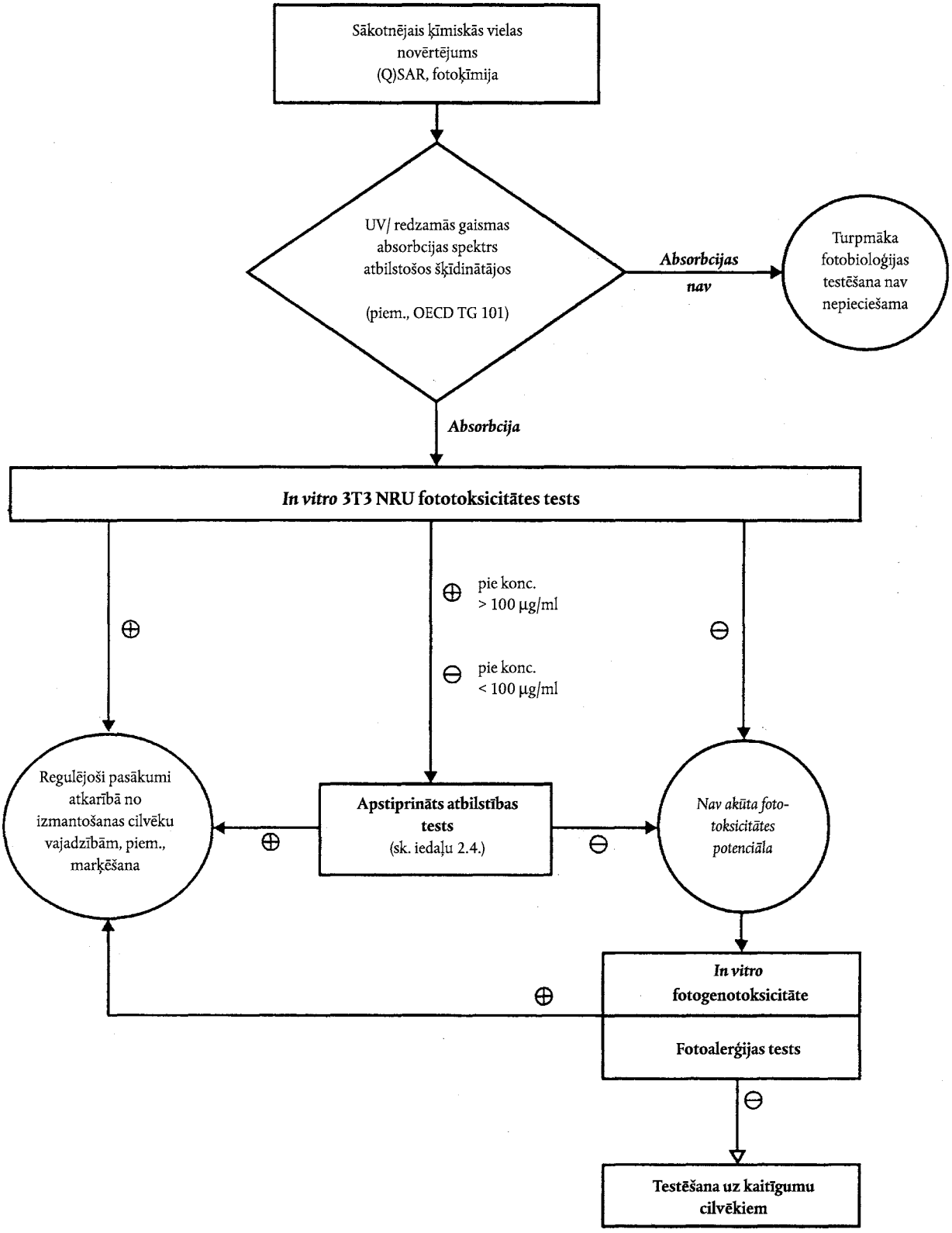
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEK in the 3T3 NRU *In vitro* Phototoxicity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

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

(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. lpp.

Papildinājums

3T3 NRU PT loma secīgā pieejā ķīmisko vielu fototoksicitātes testēšanā



(1) papildu informāciju skat. 12. atsaucē"