32000L0033

8.6.2000 DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH L 136/90

DYREKTYWA KOMISJI 2000/33/WE

z dnia 25 kwietnia 2000 r.

dostosowująca do postępu technicznego po raz dwudziesty siódmy dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych (*)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 67/548/EWG z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych (1), ostatnio zmienioną dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 1999/33/WE (2), w szczególności jej art. 28,

a także mając na uwadze, co następuje:

(1) Załącznik V do dyrektywy 67/548/EWG ustanawia metody określania właściwości fizyko-chemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów. Niezbędne jest dostosowanie tego Załącznika do postępu technicznego.

(2) Zgodnie z art. 7 ust. 2 dyrektywy Rady 86/609/EWG z dnia 24 listopada 1986 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych (3), doświadczenie pociągające za sobą wykorzystanie zwierząt nie powinno być przeprowadzane, jeżeli rozsądnie i praktycznie dostępna jest inna, zadowalająca pod względem naukowym metoda uzyskania poszukiwanych wyników.

(3) Komisja zamierza wprowadzić do załącznika V do dyrektywy 67/548/EWG pewne, alternatywne metody badań, nie wymagające wykorzystania zwierząt, w celu udostępnienia tych metod do badań substancji chemicznych zgodnie z art. 3 ust. 1 dyrektywy 67/548/EWG.

(4) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania do Postępu Technicznego dyrektyw w sprawie zniesienia barier technicznych w handlu niebezpiecznymi substancjami i preparatami,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Teksty w załącznikach I i II do niniejszej dyrektywy dodaje się do części B załącznika V do dyrektywy 67/548/EWG.

Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy przed dniem 1 października 2001 r. oraz niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Państwa Członkowskie określają sposób dokonywania takiego odniesienia.

2. Państwa Członkowskie przekażą Komisji teksty podstawowych przepisów prawa krajowego, przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą oraz tabelę korelacji między niniejszą dyrektywą a przyjętymi przepisami krajowymi.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie trzeciego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 25 kwietnia 2000 r.

W imieniu Komisji

Margot WALLSTRÖM

Członek Komisji

(*) Przyjęta przed dwudziestym szóstym dostosowaniem.

(1) Dz.U. 196 z 16.8.1967, str. 1.

(2) Dz.U. L 199 z 30.7.1999, str. 57.

(3) Dz.U. L 358 z 18.12.1986, str. 1.

ZAŁĄCZNIK I

„B.40. KOROZJA SKÓRY

1. **METODA**

1.1. **Wprowadzenie**

Dwa badania *in vitro* badania korozji skóry, oznaczenie przezskórnej oporności elektrycznej (TER) skóry szczura i badanie wykorzystujący model skóry ludzkiej są zatwierdzone jako naukowo uzasadnione przez Europejskie Centrum ds. atestacji metod alternatywnych (ECVAM, Wspólne Centrum Badawcze, Komisja Europejska) (1) (2) (3). Studium atestacyjne ECVAM wykazało, że przy pomocy obu badań można niezawodnie rozróżnić substancje powodujące i nie powodujące korozję skóry. Ponadto, protokół badania wykorzystującego model skóry ludzkiej umożliwiał prawidłowe rozróżnienie między siłą działania środków powodujących uszkodzenie (zwanych jako środki powodujące silną korozję skóry, R35, i inne środki powodujące korozję skóry, R34) (2). Podano opisy i procedury obu badań; wybór badania zależy od szczególnych wymagań i preferencji użytkownika.

Patrz też wprowadzenie ogólne, część B.

1.2. **Definicje**

Korozja skóry: powodowanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry wskutek działania badanego materiału.

1.3. **Substancje odniesienia**

Nieokreślone, ale patrz ppkt 1.5.3.4 i 1.7.2.3.

1.4. **Zasada metody badania — analiza TER skóry szczura**

Powierzchnię naskórka krążków skóry młodych, zabitych w sposób humanitarny szczurów poddaje się działaniu badanych materiałów przez okres do 24 godzin. Materiały powodujące korozję rozpoznaje się po ich zdolności do powodowania utraty normalnej integralności warstwy rogowej i funkcji ochronnej skóry, mierzonej jako spadek właściwego TER poniżej poziomu progowego (5 kΩ) (4) (5). Materiały drażniące i niedrażniące nie powodują obniżenia TER poniżej poziomu progowego. Do procedury badania czynników powierzchniowo czynnych i obojętnych materiałów organicznych (definicja, patrz (6)) można włączyć krok wiązania barwnika, ma to na celu zmniejszenie liczby fałszywych wyników pozytywnych, uzyskiwanych szczególnie dla tych typów substancji chemicznych (2) (7).

1.5. **Opis metody badania — analiza TER skóry szczura**

1.5.1. *Zwierzęta*

Do spreparowania krążków skóry potrzebne są młode (20–23-dniowe) szczury (szczepu Wistar lub porównywalnego). Starannie usunąć włosy z grzbietu i boków przy pomocy nożyczek do strzyżenia małych zwierząt. Następnie zwierzęta należy umyć, zanurzając i przecierając myty obszar w roztworze antybiotycznym (zawierającym, na przykład, streptomycynę, penicylinę, chloramfenikol i amfoterycynę w stężeniach skutecznie powstrzymujących rozwój bakterii). Mycie zwierząt należy powtórzyć trzeciego i czwartego dnia po pierwszym myciu, i użyć w ciągu 3 dni (do preparowania skóry zwierzęta nie mogą być starsze niż 31-dniowe).

1.5.2. *Preparowanie krążków skóry*

Zwierzęta należy zabić w humanitarny sposób. Następnie zdjąć skórę z grzbietu każdego zwierzęcia i usunąć nadmiar tłuszczu, starannie zeskrobując go ze skóry. Skórę umieszcza się na końcu rurki z politetrafluoroetylenu (PTFE) w taki sposób, by powierzchnia naskórka stykała się z rurką. Na koniec rurki należy nasunąć dopasowany gumowy pierścień typu »O« w celu przytrzymania skóry, a nadmiar tkanki odciąć. Wymiary rurki i pierścienia pokazano na rysunku 1. Połączenie pierścienia z końcem rurki PTFE należy dokładnie uszczelnić wazeliną. Rurka przytrzymywana jest przy pomocy zacisku sprężynowego wewnątrz komory receptorowej zawierającej roztwór siarczanu magnezu (154 mM) (rysunek 2).

1.5.3. *Procedura badania*

1.5.3.1. Przygotowanie badanego materiału

Badane substancje w płynie (150 µl) podaje się na powierzchnię naskórka od wewnątrz rurki (rysunek 2). W przypadku gdy badany materiał jest ciałem stałym, należy rozprowadzić ją po całej powierzchni naskórka. Następnie zalać wodą dejonizowaną (150 µl) i lekko poruszać rurką. Badane substancje powinny stykać się naskórkiem na możliwie największej powierzchni. W przypadku niektórych substancji można to uzyskać przez podgrzanie do 30 °C w celu rozpuszczenia badanej substancji lub zmielenie w celu rozdrobnienia lub sproszkowania materiału.

Każdą substancję należy badać na trzech krążkach skóry. Krążki skóry poddaje się działaniu badanych substancji przez 24 godziny (patrz także ppkt 1.5.3.4). Następnie badaną substancję należy usunąć spłukując ją strumieniem zwykłej wody o temperaturze nie przekraczającej 30 °C, aż do chwili, gdy więcej materiału nie daje się już usunąć. Badane substancje, które wytrąciły się na powierzchni rurki, można usunąć spłukując je strumieniem ciepłej wody o temperaturze około 30 °C.

1.5.3.2. Pomiary TER

Do pomiaru TER używa się niskonapięciowego mostka prądu przemiennego (np. AIM 401 lub 6401 lub równoważny). Przed pomiarem oporności należy zmniejszyć napięcie powierzchniowe skóry przez dodanie 70 % alkoholu etylowego w wystarczającej ilości, tak by pokryć cały naskórek. Po kilku sekundach alkohol należy usunąć, odwracając rurkę, i następnie nawodnić tkankę przez dodanie 3 ml roztworu siarczanu magnezu (154 mM). Elektrody pomiarowe mostka należy przyłożyć po obu stronach krążka skóry w celu zmierzenia oporności krążka w kΩ/krążek skóry (rysunek 2). Wymiary elektrod i długość, na jaką elektroda ma wystawać poza zacisk szczękowy wskazano na rysunku 1. W czasie pomiaru oporności zacisk elektrody wewnętrznej (grubej) spoczywa się na górnej krawędzi rurki PTFE, zapewnia to jednakową głębokość zanurzenia elektrody w roztworze siarczanu magnezu. Elektroda zewnętrzna (cienka) umieszczona jest w komorze receptorowej, tak by opierała się o dno komory. Należy utrzymać jednakową odległość między spodem zacisku sprężynowego a spodem rurki PTFE (rysunek 1), ponieważ ma ona wpływ na mierzoną wartość oporności.

Należy zauważyć, że jeżeli zmierzona oporność jest większa niż 20 kΩ, przyczyną mogą być pozostałości badanej substancji zakrywające powierzchnię naskórka krążka skóry. Można spróbować usunąć te pozostałości zatykając rurkę od góry palcem w rękawiczce ochronnej i potrząsając przez około 10 sekund; roztwór siarczanu magnezu należy wylać i do wykonania pomiaru wlać do rurki nowy roztwór siarczanu magnezu.

Wartości średnie TER akceptuje się pod warunkiem że równolegle zmierzone wartości kontroli pozytywnej i negatywnej mieszczą się w zakresie dozwolonym dla metody. Sugerowane substancje kontrolne i dopuszczalne zakresy rezystancji dla opisanej tu metody i aparatury pomiarowej są następujące:

Kontrola	Substancja	Zakres rezystancji (kΩ)
Pozytywna	10 M kwas solny (36 %)	0,5-1,0
Negatywna	Woda destylowana	10-25

1.5.3.3. Zmodyfikowana procedura dotycząca substancji powierzchniowo czynnych i obojętnych substancji organicznych

Jeżeli zmierzone wartości TER dla badanych substancji powierzchniowo czynnych i obojętnych substancji organicznych są mniejsze lub równe 5 kΩ, można dla tych tkanek wykonać ocenę głębokości penetracji barwnika. Procedura ta pozwoli określić, czy wyniki są fałszywie pozytywne (2).

1.5.3.3.1. Zastosowanie i usunięcie barwnika sulfurodaminy B

Powierzchnię naskórka każdego krążka skóry poddaje się najpierw działaniu substancji badanej, a następnie przez 2 godziny 150 µl 10 % (wag./obj.) roztworu sulfurodaminy B w wodzie destylowanej. Następnie należy usunąć nadmiar/niezwiązany barwnik opłukując krążki skóry przez około 10 sekund strumieniem zwykłej wody o temperaturze pokojowej. Każdy krążek należy uważnie zdjąć z rurki PTFE i umieścić w zlewce (np. 20 ml zlewka szklana do pomiaru scyntylacji) z wodą dejonizowaną (8 ml). Zlewki należy lekko poruszać przez 5 minut w celu usunięcia dalszego nadmiaru/niezwiązanego barwnika. Tę procedurę płukania należy powtórzyć, następnie wyjąć krążki i umieścić w zlewkach zawierających 5 ml 30 % (wag./obj.) roztworu siarczanu dodecylosodowego (SDS) w wodzie destylowanej i inkubować przez noc w 60 °C. Po inkubacji krążki należy wyjąć i wyrzucić, a pozostały roztwór odwirować przez 8 minut w 21 °C (względna siła odśrodkowa p 175). 1 ml próbkę odwirowanej cieczy należy rozcieńczyć 1 do 5 (obj./obj.) (tj. 1 ml + 4 ml) w 30 % (wag./obj.) roztworze SDS w wodzie destylowanej. Zmierzyć gęstość optyczną (OD) roztworu dla około 565 nm.

1.5.3.3.2. Obliczenie zawartości barwnika

Zawartość sulfurodaminy B oblicza się na podstawie wartości OD (współczynnik ekstynkcji molowej sulfurodaminy B dla 565 nm = $8,7 \times 10^4$; ciężar cząsteczkowy = 580). Po określeniu zawartości sulfurodaminy B dla każdego krążka skóry należy obliczyć wartość średnią. Tak obliczona wartość średnia jest akceptowana pod warunkiem że równolegle określone wartości kontrolne znajdują się w dopuszczalnych granicach dla metody. Sugerowane substancje kontrolne i dopuszczalne zakresy zawartości barwnika dla opisanej tu metody i aparatury pomiarowej są następujące:

Kontrola	Substancja	Zakres zawartości barwnika (μg/krążek)
Pozytywna	10 M kwas solny (36 %)	40-100
Negatywna	Woda destylowana	15-35

1.5.3.4. Dodatkowe informacje

Czas działania substancji badanych na krążki skóry można skrócić (np. do 2 godzin) w celu rozpoznania silnie korozyjnych materiałów. Jednakże studium atestacyjne wykazało, że metoda TER wykazywała zbyt wysoki potencjał korozyjności kilku badanych substancji chemicznych po 2 godzinach oddziaływania na krążki skóry (2), mimo że po 24-godzinnym oddziaływaniu rozróżnienie substancji powodujących korozję i nie powodujących korozji było prawidłowe.

Właściwości i wymiary aparatu do badań i procedury doświadczalnej mogą wpływać na uzyskane wartości TER. Próg korozyjności 5 kΩ określono na podstawie danych uzyskanych dla konkretnej aparatury i procedury, opisanych w ramach tej metody. W przypadku istotnie zmienionych warunków badania inne wartości progowe i kontrolne mogą mieć zastosowanie. Dlatego też zaleca się, aby metodę postępowania i wartość progową rezystancji kalibrować poprzez wykonanie serii badań na wzorcach wybranych spośród substancji chemicznych używanych w studium atestacyjnym (3).

1.6. **Zasada metody badania — analiza modelu skóry ludzkiej**

W badaniu tym materiał badany oddziałuje przez czas do 4 godzin na trójwymiarowy model skóry ludzkiej, składający się z odbudowanego naskórka z funkcjonalną warstwą rogową. Materiały o działaniu korozyjnym rozpoznaje się po ich zdolności obniżania żywotności komórek (określonej, na przykład metodą redukcji MTT) poniżej zdefiniowanych poziomów progowych dla określonych okresów oddziaływania. Zasada oznaczania zgodna jest z hipotezą, że substancjami chemicznymi o działaniu korozyjnym są te, które mogą przenikać przez warstwę rogową (poprzez dyfuzję lub erozję) i są wystarczająco cytotoksyczne, by powodować śmierć komórki w spodnich warstwach komórek.

1.7. **Opis metody badania — analiza modelu skóry ludzkiej**

1.7.1. *Modele skóry ludzkiej*

Modele skóry ludzkiej mogą pochodzić z różnych źródeł, ale muszą spełniać pewne kryteria. Model powinien mieć funkcjonalną warstwę rogową i znajdującą się pod spodem warstwę żywych komórek. Bariera ochronna warstwy rogowej powinna być wystarczająco silna. Można to sprawdzić badając odporność modelu na działanie cytotoksyczne poddając go działaniu znanych cytotoksycznych substancji, które zwykle nie przedostają się przez warstwę rogową. Model powinien dawać powtarzalne wyniki dla określonych warunków doświadczalnych.

Żywe komórki w modelu skóry powinny mieć wystarczająco wysoką żywotność, by rozróżnienie między pozytywnymi i negatywnymi substancjami kontrolnymi było wyraźne. Żywotność komórek (określona, na przykład, metodą redukcji MTT, tj. wartości OD) po działaniu negatywnej substancji kontrolnej powinna spaść poniżej dopuszczalnej wartości granicznej dla konkretnego modelu. Podobnie, żywotność komórek po działaniu pozytywnej substancji kontrolnej (odpowiednio w porównaniu do negatywnej substancji kontrolnej) powinna wchodzić w zakres określonych granic. Przede wszystkim trzeba wykazać, że używany model prognozowany spełnia wymagania międzynarodowej normy atestacyjnej (2).

1.7.2. *Procedura badania*

1.7.2.1. Przygotowanie materiału do badań

Badane substancje w płynie podaje się tak, by pokryły powierzchnię skóry (minimalnie 25 μl/cm^2). W przypadku gdy badana substancja jest ciałem stałym, należy nałożyć ją tak, by pokryć całą powierzchnię skóry i następnie zwilżyć w celu zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą; tam gdzie jest to stosowne, przed rozprowadzeniem badanej substancji można ją zemleć na proszek. Należy wykazać, że metoda nakładania nadaje się dla szerokiego zakresu typów substancji chemicznych (2). Po zakończeniu okresu działania badanej substancji na powierzchnię skóry należy tę substancję dokładnie spłukać roztworem soli z powierzchni skóry.

1.7.2.2. Określenie żywotności komórek

Żywotność komórek można określić dowolną, uznaną metodą ilościową. Najczęściej stosowaną metodą jest metoda redukcji MTT, która sprawdziła się jako dająca dokładne wyniki w rozmaitych laboratoriach (2). Krążek skóry umieszcza się w roztworze MTT w stężeniu 0,3 mg/ml w temperaturze 20-28 °C przez 3 godziny. Następnie ekstrahuje się wytrącony, niebieski formazan (ekstrakcja rozpuszczalnikowa), a stężenie formazanu mierzy określając gęstość optyczną przy długości fali między 545 a 595 nm.

1.7.2.3. Dodatkowe informacje

Użyty model skóry, czas narażenia i procedury płukania itp. mają silny wpływ na wyniki żywotności komórek. Zaleca się, by metodę i model predykcyjny wykalibrować wykonując serię badań na wzorcach wybranych spośród substancji chemicznych używanych w studium atestacyjnym ECVAM (3). Istotne jest wykazanie powtarzalności użytej metody zarówno w obrębie jak i między laboratoriami oraz dla szerokiego zakresu substancji chemicznych, zgodnie z normami międzynarodowymi. Jako warunek minimum, metoda powinna spełniać kryteria wcześniej określonej atestacji naukowej (2) a wyniki takiego studium atestacyjnego muszą być opublikowane renomowanym czasopiśmie naukowym.

2. **DANE**

2.1. **Przetwarzanie wyników**

2.1.1. *Analiza TER skóry szczura*

Wartości rezystancji (kΩ) badanego materiału, pozytywnych i negatywnych kontroli i wzorcowych substancji chemicznych należy przedstawić w postaci tabelarycznej, włącznie z danymi z replikowanych/powtarzanych testów, wartościami średnimi i uzyskaną klasyfikacją.

2.1.2. *Analiza modelu skóry ludzkiej*

Wartości OD i obliczone dane dotyczące żywotności komórek dla badanego materiału, pozytywnych i negatywnych kontroli i wzorcowych substancji chemicznych należy przedstawić w postaci tabelarycznej, włącznie z danymi dotyczącymi replikowanych/powtarzanych testów, wartościami średnimi i uzyskaną klasyfikacją.

2.2. **Ocena i interpretacja wyników**

2.2.1. *Analiza TER skóry szczura*

Jeżeli wartość średnia TER uzyskana dla badanej substancji jest większa niż 5 kΩ, substancja ta jest niekorozyjna. Jeżeli wartość TER jest mniejsza lub równa 5 kΩ, a badana substancja nie jest środkiem powierzchniowo czynnym ani obojętną substancją organiczną, to jest ona korozyjna.

W przypadku środków powierzchniowo czynnych i obojętnych substancji organicznych, dla których wartości TER są mniejsze lub równe 5 kΩ, można przeprowadzić próbę penetracji barwnika. Jeżeli średnia zawartość barwnika w krążkach jest większa lub równa średniej zawartości barwnika w równolegle przeprowadzonych testach dla kontroli pozytywnej wykorzystującej 36 % HCl, wówczas wynik badania wskazuje, że substancja jest rzeczywiście pozytywna i tym samym korozyjna. Jeżeli średnia zawartość barwnika w krążkach jest mniejsza uzyskana w równolegle przeprowadzonych testach dla kontroli pozytywnej wykorzystującej 36 % HCl, wówczas wynik badania wskazuje, że substancja jest fałszywie pozytywna i tym samym niekorozyjna.

2.2.2. *Analiza modelu skóry ludzkiej*

Wartość OD dla kontroli negatywnej oznacza 100 % żywotność komórek, tak więc na podstawie wartości OD uzyskanych dla każdej próbki badanej można obliczyć procentową żywotność względem kontroli negatywnej. Wartość procentowa odcięcia dla żywotności komórek rozróżniającą materiały korozyjne od niekorozyjnych (lub rozróżniającą między różnymi klasami substancji korozyjnych) musi być wyraźnie określona w modelu predykcyjny przed atestacją metody, a przeprowadzone później studium atestacyjne musi wykazać, że wartość odcięcia jest odpowiednia (2).

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

Sprawozdanie dotyczące badania

Sprawozdanie dotyczące badania musi obejmować przynajmniej następujące informacje:

Substancja badana:

— dane identyfikacyjne, charakter fizyczny, tam gdzie to jest stosowne, właściwości fizykochemiczne. Podobne informacje należy podać w odniesieniu do substancji odniesienia, jeżeli ją wykorzystano.

Warunki badania:

— szczegóły zastosowanej procedury badania,

— opis i uzasadnienie wszelkich modyfikacji.

Wyniki:

— zestawienie tabelaryczne wartości rezystancji (analiza TER) lub procentowych wartości żywotności komórek (analiza modelu skóry ludzkiej) dla badanego materiału, kontroli pozytywnych i negatywnych i wzorcowych substancji chemicznych odniesienia, włącznie z danymi dotyczącymi doświadczeń replikowanych/powtarzanych i wartościami średnimi,

— opis wszelkich, innych zaobserwowanych skutków.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, str. 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, str. 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, str. 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, str. 507-512.

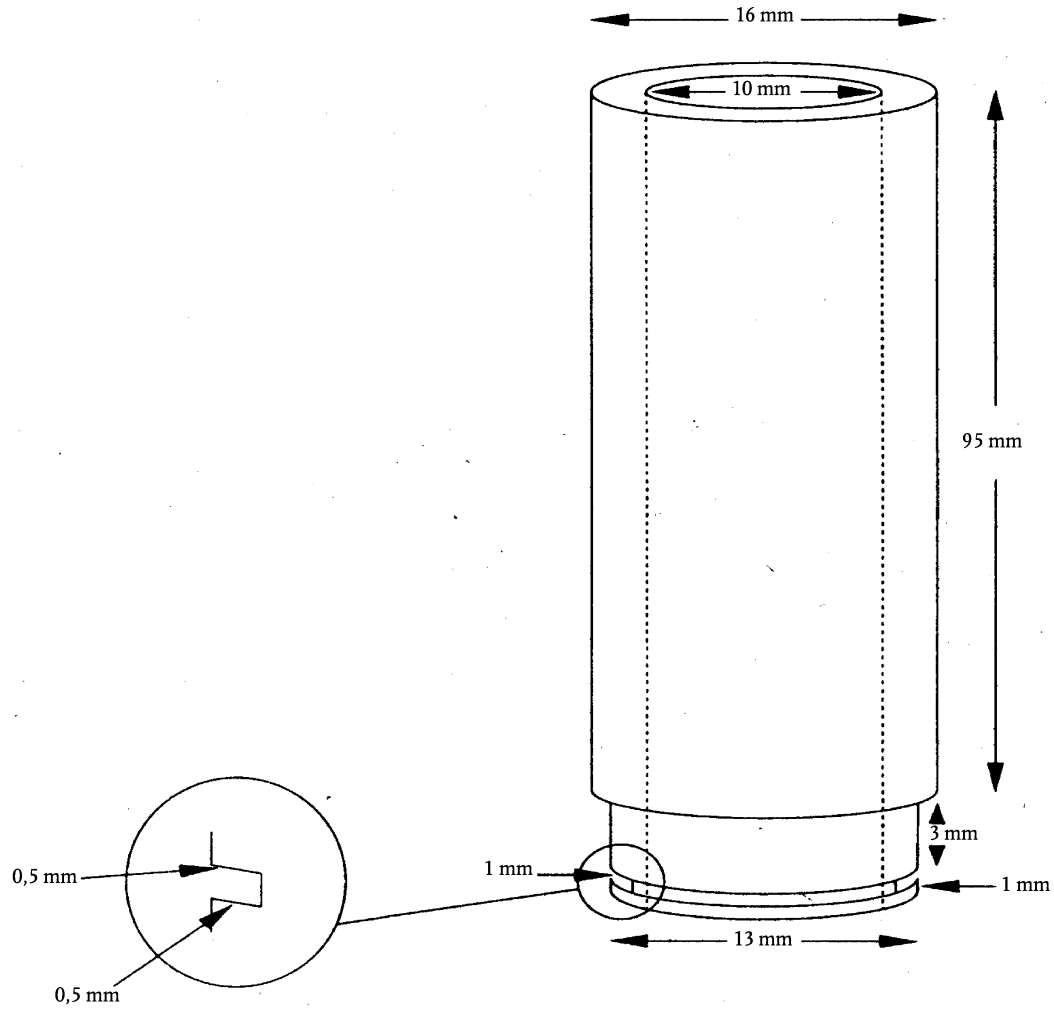
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial, Toxicology in Vitro 6, str. 191-194.

(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, str. 709-720.

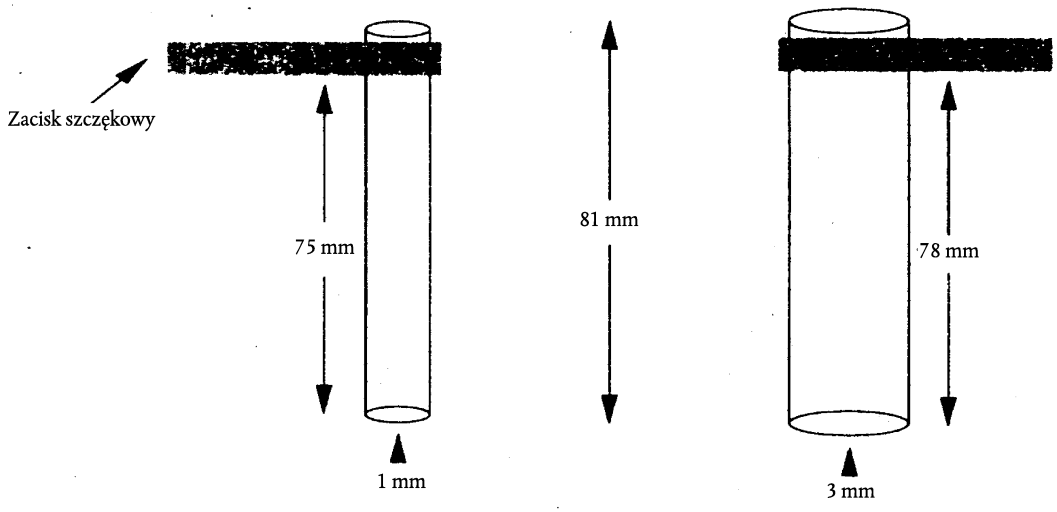
(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on in vitro skin corrosivity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

Rysunek 1

Wymiary rurki PTFE

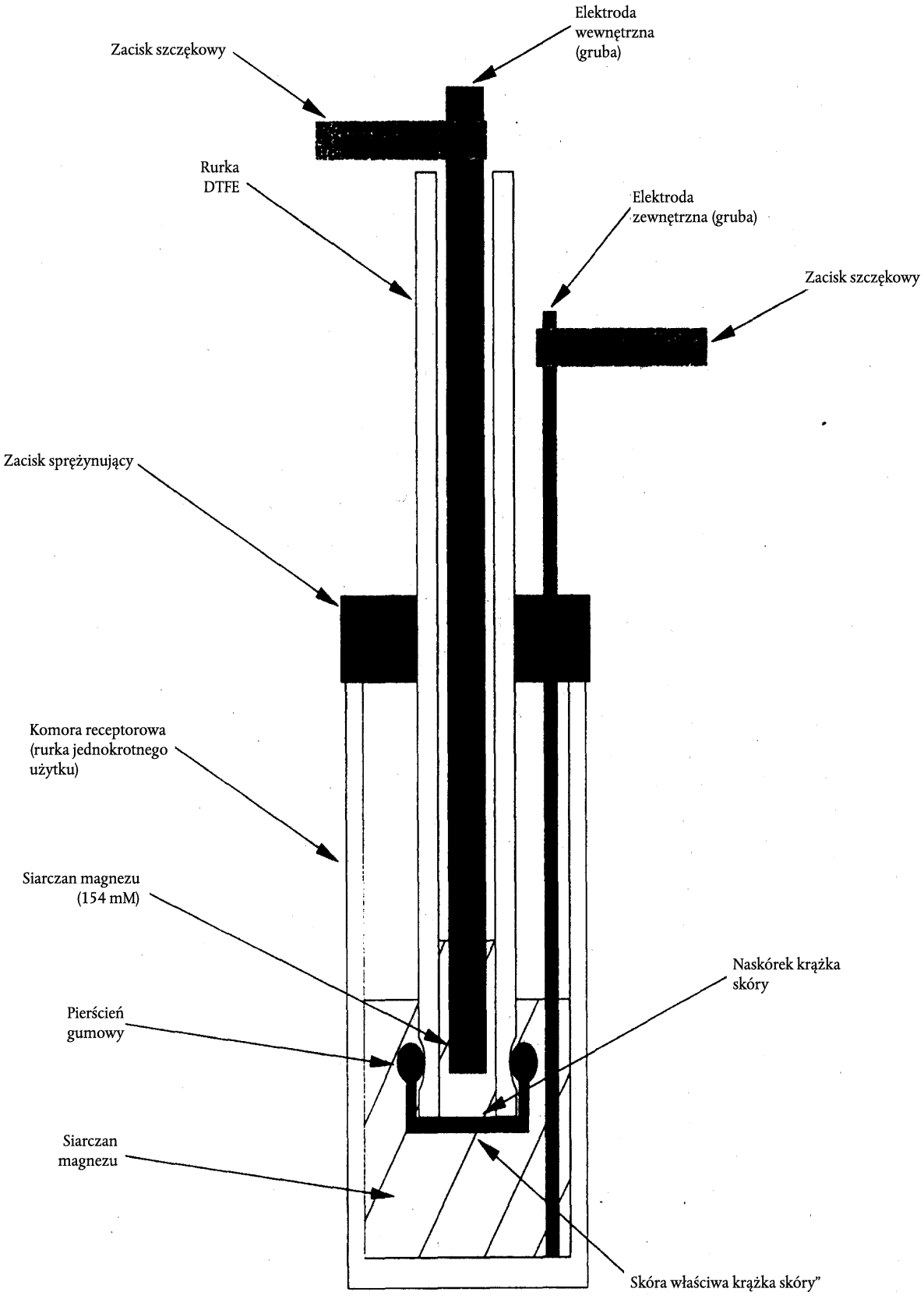


Electrode dimensions



Rysunek 2

Aparat do analizy TER skóry szczura



ZAŁĄCZNIK II

„B.41. FOTOTOKSYCZNOŚĆ — BADANIE FOTOTOKSYCZNOŚCI 3T3 NRU *IN VITRO*

1. **METODA**

1.1. **Wprowadzenie**

Fototoksyczność definiowana jest jako toksyczna odpowiedź ujawniająca się po poddaniu skóry działaniu określonych substancji chemicznych i następnie wyeksponowaniu na działanie światła, lub podobnie wywołana przez napromienienie skóry po ogólnoustrojowym podaniu substancji chemicznej.

Informacje uzyskane z badania fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* służą do określenia potencjału fototoksycznego badanej substancji, tj. istnienia lub braku możliwych zagrożeń, jakie mogą wystąpić wskutek badanej substancji w połączeniu z narażeniem na promieniowanie UV lub widzialne.

Skoro ostatecznym celem toksykologicznym badania *in vitro* jest określenie fototoksyczności, wywołanej łącznym działaniem chemicznym i światła, w badaniu tym można określić substancje, które są fototoksyczne *in vivo* po podaniu ogólnoustrojowym i przeniknięciu do skóry, jak również substancje, które mają działanie fotodrażniące po powierzchniowym zastosowaniu na skórę.

Badanie fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* opracowano i przeprowadzono jego atestację w ramach wspólnego projektu EU/COLIPA w latach 1992-1997 (1) (2) (3), w celu ustanowienia alternatywy *in vitro* dla różnych stosowanych badań *in vivo*. Na warsztatach OECD w 1996 r. zalecano, by do oceny fototoksyczności stosować badawcze podejście hierarchiczne *in vitro* (4).

Wyniki badania fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* porównywano ze skutkami ostrych fototoksyczności/fotopodrażnień *in vivo* u zwierząt i ludzi, i okazało się, że badanie ten daje doskonałą predykcjonalność tych skutków. Badanie nie jest przeznaczone do przewidywania innych, szkodliwych skutków, które mogą się ujawnić w wyniku łącznego działania chemicznego i świetlnego, np. fotogenotoksyczności, fotoalergii i fotorakotwórczości, mimo że wiele substancji chemicznych wykazujących te swoiste właściwości daje pozytywną odpowiedź w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro*. Ponadto badanie nie jest przeznaczone do oceny siły działania fototoksycznego.

Podejście sekwencyjne do badania fototoksyczności substancji chemicznych określono w dodatku.

1.2. **Definicje**

Natężenie promieniowania: natężenie promieniowania ultrafioletowego (UV) lub widzialnego padającego na powierzchnię, mierzona w W/m^2 lub mW/cm^2.

Dawka napromienienia: ilość (natężenie promieniowania × czas) promieniowania ultrafioletowego (UV) lub widzialnego padająca na powierzchnię, wyrażona w dżulach (= W × s) na jednostkę powierzchni, np. J/m^2 lub J/cm^2.

Zakres promieniowania UV: CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) zaleca następujące oznaczenia: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) i UVC (100-280 nm). Stosowane są również inne oznaczenia: granicę podziału między UVB i UVA często umieszcza się na 320 nm, a podzakres UVA może być podzielony na UV-A1 i UV-A2 z granicą podziału około 340 nm.

Żywotność komórek: parametr określający łączną aktywność populacji komórek (np. wychwyt czerwieni obojętnej w lizosomach komórkowych), który zależnie od zmierzonego punktu końcowego i wykorzystanego badania skorelowany jest z całkowitą liczbą i/lub żywotnością komórek.

Względna żywotność komórek: żywotność komórek wyrażona w odniesieniu do kontroli ujemnych (rozpuszczalników) użytych w całej procedurze badania (zarówno + UV jak i – UV), ale nie poddanych działaniu badanej substancji chemicznej.

Model predykcyjny: algorytm użyty do przeniesienia wyników badania toksyczności na predykcję potencjału toksycznego. Według obecnych wytycznych dotyczących badań, do przeniesienia wyników badania fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* na predykcję potencjału toksycznego można używać algorytmów PIF i MPE.

PIF (współczynnik fotopodrażnienia): współczynnik otrzymany przez porównanie dwóch równoważnych stężeń cytotoksycznych (EC_{50}) dla badanej substancji chemicznej uzyskanych pod nieobecność (– UV) i w obecności (+ UV) niecytotoksycznego podrażnienia promieniowaniem UVA/widzialnym.

MPE (średni fotoefekt): nowa miara wyprowadzona z matematycznej analizy całego kształtu dwóch wykresów odpowiedzi na stężenie uzyskanych pod nieobecność (– UV) i w obecności (+ UV) niecytotoksycznego podrażnienia promieniowaniem UVA/widzialnym.

Fototoksyczność: ostra odpowiedź toksyczna ujawniająca się po poddaniu skóry działaniu określonych substancji chemicznych i następnie wyeksponowaniu na działanie światła, lub podobnie wywołana przez napromienienie skóry po ogólnoustrojowym podaniu substancji chemicznej.

Fotopodrażnienie: podklasa pojęcia »fototoksyczności« używana do opisu tylko tych reakcji fototoksycznych, które powstają na skórze po narażeniu na substancje chemiczne (podane naskórnie lub doustnie). Te reakcje fototoksyczne zawsze prowadzą do nieswoistego uszkodzenia komórki (podobne do reakcji na opalanie na słońcu).

Fotoalergia: nabyta reaktywność immunologiczna nie występująca przy pierwszym poddaniu działaniu chemicznemu i promieniowaniu i przed ujawnieniem reaktywności skóry wymaga jedno- lub dwutygodniowego okresu wywołującego.

Fotogenotoksyczność: genotoksyczna odpowiedź, obserwowana na poziomie genetycznym, ujawniająca się po poddaniu komórek działaniu niegenetoksycznej dawki promieniowania UV/widzialnego i niegenetoksycznej substancji chemicznej.

Fotorakotwórczość: rakotwórczość wywołana powtarzalnym napromienianiem i działaniem chemicznym. Pojęcia »foto-współrakotwórczości« używa się, gdy działanie substancji chemicznej wzmacnia onkogenezę powodowaną działaniem promieniowania UV.

1.3. **Substancje odniesienia**

Oprócz chlorpromazyny jako chemicznej kontroli pozytywnej, którą należy badać równolegle z każdą analizą, dla nowoopracowywanych badań fototoksyczności 3T3 NRU zaleca się, by chemiczne substancje odniesienia wybierać z podzbioru substancji chemicznych używanych w międzylaboratoryjnych testach niniejszego badania (1) (3) (13).

1.4. **Rozważania wstępne**

Wiadome jest, że wiele rodzajów substancji chemicznych wywołuje efekt fototoksyczny (5) (6) (7) (8). Jedyną wspólną ich cechą jest zdolność absorpcji energii świetlnej w zakresie światła słonecznego. Zgodnie z pierwszym prawem fotochemii (prawo Grotthausa-Drapera) reakcja fotochemiczna wymaga zaabsorbowania kwantu energii światła. Zatem zgodnie z obecnymi wytycznymi, przed rozważeniem przystąpienia do badania biologicznego należy określić widmo absorpcyjne badanej substancji chemicznej w zakresie promieniowania UV/widzialnego (np. zgodnie z wytyczną OECD w zakresie badania nr 101). Jeżeli współczynnik molowej ekstynkcji/absorpcji jest mniejszy niż 10 l. × mol^{-1} × cm^{-1}, to substancja chemiczna nie ma potencjału fotoreakcyjnego i nie trzeba badać jej w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* ani innym badaniem biologicznym na szkodliwe działanie fotochemiczne (Dodatek).

1.5. **Zasada metody badania**

Znane są cztery mechanizmy, dzięki którym absorpcja światła przez grupę chromoforową może wywołać odpowiedź fototoksyczną (7). Wynikiem każdego z ich jest zniszczenie komórki. Dlatego też badanie fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* opiera się na porównaniu cytotoksyczności substancji chemicznej po i bez napromienienia niecytotoksyczną dawką promieniowania UVA/vis. w badaniu tym cytotoksyczność wyrażona jest jako zależna od stężenia redukcja wychwytu czerwieni obojętnej (NR) (9) 24 godziny po poddaniu działaniu badanej substancji chemicznej i napromienieniu.

Kultura komórek Balb/c 3T3 hodowana jest przez 24 godziny w celu utworzenia monowarstw. Następnie po dwie 96-komorowe płytki dla każdej badanej substancji chemicznej są inkubowane wstępnie przez 1 godzinę z 8 różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej. Następnie jedną z dwóch płytek poddaje się niecytotoksycznej dawce promieniowania UVA/vis równej 5 J/cm^2 UVA (doświadczenie + UV), natomiast drugą płytkę trzyma się w ciemności (doświadczenie – UV). w obu płytkach pożywkę z badaną substancją należy zastąpić pożywką do hodowli kultury i inkubować je przez następne 24 godziny. Żywotność komórek określa się metodą wychwytu czerwieni obojętnej (NRU) przez 3 godziny. Dla każdego z ośmiu badanych stężeń określa się względną żywotność komórek, wyrażoną w procentach nienarażonych próbek negatywnych kontroli. w celu określenia potencjału fototoksycznego porównuje się odpowiedzi dla stężeń, uzyskane dla próbek napromienionych (+ UV) i nie napromienionych (– UV), zazwyczaj na poziomie EC_{50}, tzn. stężenia hamującego żywotność komórek o 50 % w porównaniu do próbek nie poddanych działaniu.

1.6. **Kryteria jakości**

Wrażliwość komórek na promieniowanie UVA, dane historyczne: należy regularnie sprawdzać wrażliwość komórek na promieniowanie UVA. Komórki należy posiać w zagęszczeniu używanym w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro*, następnego dnia napromieniować dawkami UVA w zakresie 1-9 J/cm^2, i jeden dzień później określić żywotność komórek analizą NRU. Komórki spełniają wymagania jakości, jeżeli ich przeżywalność po napromieniowaniu dawką 5 J/cm^2 UVA jest nie mniejsza niż 80 % kontroli ciemnych. Przy najwyższej dawce napromieniowania 9 J/cm^2 UVA, przeżywalność nie powinna być mniejsza niż 50 % kontroli ciemnych. Kontrolę taką należy powtarzać co około 10 przesiewów.

Wrażliwość na promieniowanie UVA komórek kontroli negatywnej, badanie bieżące: badanie spełnia kryteria jakości, jeżeli kontrole negatywne (komórki w zrównoważonym roztworze soli Earla (EBSS) z dodatkiem lub bez dodatku 1 % dwumetylosulfotlenku (DMSO) lub 1 % alkoholu etylowego (EtOH)) w doświadczeniu + UVA wykazują żywotność nie mniejszą niż 80 % komórek nie napromienionych w tym samym roztworze z równoległego doświadczenia ciemnego (– UVA).

Żywotność kontroli negatywnych: bezwzględna gęstość optyczna ($OD_{540\ NRU}$) zmierzona w ekstrakcie NR z kontroli negatywnych wskazuje, że 1×10^4 komórek posianych w dołku wyrosła z normalnym czasem podwajania w czasie dwóch dni analizy. Badanie spełnia kryteria przyjęcia, jeżeli wartość średnia $OD_{540\ NRU}$ kontroli niepoddanych działaniu wynosi ≥ 0,2.

Kontrola pozytywna: równolegle z każdym badaniem fototoksyczności 3T3 NRU in vitro należy wykonać badanie znanej substancji fototoksycznej. w studium atestacyjnym EU/COLIPA do kontroli pozytywnej używano chlorpromazynę (CPZ) i dlatego zaleca się używanie jej w kontrolach pozytywnych. Dla CPZ badanej zgodnie ze standardowym protokołem w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU, określono następujące kryteria przyjęcia: CPZ napromieniona (+ UVA): EC_{50} = 0,1-2,0 μg/ml, CPZ nie napromieniona (– UVA): EC_{50} = 7,0-90,0 μg/ml. Współczynnik fotopodrażnienia (PIF), tzn. przesunięcie EC_{50} powinno być co najmniej 6.

Zamiast CPZ dopuszcza się stosowanie innych znanych, fototoksycznych substancji chemicznych, odpowiednich z uwagi na klasę lub charakterystyki rozpuszczalności badanej substancji chemicznej. w takim przypadku należy na podstawie danych historycznych określić kryteria przyjęcia dla badania w postaci zakresów wartości EC_{50} i PIF lub MPE (średni fotoefekt).

1.7. **Opis metody badania**

1.7.1. *Preparaty*

1.7.1.1. Komórki

W studium atestacyjnym użyto ustalonej linii komórkowej fibroblastów mysich — Balb/c 3T3, klon 31 — z ATCC albo ECACC, dlatego też zaleca się ich stosowanie. Inne komórki lub linie komórkowe można z powodzeniem wykorzystać przy tym samym protokole badania, o ile warunki hodowli kultury są dostosowane do szczególnych potrzeb komórek, z tym że wymagane jest wykazanie równoważności.

Komórki należy regularnie sprawdzać pod względem niewystępowania skażenia mikoplazmą i użyć je wolno wyłącznie, wtedy gdy wynik sprawdzenia jest zadowalający.

Jako że wrażliwość komórek na promieniowanie UVA może rosnąć wraz z liczbą przesiań, należy używać komórek Balb/c 3T3 o najmniejszej dysponowanej liczbie przesiań, gdy możliwe poniżej 100. Istotne jest, aby regularnie sprawdzać wrażliwość komórek Balb/c 3T3 na promieniowanie UVA zgodnie z procedurą kontroli jakości opisaną w niniejszej wytycznej.

1.7.1.2. Pożywki i warunki hodowli kultury

Do rutynowego przesiewania komórek i w procedurze badania należy używać stosowne pożywki i właściwe warunki inkubacji kultury. Dla komórek Balb/c 3T3 są to DMEM wzbogacona 10 % surowicy z bydlęcej krwi płodowej, 4 mM glutaminy, penicyliny i streptomycyny; i inkubacja nawilżająca w 37 °C/7,5 % CO_2. Szczególnie istotne jest, aby warunki hodowli kultury zapewniały, że długość cyklu komórek mieści się w normalnym zakresie historycznym użytych komórek lub linii komórkowej.

1.7.1.3. Przygotowanie kultur

Komórki z zamrożonego zapasu kultur należy posiać na pożywce w odpowiednim zagęszczeniu i wyhodować przynajmniej jedną kulturę pochodną zanim zostaną użyte do badania fototoksyczności 3T3 NRU in vitro.

Komórki przeznaczone do badania fototoksyczności należy posiać na pożywce w takim zagęszczeniu, by nie nastąpiło zlanie się kultur na końcu badania, tzn. przy oznaczaniu żywotności komórek 48 godzin po wysianiu. Dla linii komórkowej Balb/c 3T3 rosnących na płytkach z 96 dołkami, zaleca się zagęszczenie 1×10^4 komórki na dołek.

Dla każdej badanej substancji chemicznej, komórki należy posiać w jednakowy sposób na dwóch oddzielnych płytkach z 96 dołkami, które następnie równolegle przechodzą całą procedurę w jednakowych warunkach rozwoju, wyjąwszy czas, gdy jedna płytka jest napromieniana (+ UVA/vis), a druga przechowywana w ciemności (– UVA/vis).

1.7.1.4. Aktywacja metabolizmu

Chociaż systemy metabolizujące są generalnie wymagane we wszystkich badaniach *in vitro* przewidywania potencjału genotoksycznego i rakotwórczego, fototoksykologia do chwili obecnej nie zna substancji chemicznej, która do ujawnienia właściwości fototoksycznych w badaniu *in vivo* lub *in vitro* potrzebuje transformacji metabolicznej. Zatem wykonywanie niniejszego badania w systemie aktywacji metabolicznej nie jest ani konieczne ani nie ma naukowego uzasadnienia.

1.7.1.5. Badane substancje chemiczne/przygotowanie

Badane substancje chemiczne powinny być świeżo przygotowane bezpośrednio przed użyciem, chyba że wykazują stabilność zezwalającą na ich przechowywanie. w przypadkach, gdy może nastąpić szybka fotodegradacja może być wymagane, aby przygotowywania wykonywać przy oświetleniu czerwonym światłem.

Badane substancje chemiczne należy rozpuścić w buforowych roztworach soli, np. zrównoważony roztwór soli Earla (EBSS) lub solanka buforowane fosforanem (PBS), które, aby uniknąć zakłóceń podczas napromieniania, powinny być wolne od składników białkowych i absorbujących światło barwników wskaźnikowych pH.

Badane substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach w stężeniu 100 × stężenie ostateczne i następnie rozcieńczyć w proporcji 1:100 w buforowym roztworze soli. Jeżeli używany jest rozpuszczalnik, to musi on być obecny w stałym stężeniu objętościowym 1 % (obj./obj.) we wszystkich kulturach, tzn. w kontrolach negatywnych jak i we wszystkich stężeniach badanej substancji chemicznej.

Zalecanymi rozpuszczalnikami są dimetylosulfotlenek (DMSO) i alkohol etylowy (EtOH). Można także używać innych, nisko cytotoksycznych rozpuszczalników (np. acetonu), ale w takich przypadkach należy dokładnie ocenić je z punktu widzenia szczególnych właściwości, np. reagowania z badaną substancją chemiczną, spowalnianie efektu fototoksycznego, obecności rodników.

Gdy trzeba, w celu ułatwienia rozpuszczania można użyć mieszadeł mechanicznych i/lub akustycznych, i/lub podgrzać mieszaninę do temperatury 37 °C.

1.7.1.6. Napromienianie UV/przygotowanie

Źródło światła: przy badaniu fototoksyczności najbardziej krytycznym czynnikiem jest właściwy dobór źródła światła i filtrów. Z promieniowaniem UVA i widzialnym zwykle wiąże się światłowrażliwość (7) (10), natomiast promieniowanie UVB jest mniej przydatne i samo jest już silnie cytotoksyczne, przy czym z zakresie 313-280 nm jego cytotoksyczność wzrasta 1 000-krotnie (11). Kryteria doboru właściwego źródła światła powinny uwzględniać jako zasadniczy wymóg, by źródło światła emitowało promieniowanie w zakresie absorbowanym przez badaną substancję chemiczną i aby dawka promieniowania (uzyskiwana w rozsądnym czasie) była wystarczająca do wykrycia znanych sensybilizatorów. Ponadto użyte długości fali i dawki nie powinny być szkodliwe dla systemu badania, należy tu uwzględnić także emisję ciepła (podczerwieni).

Optymalnym źródłem światła są symulatory światła słonecznego. w symulatorach światła słonecznego wykorzystuje się łukowe lampy ksenonowe i lampy rtęciowo- halogenowe. Te drugie mają tę zaletę, że emitują mniej ciepła i są tańsze, ale gorzej symulują światło słoneczne. Jako że wszystkie symulatory światła słonecznego emitują znaczne ilości promieniowania UVB, należy stosować odpowiednie filtry, aby wytłumić wysoko cytotoksyczne promieniowania UVB.

W badaniach fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* należy praktycznie wyeliminować promieniowanie UVB (stosunek UVA:UVB powinien być 1:20 lub mniejszy). Przykład rozkładu widma promieniowania filtrowanego symulatora światła słonecznego używane w studium atestacyjnym badania fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* opublikowano (3).

Dozymetria: natężenie promieniowania należy regularnie sprawdzać przed każdym badaniem przy pomocy odpowiedniego szerokopasmowego dozymetru UV. Dozymetr UV powinien być wykalibrowany dla źródła. Działanie dozymetru UV należy sprawdzać, do tego celu zaleca się korzystanie z drugiego, referencyjnego dozymetru UV takiego samego typu i taka samo wykalibrowanego. Idealnym rozwiązaniem jest, w dłuższych odstępach czasu, mierzenie spektroradiometrem spektralnego natężenia promieniowania filtrowanego źródła światła w celu skontrolowania kalibracji szerokopasmowego dozymetru UV, z tym że takie oprzyrządowanie wymaga odpowiedniego wyszkolonego personelu.

W studium atestacyjnym ustalono, że dawka 5 J/cm^2 (UVA) nie jest cytotoksyczna dla komórek Balb/c 3T3, ale wystarczająco silna do pobudzenia słabo fototoksycznych substancji chemicznych. Do uzyskania dawki 5 J/cm^2 w czasie 50 minut natężenie promieniowania należy wyregulować na 1,666 mW/cm^2. w przypadku użycia innej linii komórkowej lub innego źródła światła może okazać się konieczne lekkie dostosowanie dawki UVA, należy przy tym kierować się kryteriami nieszkodliwości dla komórek i wystarczalności do wykrycia standardowych fototoksyn. Czas napromieniania należy obliczyć według następującego wzoru:

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

1.7.2. *Warunki badania*

Maksymalne stężenie badanej substancji chemicznej nie powinno przekraczać 100 µg/ml, ponieważ wszystkie fototoksyczne substancje chemiczne były wykryte przy niższych stężeniach, natomiast przy wyższych stężeniach wzrasta częstość występowania substancji fałszywie pozytywnych (przeszacowanie) (13). pH przy najwyższym stężeniu badanej substancji chemicznej powinno być zadowalające (w zakresie: 6,5-7,8).

Zakresy stężeń substancji chemicznych badanych w obecności (+ UVA) i przy braku (– UVA) napromienienia należy starannie określić we wstępnych doświadczeniach mających na celu znalezienie zakresu. Zakres stężeń i podział na podzakresy należy tak wyregulować, aby charakterystyki stężenie-odpowiedź miały wystarczające uzasadnienie w danych doświadczalnych. Zakres stężeń należy podzielić na odcinki według postępu geometrycznego (stały współczynnik rozcieńczenia).

1.7.3. *Procedura badania* [1]

1.7.3.1. Pierwszy dzień

Przygotować zawiesinę komórek 1×10^5 komórek na 1 ml pożywki i rozdzielić 100 µl samej pożywki do zewnętrznych dołków 96 dołkowej, płytki do mikromiareczkowania (= blanki). Do pozostałych dołków rozdzielić 100 µl zawiesiny komórkowej 1×10^5 komórek/ml (= 1×10^4 komórek/dołek). Dla każdej badanej substancji chemicznej przygotować dwie płytki: jedną do oznaczenia cytotoksyczności (– UVA) i drugą do oznaczenia fototoksyczności (+ UVA).

Inkubować komórki przez 24 godziny (7,5 % CO_2, 37 °C) aż do uformowania półzlewającej się monowarstwy. Ten okres inkubacji pozwala komórkom na odrodzenie się i przywarcie do podłoża oraz przyrost wykładniczy.

1.7.3.2. Drugi dzień

Po inkubacji należy dekantować pożywkę z komórek i przepłukać je dwukrotnie 150 µl EBSS/PBS na przegródkę. Dodać 100 µl EBSS/PBS zawierającego badaną substancję chemiczną w odpowiednim stężeniu lub sam rozpuszczalnik (kontrola negatywna). Badaną substancję chemiczną podać w 8 różnych stężeniach. Komórki z badaną substancją chemiczną inkubować w ciemności przez 60 minut (7,5 % CO_2, 37 °C).

W celu wykonania części (+ UVA) analizy należy napromieniać komórki w temperaturze pokojowej przez 50 minut przez wieko 96 dołkowej płytki promieniowaniem 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Posługując się wentylatorem uniemożliwić kondensowanie się H_2O pod wiekiem płytki. Odpowiadające im płytki do próby ciemnej (– UVA) trzymać w temperaturze pokojowej w ciemnym pudełku przez 50 minut (= czas napromieniania UVA).

Dekantować badany roztwór i dwukrotnie przepłukać 150 µl EBSS/PBS. Zastąpić EBSS/PBS pożywką i inkubować (7,5 % CO_2, 37 °C) przez noc (18-22 godz.).

1.7.3.3. Trzeci dzień

Badanie mikroskopowe

Zbadać komórki pod mikroskopem z kontrastem fazowym. Zarejestrować zmiany morfologiczne komórek spowodowane cytotoksycznym działaniem badanej substancji chemicznej. Zaleca się przeprowadzenie takiego badania mikroskopowego w celu wyeliminowania błędów doświadczalnych, chociaż uzyskanych wyników nie używa się przy ocenie cytotoksyczności lub fototoksyczności.

Badanie wychwytu czerwieni obojętnej

Przepłukać komórki 150 µl ciepłego roztworu EBSS/PBS. Delikatnie usunąć roztwór płuczący. Dodać 100 µl medium NR i inkubować w 37 °C, w nawilżonej atmosferze 7,5 % CO_2 przez 3 godziny.

Po inkubacji usunąć medium NR i przepłukać komórki 150 µl roztworu EBSS/PBS. Dekantować i bibułą ściągnąć całkowicie EBSS/PBS. (Opcjonalnie: odwirować odwróconą płytkę).

Dodać dokładnie 150 µl roztworu desorbującego NR (świeżo przygotowany alkohol etylowy/kwas octowy).

Silnie wytrząsać płytkę do mikromiareczkowania na wytrząsarce do płytek przez 10 minut aż do wyekstrahowania NR z komórek i powstania homogenicznego roztworu.

Zmierzyć spektrofotometrem gęstość optyczną ekstraktu NR przy 540 nm, używając blanki jako odniesienia. Zarejestrować dane w stosownym formacie pliku (np. ASCII) w celu późniejszego analizowania.

2. **DANE**

2.1. **Jakość i ilość danych**

Dane powinny umożliwić prawidłową analizę charakterystyki stężenie-odpowiedź uzyskanej przy i bez napromienienia UVA/vis. w przypadku stwierdzenia cytotoksyczności należy tak dobrać zakres stężeń i poszczególne stężenia, aby umożliwić dopasowanie charakterystyki do danych doświadczalnych. Z uwagi na to że badana substancja chemiczna może nie być cytotoksyczna w stężeniu poniżej określonego stężenia granicznego 100 µg/ml w doświadczeniu ciemnym (– UVA), ale wysoko cytotoksyczna gdy napromieniona (+ UVA), może być konieczne, aby zakresy stężeń w obu częściach doświadczenia różniły się o rzędy wielkości w celu spełnienia wymogu wystarczającej jakości danych. Jeżeli nie stwierdza się cytotoksyczności w obu częściach doświadczenia (– UVA i + UVA), wystarczające jest badanie z dużym odstępem między kolejnymi dawkami w zakresie aż do najwyższego stężenia.

Powtórzenie doświadczenia w celu weryfikacji wyraźnie pozytywnego wyniku nie jest wymagane. Ponadto nie wymagają weryfikacji wyraźnie negatywne wyniki, z zastrzeżeniem, że substancję chemiczną przebadano dla wystarczająco wysokich stężeń. w takich przypadkach wystarcza jedno główne doświadczenie wsparte jednym lub więcej wstępnymi doświadczeniami wyznaczającymi zakres stężeń.

Badania z poziomem granicznym bliskim linii odcięcia modelu predykcyjnego należy weryfikować w powtórzonym doświadczeniu.

Jeżeli powtórzenie badania uzna się za niezbędne, to do uzyskania jednoznacznych wyników potrzebna może być zmiana warunków doświadczalnych. Kluczową zmienną w tym badaniu jest przygotowanie roztworów badanej substancji chemicznej. Tak więc zmiana tych warunków (współrozpuszczalnik, miareczkowanie, mieszanie ultradźwiękowe). Alternatywnie można rozważyć zmianę czasu inkubacji z wstępnym napromienieniem. w przypadku substancji chemicznych niestabilnych w wodzie istotne może być skrócenie czasu.

2.2. **Przetwarzanie wyników**

Tam, gdzie jest to możliwe należy określić stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym powstawanie komórkowego NRU zostało zahamowane o 50 % (EC_{50}). w tym celu należy posłużyć się stosowną procedurą regresji nieliniowej (najlepiej funkcją Hilla lub regresją logistyczną) do danych stężenie-odpowiedź lub innymi procedurami dopasowującymi (14). Przed wykorzystaniem EC_{50} do dalszych obliczeń należy sprawdzić jakość dopasowania. Alternatywnie, do obliczenia EC_{50} można wykorzystać metody graficzne. w takim przypadku zaleca się użycie papieru probabilistycznego (oś x: logarytmiczna, oś y: probit), w wielu przypadkach funkcja odpowiedzi na stężenie staje się prawie liniowa dla tak wyskalowanych osi.

2.3. **Ocena wyników (modele predykcyjne)**

2.3.1. *Model predykcyjny — wersja 1: współczynnik fotopodrażnienia (PIF)*

Jeżeli znane są pełne krzywe odpowiedzi na stężenie dla obu części doświadczenia — z napromienieniem (+ UVA) i bez napromienienia (– UVA), współczynnik fotopodrażnienia (PIF) oblicza się, korzystając z następującego wzoru:

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

PIF < 5 wskazuje na brak potencjału fototoksycznego, natomiast PIF ≥ 5 wskazuje na jego istnienie.

Jeżeli substancja chemiczna jest cytotoksyczna tylko dla + UVA i nie jest cytotoksyczna dla – UVA, nie można obliczyć współczynnika PIF, pomimo że jest to wynik wskazujący na potencjał fototoksyczny. w takich przypadkach można obliczyć współczynnik »> PIF«, jeżeli badanie cytotoksyczności (– UV) przeprowadzono dla najwyższego badanego stężenia (C_{max}) i wartość tę wykorzystuje się do obliczenia »> PIF«;

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

Jeżeli można uzyskać tylko »> PIF«, to wartość > 1 wskazuje na potencjał fototoksyczny.

Jeżeli nie można obliczyć EC_{50} (– UV) ani EC_{50} (+ UV) ze względu na to, że substancja chemiczna nie wykazuje cytotoksyczności aż do najwyższego badanego stężenia, oznacza to brak potencjału fototoksycznego. w takich przypadkach wynik oznacza się symbolicznie »PIF = *1«;

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

Jeżeli można uzyskać tylko »PIF = *1«, wskazuje to na brak potencjału fototoksycznego.

W przypadkach b) i c), przy przewidywaniu potencjału fototoksycznego należy ostrożnie uwzględniać stężenie uzyskane w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU.

2.3.2. Model *predykcyjny — wersja 2: średni fotoefekt (MPE)*

Alternatywnie, przy przewidywaniu potencjału fototoksycznego można posłużyć się zmodyfikowaną wersją modelu, którą opracowano na podstawie danych ze studium atestacyjnego EU/COLIPA (15) i przebadano w fikcyjnych warunkach w następnym badaniu nad fototoksycznością *in vitro* przy napromienianiu substancji chemicznych filtrowanym promieniowaniem UV (13). Ten model radzi sobie z ograniczeniem modelu PIF w przypadkach gdy nie można uzyskać EC_{50}. w modelu wykorzystuje się »średni fotoefekt« (MPE) — miarę, która opiera się na porównaniu całych charakterystyk odpowiedź-stężenie. Dla modelu MPE opracowano specjalny program komputerowy w Uniwersytecie Humboldta (Berlin), program ten można otrzymać bezpłatnie.

2.4. **Interpretacja wyników**

Pozytywny wynik w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* (PIF ≥ 5 lub MPE ≥ 0,1) wskazuje, że badana substancja ma potencjał fototoksyczny. Jeżeli wynik ten uzyskano dla stężeń poniżej 10 μg/ml, badana substancja chemiczna prawdopodobnie działa jak fototoksyna także w różnych warunkach napromieniowania *in vivo*. Jeżeli wynik pozytywny uzyskano tylko dla najwyższego stężenia 100 μg/ml, do oceny zagrożenia lub siły fototoksyczności mogą być potrzebne dalsze rozważania. Mogą one objąć dane dotyczące penetracji, absorpcji i możliwej akumulacji substancji chemicznej w skórze, lub przeprowadzenia potwierdzającego, alternatywnego badania, np. wykorzystującego model skóry ludzkiej *in vitro*.

Negatywny wynik w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* (PIF < 5 lub MPE < 0,1) wskazuje, że badana substancja nie jest fototoksyczna dla hodowanej kultury komórek ssaków użytych w badaniu. w przypadkach gdy substancja chemiczna mogła być zbadana w zakresie do najwyższego stężenia 100 μg/ml, wynik negatywny wskazuje na to, że substancja chemiczna nie ma potencjału fototoksycznego, a fototoksyczność *in vivo* można uważać za nieprawdopodobną. w przypadkach gdy uzyskano jednakowe odpowiedzi stężenie-toksyczność (EC_{50} + UV i EC_{50} – UV) przy niższych stężeniach, interpretacja danych będzie taka sama. Dla odmiany, jeżeli stwierdzi się brak toksyczności (+ UV i – UV) i jeżeli rozpuszczalność w wodzie ogranicza stężenia do wartości poniżej 100 μg/ml, wówczas można kwestionować zgodność badanej substancji z metodą badania i należy wziąć pod uwagę badanie potwierdzające (np. *in vitro* wykorzystujące model skóry lub model skóry *ex vivo* lub badanie *in vivo*).

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

Sprawozdanie dotyczące badania

Sprawozdanie dotyczące badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— dane identyfikacyjne i nr CAS, jeżeli są znane,

— natura fizyczna i czystość,

— właściwości fizykochemiczne stosowne dla przeprowadzenia badania,

— stabilność i fotostabilność, jeżeli są znane.

Rozpuszczalnik:

— przesłanki wyboru rozpuszczalnika,

— rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w tym rozpuszczalniku,

— procentowa zawartość rozpuszczalnika w medium (EBSS lub PBS).

Komórki:

— typ i źródło komórek,

— nieobecność mikoplazmy,

— liczba przesiań, jeżeli jest znana,

— wrażliwość komórek na UVA, określona przy pomocy urządzeń do napromieniania używanych w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro*.

Warunki badania a) — inkubacja przed i po podaniu:

— typ i skład pożywki,

— warunki inkubacji (stężenie CO_2, temperatura, wilgotność),

— czas inkubacji (przed podaniem i po podaniu badanej substancji).

Warunki badania b) — podanie substancji chemicznej:

— przesłanki wyboru stężeń badanej substancji chemicznej dla próby napromienionej UV/vis i nienapromienionej,

— w przypadku ograniczonej rozpuszczalności badanej substancji chemicznej i braku cytotoksyczności, przesłanki wyboru najwyższego badanego stężenia,

— typ i skład medium do podania badanej substancji (buforowy roztwór soli),

— czas działania substancją chemiczną.

Warunki badania c) — napromienienie:

— przesłanki wyboru źródła światła,

— charakterystyka widmowa promieniowania źródła światła,

— charakterystyki przenoszenia/absorpcji filtru(-ów),

— charakterystyki radiometru i szczegóły jego kalibracji,

— odległość systemu badania od źródła światła,

— natężenie promieniowania UVA dla tej odległości, wyrażona w mW/cm^2,

— czas ekspozycji na światło UV/vis,

— dawka UVA (natężenie promieniowania × czas), wyrażona w J/cm^2,

— temperatura kultur komórek w czasie napromieniania i kultur komórek przechowywanych w tym czasie w ciemności.

Warunki badania d) — badanie NRU:

— skład medium NR,

— czas inkubacji NR,

— warunki inkubacji (stężenie CO_2, temperatura, wilgotność),

— warunki ekstrakcji NR (rozpuszczalnik, czas ekstrakcji),

— długość fali, dla której odczytano gęstość optyczną NR,

— druga długość fali (referencyjna), jeżeli użyta,

— zawartość próby ślepej spektrofotometru, jeżeli była użyta.

Wyniki:

— żywotność komórek uzyskana dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej, wyrażona w procentach średniej żywotności kontroli,

— wykresy stężenie-odpowiedź (stężenie badanej substancji chemicznej przeciwko względnej żywotności komórek), uzyskane w równoległych doświadczeniach + UVA i – UVA,

— analiza danych wykresów stężenie-odpowiedź: jeżeli możliwe, obliczenie komputerowe/obliczenie EC_{50} (+ UVA) i EC_{50} (– UVA),

— porównanie dwóch charakterystyk stężenie-odpowiedź, uzyskanych dla próbek napromienionych UVA/vis i nienapromienionych, przez obliczenie współczynnika fotopodrażnienia (PIF) lub średniego fotoefektu (MPE),

— klasyfikacja potencjału fototoksycznego,

— kryteria przyjęcia badania a) — równoległa kontrola negatywna:

  — bezwzględna żywotność (gęstość optyczna ekstraktu NR) komórek napromienionych i nienapromienionych,

  — dane historyczne dla kontroli negatywnej, wartość średnia i odchylenie standardowe.

— kryteria przyjęcia badania b) — równoległa kontrola pozytywna:

  — EC_{50} (+ UVA) i EC_{50} (– UVA) i PIF dla pozytywnej kontroli substancji chemicznej,

  — dane historyczne dla pozytywnej kontroli substancji chemicznej: EC_{50} (+ UVA) i EC_{50} (– UVA) i PIF, wartość średnia i odchylenie standardowe.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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), EWG/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, str. 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 listopada 1997, ATLA 26, str. 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, str. (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, str. 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*, str. 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, str. 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, str. 314-348.

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

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red. absorption, *Toxicology Letters* 24, str. 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, str. 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, str. 1825-1829.

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

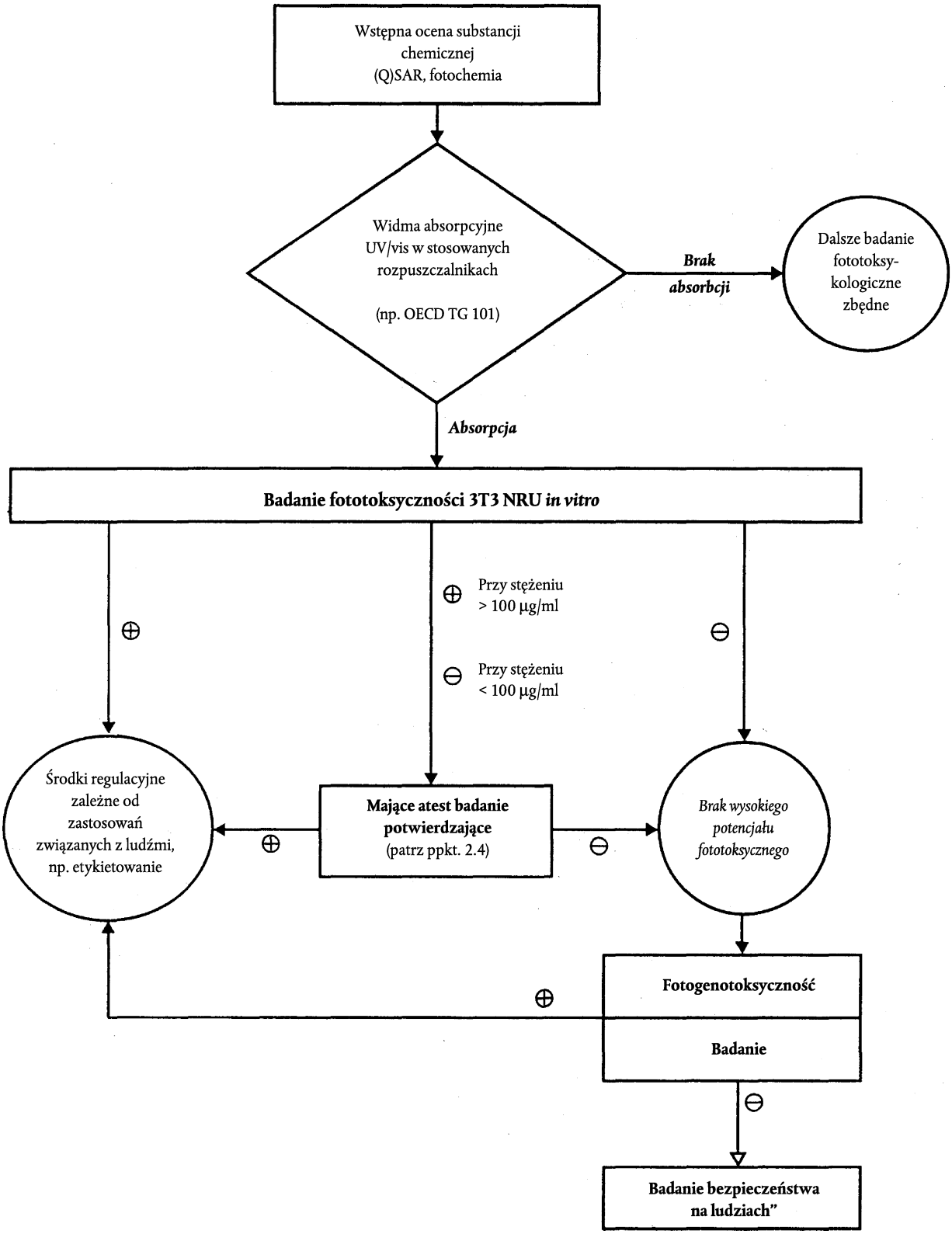
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity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

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

Dodatek

Rola badania fototoksyczności 3T3 NRU w sekwencyjnym podejściu do badania fototoksyczności substancji chemicznych



(1) Dodatkowe szczegóły można znaleźć w (12) bibliografii.