32000L0033

SMERNICA KOMISIE č. 2000/33/ES

z 25. apríla 2000,

ktorou sa po 27-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady č. 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok (*)

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 67/548/EHS z 27. júna 1967 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok [1], naposledy zmenenú a doplnenú smernicou Európskeho parlamentu a Rady 1999/33/ES [2], najmä na jej článok 28,

keďže:

(1) Príloha V k smernici č. 67/548/EHS stanovuje metódy určovania fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látok a prípravkov. Túto prílohu je nevyhnutné prispôsobiť technickému pokroku.

(2) Podľa článku 7 ods. 2 smernice Rady č. 86/609/EHS z 24. novembra 1986 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení členských štátov, týkajúcich sa ochrany zvierat, používaných na experimentálne a iné vedecké účely [3], experiment na zvieratách sa nevykoná, ak je reálne a prakticky dostupná iná vedecky uspokojivá metóda na dosiahnutie zamýšľaného cieľa.

(3) Komisia má v úmysle zaviesť do prílohy V k smernici č. 67/548/EHS niektoré alternatívne testovacie metódy, nevyžadujúce použitie zvierat pre testovanie chemikálií podľa článku 3 ods. 1 smernice č. 67/548/EHS.

(4) Opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Výboru pre prispôsobovanie technickému pokroku smerníc, určených na odstraňovanie technických prekážok obchodu s nebezpečnými látkami a prípravkami,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Texty v prílohách I a II k tejto smernici sa pridávajú k časti B prílohy V k smernici č. 67/548/EHS.

Článok 2

1. Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 1. októbra 2001. Budú o tom bezodkladne informovať Komisiu.

Ustanovenia prijaté členskými štátmi budú obsahovať odkaz na túto smernicu, alebo budú sprevádzané takýmto odkazom pri príležitosti ich úradného uverejnenia. Spôsob vytvorenia takéhoto odkazu určia členské štáty.

2. Členské štáty oznámia Komisii znenie hlavných ustanovení vnútroštátnych právnych predpisov, ktoré prijmú v oblasti pôsobnosti tejto smernice, a s korelačnou tabuľkou medzi touto smernicou a prijatými vnútroštátnymi právnymi predpismi.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť tretí deň po jej uverejnení v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 25. apríla 2000

Za Komisiu

Margot WALLSTRÖM

členka Komisie

(*) Prijaté pred 26. úpravou.
(1) Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1.
(2) Ú. v. ES L 199, 30.7.1999, s. 57.
(3) Ú. v. ES L 358, 18.12.1986, s. 1.

PRÍLOHA I

„B.40. LEPTANIE KOŽE

1. **METODIKA**

1.1. **Úvod**

Dva *in vitro* testy na leptanie kože, skúška cezkožného elektrického odporu (TER) na potkanej koži a test s použitím modelu ľudskej pokožky, boli Európskym strediskom pre overovanie alternatívnych metód (ECVAM, Spoločné výskumné stredisko, Európska Komisia) schválené ako vedecky prijateľné (1) (2) (3). Overovacia štúdia ECVAM preukázala, že oba testy dokázali spoľahlivo odlíšiť známe látky leptajúce kožu od neleptajúcich látok. Okrem toho, testovací postup založený na modeli ľudskej pokožky umožnil správne rozlíšenie jednotlivých stupňov žieravých účinkov (známe látky silne leptajúce pokožku s označením špecifického rizika R35 a iné látky leptajúce pokožku s označením špecifického rizika R34) (2). Sú uvedené popisy a postupy pre oba testy; voľba testu závisí od konkrétnych požiadaviek a preferencií užívateľa.

Pozri tiež všeobecný úvod, časť B.

1.2. **Definície**

Leptanie kože: vznik nezvratného poškodenia kožného tkaniva po aplikácii testovaného materiálu.

1.3. **Referenčné látky**

Žiadne nie sú určené, ale pozri odseky 1.5.3.4 a 1.7.2.3.

1.4. **Princíp testovacej metódy — skúška TER na potkanej koži**

Testovaný materiál je aplikovaný na dobu až 24 hodín na epidermálny povrch kožných kotúčov, odobratých z kožušín mladých potkanov, usmrtených humánnym spôsobom. Žieraviny sa vyznačujú svojou schopnosťou spôsobiť stratu normálnej integrity a ochrannej funkcie rohovitej vrstvy, čo sa pri meraní prejavuje ako zníženie vnútornej TER pod prahovú úroveň (5 kΩ) (4) (5). Dráždivé a nedráždivé materiály neznižujú TER pod túto prahovú úroveň. Pre povrchovo aktívne látky a neutrálne organické látky (definícia pozri (6)) môže byť do testovacieho postupu zahrnutá skúška viazania farbiva na zníženie počtu falošných pozitívnych výsledkov získaných špeciálne pri týchto typoch chemikálií (2) (7).

1.5. **Popis testovacej metódy — skúška TER na potkanej koži**

1.5.1. *Zvieratá*

Na prípravu kožných kotúčov sú potrebné mladé (20-23 dní) potkany (Wistar alebo porovnateľné plemeno). Dorzálna a bočná srsť je opatrne odstránená malými zvieracími nožnicami. Zvieratá sa následne umyjú opatrným utieraním, pri súčasnom ponorení danej oblasti do antibiotického roztoku (obsahujúceho napríklad streptomycín, penicilín, chloramfenikol a amfotericín pri koncentráciách účinných pri potláčaní bakteriálneho rastu). Na tretí alebo štvrtý deň po prvom umytí sa zvieratá opäť umyjú antibiotikami a do 3 dní sa použijú (zvieratá na prípravu kože nesmú byť staršie ako 31 dní).

1.5.2. *Príprava kožných kotúčov*

Zvieratá sa usmrtia humánnym spôsobom. Následne sa odoberie dorzálna koža každého zvieraťa a opatrným šúchaním sa zbaví nadbytočného tuku. Kožou sa prekryje koniec polytetrafluoretylénovej (PTFE) trubice, pričom epidermálny povrch musí byť v kontakte s trubicou. Gumený tesniaci krúžok sa zatlačí na koniec trubice, aby držal kožu na mieste, a nadbytočné tkanivo sa odstrihne. Rozmery trubice a tesniaceho krúžku sú uvedené na obrázku 1. Gumený tesniaci krúžok sa následne vazelínou dôkladne utesní ku koncu PTFE trubice. Trubica je pružinovou svorkou pridržiavaná vo vnútri receptorovej komory, obsahujúcej roztok síranu horečnatého (154 mM) (obrázok 2).

1.5.3. *Testovací postup*

1.5.3.1. Aplikovanie test ovaného materiálu

Kvapalné testované látky (150 µl) sa aplikujú na epidermálny povrch vo vnútri trubice (obrázok 2). Pri testovaní tuhých materiálov sa na kožný kotúč aplikuje dostatočné množstvo tuhej látky, aby bol pokrytý celý povrch epidermy. Následne sa k tuhej látke pridá deionizovaná voda (150 µl) a trubicami je potrebné jemne zatriasť. Testované látky by mali mať s kožou maximálny kontakt. Pri niektorých tuhých látkach je možné to dosiahnuť zahriatím na 30 °C, aby sa testovaná látka roztopila, alebo rozdrvením, aby vznikol zrnitý materiál alebo prášok.

Pre každú testovanú látku sa použijú tri kožné kotúče. Testované látky sa aplikujú na 24 hodín (pozri tiež 1.5.3.4). Testovaná látka sa odstráni umytím prúdom vodovodnej vody do 30 °C, až kým nie je možné odstrániť žiaden ďalší materiál. Pri odstraňovaní testovaných látok, ktoré stuhli v trubici, je možné použiť prúd teplej vody približne 30 °C.

1.5.3.2. Merania TER

TER sa meria s použitím nízkonapäťového zariadenia využívajúceho striedavý prúd (napr. AIM 401 alebo 6401, alebo ekvivalentné). Pred meraním elektrického odporu sa povrchové napätie kože zníži pridaním dostatočného objemu 70 % etanolu tak, aby bola pokrytá celá epiderma. Po niekoľkých sekundách sa etanol odstráni obrátením trubice. Tkanivo sa následne hydratuje pridaním 3 ml roztoku síranu horečnatého (154 mM). Elektródy zariadenia sa umiestní na obe strany kožného kotúča s cieľom zmerania odporu v kΩ/kožný kotúč (obrázok 2). Rozmery elektród a dĺžka elektródy, umiestnená pod krokodílimi svorkami, sú uvedené na obrázku 1. Svorka vnútornej (hrubej) elektródy počas merania odporu spočíva na vrchu PTFE trubice, aby bolo zaistené, že do roztoku síranu horečnatého je ponorená stále rovnaká dĺžka elektródy. Vonkajšia (tenká) elektróda sa umiestni do vnútra receptorovej komory tak, aby spočívala na dne komory. Vzdialenosť medzi spodkom pružinovej svorky a spodkom PTFE trubice sa zachováva ako konštanta (obrázok 1), pretože vzdialenosť má vplyv na získané hodnoty odporu.

Je dôležité uvedomiť si, že ak je nameraná hodnota odporu vyššia ako 20 kΩ, môže to byť spôsobené povlakom testovanej látky na epidermálnom povrchu kožných kotúčov. Je možné pokúsiť sa odstrániť tento povlak napríklad utesnením PTFE trubice palcom chráneným rukavicou a pretrasením trubice asi na 10 sekúnd; roztok síranu horečnatého sa odstráni a meranie odporu sa opakuje s novým roztokom síranu horečnatého.

Stredné hodnoty výsledkov TER sú akceptované, ak zároveň platí, že pozitívne aj negatívne kontrolné hodnoty sú v prijateľnom rozpätí pre túto metódu. Odporúčané kontrolné látky a im prislúchajúce prijateľné rozpätie odporu pre popísanú metodológiu a prístrojový aparát sú nasledovné:

Kontrola	Látka	Rozpätie odporu (kΩ)
Pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková (36 %)	0,5-1,0
Negatívna	Destilovaná voda	10-25

1.5.3.3. Upravený postup pre povrchovoaktívne látky a neutrálne organickélátky

Ak hodnoty TER pre testované látky, ktoré sú povrchovo aktívne látky alebo neutrálne organické látky menšie alebo rovnajúce sa 5 kΩ, tkanivá je možné podrobiť skúške prenikania farbiva. Tento postup stanoví, či pozitívne výsledky sú falošné (2).

1.5.3.3.1. Aplikácia a odstránenie farbiva sulforodamín B

Po úvodnej úprave testovanou látkou sa na epidermálny povrch každého kožného kotúča na dobu 2 hodín aplikuje 150 µl 10 % (w/v) roztoku farbiva sulforodamín B v destilovanej vode. Kožné kotúče sa potom umyjú prúdom vodovodnej vody izbovej teploty alebo nižšej po dobu asi 10 sekúnd, aby sa odstránilo nadbytočné/nenaviazané farbivo. Každý kožný kotúč sa opatrne odoberie z PTFE trubice a umiestni sa do nádobky (napr. 20 ml sklenená scintilačná nádobka), obsahujúcej deionizovanú vodu (8 ml). Nádobky je potrebné opatrne pretriasť po dobu 5 minút, aby sa odstránilo akékoľvek ďalšie nadbytočné/nenaviazané farbivo. Tento premývací postup sa potom opakuje, kožné kotúče sa vyberú a umiestnia do nádobiek, obsahujúcich 5 ml 30 % (w/v) natrium dodecylsulfátu (SDS) v destilovanej vode a cez noc sa inkubujú pri teplote 60 °C. Po inkubácii sa každý kožný kotúč vyberie a odstráni a zostávajúci roztok sa na 8 minút umiestni do odstredivky pri teplote 21 °C (relatívna odstredivá sila ~ 175). Vzorka získaného kalu s objemom 1 ml sa zriedi v pomere 1: 5 (v/v) (napr. 1 ml + 4 ml) s 30 % (w/v) SDS v destilovanej vode. Pri približne 565 nm sa odmeria optická hustota (OD) roztoku.

1.5.3.3.2. Výpočet obsahu farbiva

Obsah farbiva sulforodamín B v kožnom kotúči sa vypočíta z hodnôt OD (molárny koeficient extinkcie farbiva sulforodamín B pri 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulová hmotnosť = 580). Obsah farbiva sulforodamín B sa určí pre každý kožný kotúč a následne sa pre replikáty vypočíta stredná hodnota obsahu farbiva. Stredné hodnoty výsledkov viazania farbiva sú akceptované, ak zároveň platí, že pozitívne aj negatívne kontrolné hodnoty spadajú do prijateľného rozpätia tejto metódy. Odporúčané prijateľné rozpätia obsahu farbiva pre kontrolné látky pre popísanú metodológiua prístrojové vybavenie je nasledovné:

Kontrola	Látka	Rozpätie obsahu farbiva (μg/kotúč)
Pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková (36 %)	40-100
Negatívna	destilovaná voda	15-35

1.5.3.4. Dodatočné informácie

Testované látky sa môžu aplikovať na kožné kotúče aj na kratší čas (napr. na dve hodiny), čím je možné odlíšiť silne žieravé materiály. V priebehu overovacej štúdie sa však vo viacerých prípadoch zistilo, že pri aplikácii testovaných chemikálií na kožné kotúče na dobu dvoch hodín výsledok skúšky TER nadhodnotil ich žieravosť (2), hoci po 24 hodinovej aplikácii test umožnil správne odlíšenie žieravých a nežieravých látok.

Vlastnosti a rozmery testovacieho prístroja a použitý experimentálny postup môžu mať vplyv na získané hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ na odlíšenie žieravín bola stanovená na základe údajov získaných konkrétnym špecifickým aparátom a postupom, ktoré sú popísané v tejto metóde. Pri podstatnej zmene testovacích podmienok môžu platiť iné prahové a kontrolné hodnoty. Preto sa odporúča metodológiu a prahovú hodnotu odporu kalibrovať otestovaním série referenčných štandardných látok z chemikálií použitých pri overovacej štúdii (3).

1.6. **Princíp testovacej metódy — skúška s modelom ľudskej pokožky**

Testovaný materiál je zvyčajne aplikovaný až na 4 hodiny na trojrozmernú vzorku ľudskej pokožky obsahujúcu rekonštruovanú epidermu s funkčnou rohovitou vrstvou. Žieraviny sa vyznačujú schopnosťou spôsobiť pokles životaschopnosti buniek (ktorá je určovaná napríklad skúškou redukcie MTT) pod definované prahové hodnoty pri stanovených dobách vystavenia. Princíp skúšky je v súlade s hypotézou, že žieravé chemikálie sú tie, ktoré sú schopné preniknúť rohovitou vrstvou (rozpustením alebo rozleptaním) a sú dostatočne cytotoxické, aby spôsobili odumretie buniek v podkladových vrstvách buniek.

1.7. **Popis testovacej metódy — skúška s modelom ľudskej pokožky**

1.7.1. *Vzorky ľudskej pokožky*

Vzorky ľudskej pokožky môžu pochádzať z rôznych zdrojov, musia ale spĺňať isté kritériá. Vzorka musí mať funkčnú rohovitú vrstvu s podkladovou vrstvou živých buniek. Ochranná funkcia rohovitej vrstvy musí byť primeraná. Toto je možné preukázať demonštrovaním odolnosti vzorky voči cytotoxicite po aplikovaní látok, o ktorých je známe, že sú voči bunkám cytotoxické, ale normálne nepreniknú rohovitou vrstvou. Musí sa preukázať, že pri definovaných experimentálnych podmienkach sa na vzorke dosahujú reprodukovateľné výsledky.

Životaschopnosť živých buniek vzorky musí byť dostatočne vysoká, aby bolo možné rozlíšiť pozitívne a negatívne kontrolné látky. Životaschopnosť buniek (meraná napríklad veľkosťou redukcie MTT, t. j. hodnotou OD) po expozícii negatívnou kontrolnou látkou musí byť v rámci prijateľného intervalu pre konkrétnu vzorku. Podobne hodnoty životaschopnosti buniek po expozícii pozitívnou kontrolnou látkou (relatívne k hodnotám pre negatívnu kontrolu) musia byť v rámci určeného intervalu. Najdôležitejším je, aby použitá predikčná vzorka preukázateľne vyhovovala medzinárodnému overovaciemu štandardu (2).

1.7.2. *Testovací postup*

1.7.2.1. *Aplikovanie testovaného materiálu*

Pri kvapalných materiáloch je nutné aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby bol pokrytý povrch kože (minimálne 25 μl/cm^2. Pri tuhých materiáloch sa musí aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby bola koža pokrytá a následne je potrebné testovanú látku navlhčiť, aby sa zaistil dobrý kontakt s kožou; kde je to vhodné, tuhé látky by sa mali pred aplikáciou rozomlieť na prášok. Musí sa preukázať, že metóda aplikácie je primeraná pre širokú škálu typov chemikálií (2). Po uplynutí doby expozície testovanou látkou sa testovaný materiál musí opatrne umyť z povrchu kože soľným roztokom.

1.7.2.2. Meranie životaschopnostibuniek

Na meranie životaschopnosti buniek sa môže použiť akákoľvek overená kvantitatívna metóda. Najpoužívanejšou skúškou je redukcia MTT, u ktorej sa v rôznych laboratóriách preukázalo, že poskytuje presné a reprodukovateľné výsledky (2). Kožný kotúč sa umiestni do roztoku MTT 0,3 mg/ml pri 20-28 °C na dobu 3 hodín. Zrazený modrý formazánový produkt sa potom extrahuje (extrakcia rozpúšťadlom) a koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením OD pri vlnovej dĺžke medzi 545 nm a 595 nm.

1.7.2.3. Dodatočné informácie

Použitá kožná vzorka a presná doba expozície a postupy umývania atď. budú mať zásadný dopad na výsledky životaschopnosti buniek. Odporúča sa metodológiu a predikčnú vzorku kalibrovať otestovaním série referenčných štandardných látok zvolených z chemikálií použitých pri overovacej štúdii ECVAM (3). Je rozhodujúce, aby sa preukázalo, že použitá metóda je v rámci laboratórií reprodukovateľná pre širokú škálu chemikálií v súlade s medzinárodnými normami. Metóda by minimálne mala vyhovovať kritériám pre uvedenú definíciu vedeckej prijateľnosti (2) a výsledky takejto overovacej štúdie sa musia uverejniť v odbornom časopise s odbornou revíziou.

2. **ÚDAJE**

2.1. **Spracovanie výsledkov**

2.1.1. *Skúška TER na potkanej koži*

Hodnoty odporu (kΩ) pre testovaný materiál, pozitívne a negatívne kontroly a akékoľvek štandardné referenčné chemikálie by sa mali zaznamenávať v tabuľkovej podobe, vrátane údajov pre replikáty/opakované experimenty, stredných hodnôt a odvodenej klasifikácie.

2.1.2. *Skúška so vzorkou ľudskej pokožky*

Hodnoty OD a vypočítané percentuálne údaje životaschopnosti buniek pre testovaný materiál, pozitívne a negatívne kontroly, a akékoľvek štandardné referenčné chemikálie, by sa mali zaznamenávať v tabuľkovej podobe, vrátane údajov pre replikáty/opakované experimenty, stredných hodnôt a odvodenej klasifikácie.

2.2. **Vyhodnocovanie a interpretácia výsledkov**

2.2.1. *Skúška TER na potkanej koži*

Ak získaná stredná hodnota TER pre testovanú látku je vyššia ako 5 kΩ, látka nie je žieravina. Ak hodnota TER sa rovná alebo je menšia ako 5 kΩ a testovaná látka nie je povrchovo aktívna látka alebo neutrálna organická látka, ide o žieravinu.

Pri povrchovo aktívnych látkach alebo neutrálnych organických látkach, pri ktorých sú získané hodnoty TER 5 kΩ a menšie, je možné uskutočniť skúšku prenikania farbiva. Ak stredný obsah farbiva v kožnom kotúči sa rovná alebo je väčší ako stredný obsah farbiva v kožnom kotúči pri súbežne vykonanej pozitívnej kontrole s 36 %-nou HCl, testovaná látka je skutočne pozitívna a teda je žieravá. Ak stredný obsah farbiva v kožnom kotúči je menší ako stredný obsah farbiva v kožnom kotúči pri súbežne vykonanej pozitívnej kontrole s 36 %-nou HCl, testovaná látka je falošne pozitívna a teda nie je žieravá.

2.2.2. *Skúška so vzorkou ľudskej pokožky*

Hodnota OD negatívnej kontroly predstavuje 100 % životaschopnosť buniek; teda hodnoty OD získané pre každú testovaciu vzorku je možné použiť na výpočet percentuálnej životaschopnosti vo vzťahu voči negatívnej kontrole. Hraničná percentuálna hodnota životaschopnosti buniek slúžiaca na odlíšenie žieravých testovaných materiálov od nežieravých (alebo na rozlíšenie medzi jednotlivými triedami žieravín) musí byť v predikčnej vzorke jasne definovaná pred overením metódy a následná overovacia štúdia musí preukázať, že táto hraničná hodnota je primeraná (2).

3. **VYKAZOVANIE VÝSLEDKOV**

Správa z testu

Správa z testu musí obsahovať aspoň nasledovné informácie:

Testovaná látka:

— identifikačné údaje, fyzikálna povaha a kde je to relevantné, fyzikálno-chemické vlastnosti. Podobné informácie by mali byť uvedené pre referenčné látky, ak sú použité.

Testovacie podmienky:

— podrobnosti o použitom testovacom postupe,

— popis a zdôvodnenie akýchkoľvek úprav.

Výsledky:

— tabuľkovo upravené hodnoty odporu (skúška TER) alebo percentuálne hodnoty životaschopnosti buniek (skúška so vzorkou ľudskej kože) pre testovaný materiál, pozitívne a negatívne kontroly a akékoľvek štandardné referenčné chemikálie, vrátane údajov pre replikáty/opakované experimenty a stredných hodnôt,

— popis akýchkoľvek iných pozorovaných účinkov.

Diskusia výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

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

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

(3) Barrat, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P. a Worth, A. P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals (Medzinárodná overovacia štúdia ECVAM pre *in vitro* testy leptania kože. 1. Výber a rozdelenie testovaných chemikálií), *Toxicology in Vitro* 12, s. 471-482.

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

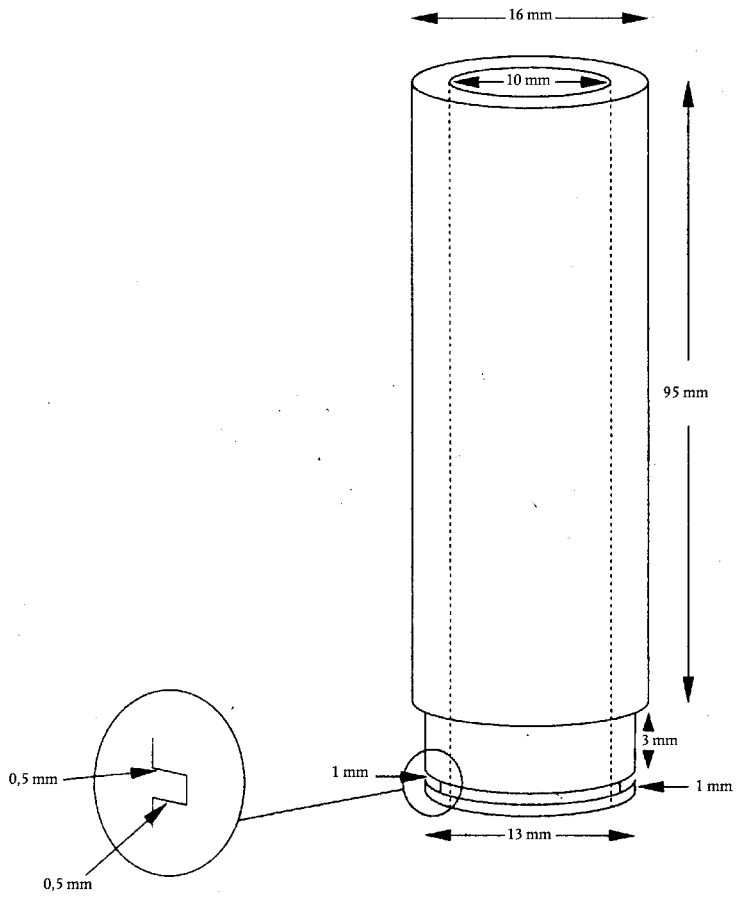
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. a Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial (Test leptania kože *in vitro*: výsledky medzilaboratórnej skúšky), *Toxicology in Vitro*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

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

(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barrat, 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. a Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6 (Predbežná overovacia štúdia *in vitro* testovania leptania kože. Správa a odporúčania seminára ECVAM 6), *ATLA* 23, s.219-255.

Figure 1

PTFE tube dimensions



Electrode dimensions

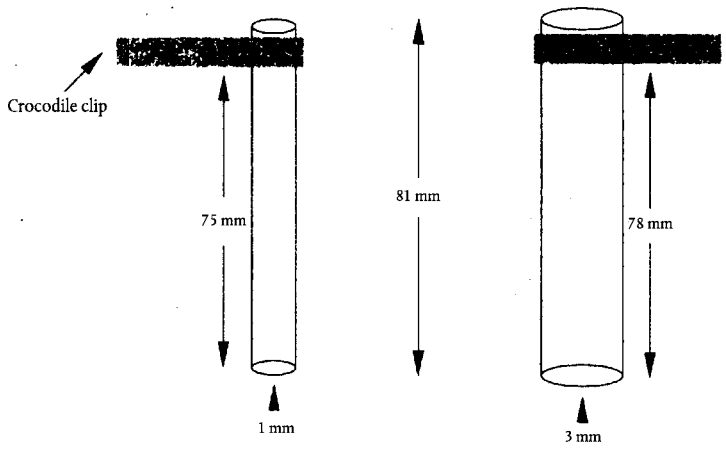
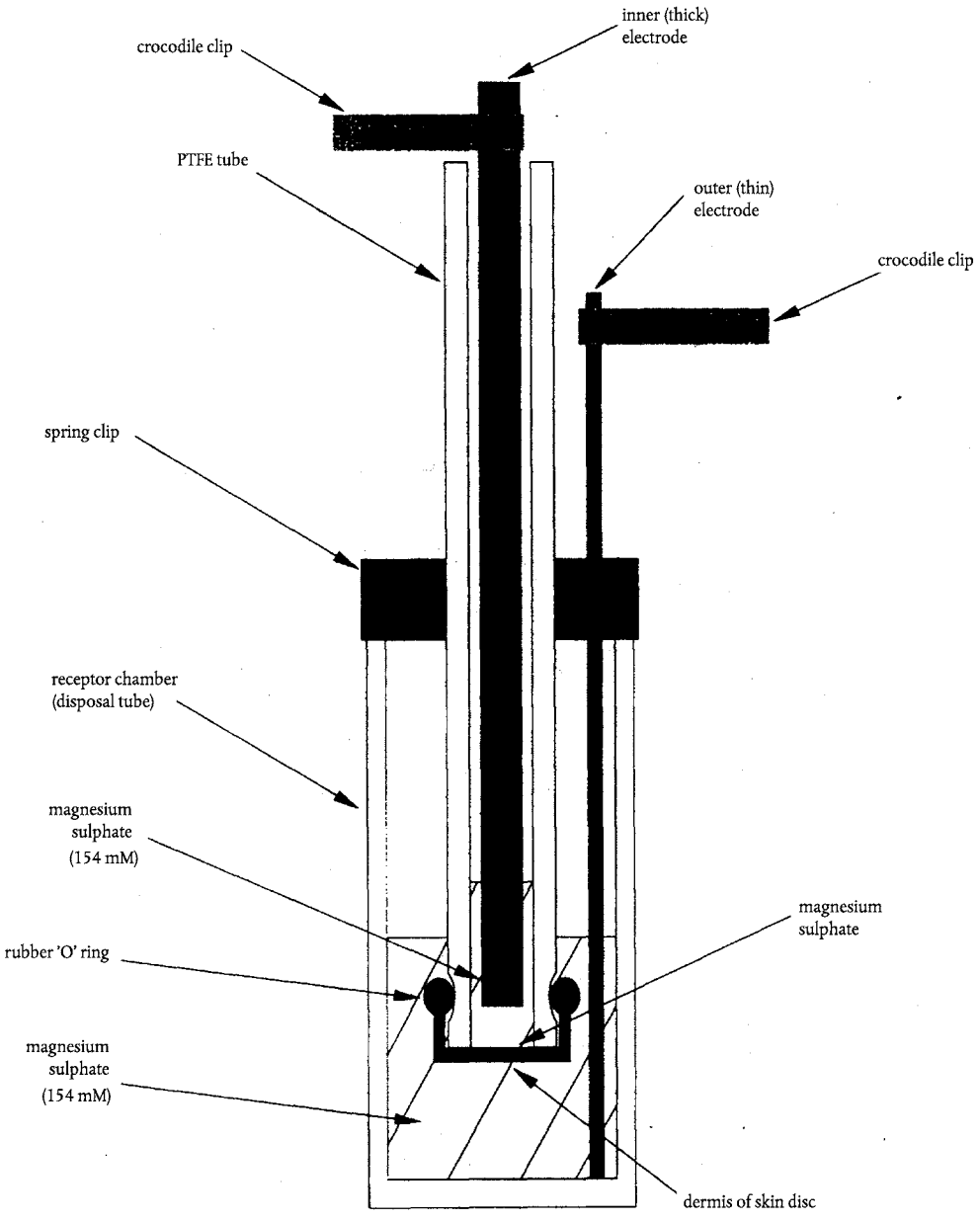


Figure 2

Apparatus for the rat skin TER assay



PRÍLOHA II

„B.41. FOTOTOXICITA –*IN VITRO* TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU

1. **METODIKA**

1.1. **Úvod**

Fototoxicita je definovaná ako toxická reakcia, ktorá je vyvolaná po prvom vystavení kože určitým chemikáliám a následnej expozícii svetla, alebo ktorá je podobným spôsobom vyvolaná ožiarením kože po systematickom podávaní chemikálie.

Informácie získané z *in vitro* testu fototoxicity 3T3 NRU slúžia na rozpoznanie fototoxického potenciálu testovanej látky, t. j. existencie alebo neprítomnosti možných nebezpečenstiev, ktoré testovaná látka pravdepodobne vyvolá v spojení s vystavením UV a viditeľnému svetlu.

Keďže toxikologickým výstupom tohto *in vitro* testu je určenie fotocytotoxicity, vyvolanej kombinovaným pôsobením chemikálie a svetla, testom je možné rozpoznať zlúčeniny, ktoré sú fototoxické in vivo po systematickej aplikácii a distribúcii do kože, ako aj zlúčeniny, ktoré sa správajú ako fotodráždivé látky po lokálnej aplikácii na kožu.

Tento *in vitro* test fototoxicity 3T3 NRU bol vyvinutý a overený v spoločnom projekte EU/COLIPA v rokoch 1992-1997 (1) (2) (3), s cieľom vytvoriť prijateľnú *in vitro* alternatívu k rôznym používaným *in vivo* testom. V roku 1996 seminár OECD odporučil na stanovovanie fototoxicity testovací prístup *in vitro* (4).

Výsledky z tohto *in vitro* testu fototoxicity 3T3 NRU boli porovnávané s akútnymi fototoxickými/fotodráždivými účinkami *in vivo* na zvieratách a ľuďoch a bolo preukázané, že test má výbornú predikčnú schopnosť pre tieto účinky. Test nie je určený na predikciu iných nepriaznivých účinkov, ktoré môžu byť vyvolané kombinovaným pôsobením chemikálie a svetla, napr. fotogenotoxicity, fotoalergie a fotokarcinogénnosti, hoci mnohé chemikálie, vyznačujúce sa týmito konkrétnymi vlastnosťami, budú v tomto *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU reagovať pozitívne. Okrem toho je potrebné uviesť, že tento test nie je určený na stanovovanie stupňa sily fototoxicity.

Sekvenčný prístup k testovaniu fototoxicity chemikálií je znázornený v dodatku.

1.2. **Definície**

Intenzita ožiarenia: intenzita ultrafialového (UV) alebo viditeľného svetla dopadajúceho na povrch, meraná vo W/m^2 alebo mW/cm^2.

Dávka svetla: množstvo (= intenzita × čas) ultrafialového (UV) alebo viditeľného žiarenia dopadajúceho na povrch, vyjadrené v jouloch (= W × s) na povrchovú plochu, napr. J/m^2 alebo J/cm^2.

Vlnové pásma UV svetla: vymedzenia odporúčané CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) sú nasledovné: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) a UVC (100 až 280 nm). Používajú sa aj iné vymedzenia: hranica medzi UVB a UVA sa často nachádza na 320 nm, a UVA je možné rozdeliť na UV-A1 a UV-A2 s hranicou približne na 340 nm.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorý meria celkovú aktivitu bunkovej populácie (napr. absorbovanie vitálneho farbiva neutrálna červeň do bunečných lyzozómov), ktorá v závislosti od meraného konečného výsledku a použitej úpravy testu je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom a/alebo vitálnosťou buniek.

Relatívna životaschopnosť buniek: životaschopnosť buniek, vyjadrená vo vzťahu k negatívnym kontrolám (rozpúšťadlo), ktoré boli robené počas celého testovacieho postupu (buď + UV alebo –UV), ale bez aplikovania testovanej chemikálie.

Predikčná vzorka: algoritmus, slúžiaci na prevod výsledkov testu toxicity do predikcie toxického potenciálu. Podľa testovacieho postupu, na prevod výsledkov tohto in vitro testu fototoxicity 3T3 NRU do predikcie fototoxického potenciálu je možné použiť PIF a MPE.

PIF (photo irritation factor — koeficient svetelnej dráždivosti): koeficient získaný porovnaním dvoch rovnako účinných cytotoxických koncentrácií (EC_{50}) testovanej chemikálie, zistených za neprítomnosti (-UV) a za prítomnosti (+ UV) necytotoxického ožiarenia UVA/viditeľným svetlom.

MPE (mean photo effect — stredný svetelný účinok): nová miera odvodená z matematickej analýzy úplného tvaru dvoch kriviek koncentrácia/účinok, získaných za neprítomnosti (-UV) a za prítomnosti (+ UV) necytotoxického ožiarenia UVA/viditeľným svetlom.

Fototoxicita: akútna toxická reakcia, ktorá je vyvolaná po prvej expozícii kože určitými chemikáliami a následnej expozícii svetlom, alebo ktorá je podobným spôsobom vyvolaná ožiarením kože po systematickom podávaní chemikálie.

Fotodráždivosť: podmnožina pojmu ‚fototoxicita', ktorá sa používa na označenie len tých fototoxických reakcií, ktoré vzniknú po expozícii chemikáliami (lokálne alebo orálne) na koži. Tieto fototoxické reakcie vždy vedú k nešpecifikovanému poškodeniu buniek (reakcie podobné spáleniu slnkom).

Fotoalergia: získaná imunologická reaktivita, ktorá sa neprejavuje po prvej expozícii chemikáliou a svetlom a pred možnou demonštráciou reaktivity kože je potrebná indukčná doba jeden alebo dva týždne.

Fotogenotoxicita: genotoxická reakcia pozorovaná s konečným genetickým výsledkom, ktorá je vyvolaná po expozícii buniek negenotoxickou dávkou UV/viditeľného svetla a negenotoxickou chemikáliou.

Fotokarcinogénnosť: karcinogénnosť, spôsobená opakovaným aplikovaním svetla a chemikálie. Výraz ‚foto ko-karcinogenéza' sa používa, ak tvorba nádoru vyvolaná UV žiarením je podporená chemikáliou.

1.3. **Referenčné látky**

Okrem pozitívnej kontrolnej chemikálie chlorpromazín, ktorá by sa mala súbežne testovať pri každej skúške, pri novom zavádzaní testu fototoxicity 3T3 NRU sa odporúča použiť ako referenčné chemikálie podmnožinu chemikálií použitých pri medzilaboratórnych skúškach tohto testu (1) (3) (13).

1.4. **Úvodné úvahy**

Fototoxické účinky boli zistené u mnohých typov chemikálií (5) (6) (7) (8). Jedinou spoločnou vlastnosťou je ich schopnosť absorbovať svetelnú energiu v oblasti slnečného svetla. Podľa prvého zákona fotochémie (Grotthaus-Draperov zákon) si fotoreakcia vyžaduje dostatočnú absorpciu svetelných kvánt. Teda pred prípadným pristúpením k biologickému testovaniu podľa tohto testovacieho postupu by sa malo určiť absorpčné spektrum UV/viditeľného svetla testovanej chemikálie (napr. podľa testovacieho postupu OECD č. 101). Ak molárny koeficient extinkcie/absorpcie činí menej ako 10 litrov × mol^{-1} × cm^{-1}, chemikália nemá fotoreaktívny potenciál a nie je potrebné ju testovať týmto *in vitro* testom fototoxicity 3T3 NRU, ani žiadnym iným biologickým testom na nepriaznivé fotochemické účinky (Dodatok).

1.5. **Princíp testovacej metódy**

Boli zistené štyri mechanizmy, prostredníctvom ktorých môže absorpcia svetla chromofórom (umelým) mať za následok fototoxickú reakciu (7). Všetky z nich majú za následok poškodenie buniek. Preto *in vitro* test fototoxicity 3T3 NRU je založený na porovnávaní cytotoxicity chemikálie pri otestovaní za prítomnosti a za neprítomnosti expozície necytotoxickou dávkou UVA/viditeľného svetla. Cytotoxicita je v tomto teste vyjadrená ako zníženie prenikania vitálneho farbiva neutrálna červeň (NR), v závislosti od koncentrácie testovanej chemikálie (9), 24 hodín po aplikovaní chemikálie a ožiarenia.

Bunky Balb/c 3T3 sa udržiavajú v kultúre po dobu 24 hodín, aby sa vytvorili monomolekulové vrstvy. Dve 96-otvorové doštičky na každú testovanú chemikáliu sa potom predinkubujú s ôsmimi rôznymi koncentráciami chemikálie po dobu jednej hodiny. Následne sa jedna z dvoch doštičiek vystaví necytotoxickej dávke UVA/viditeľného svetla 5 J/cm^2 UVA (+ experimentálne UV), zatiaľ čo druhá doštička je uchovávaná v tme (- experimentálne UV). Potom sa v oboch doštičkách testovacie médium nahradí kultivačným médiom a po ďalších 24 hodinách inkubácie sa stanoví životaschopnosť buniek prostredníctvom prenikania neutrálnej červene (neutral red uptake — NRU) po dobu 3 h Pre každú z ôsmich testovaných koncentrácií sa vypočíta relatívna životaschopnosť buniek vyjadrená ako percento negatívnych kontrol. Na predikciu fototoxického potenciálu je potrebné porovnať reakcie koncentrácií za prítomnosti (+ UV) a za neprítomnosti (-UV) ožiarenia, zvyčajne na úrovni EC_{50}, t. j. pri koncentrácii, ktorá znižuje životaschopnosť buniek o 50 % v porovnaní s kontrolnými vzorkami nevystavenými pôsobeniu chemikálie.

1.6. **Kvalitatívne kritériá**

UVA citlivosť buniek, historické údaje: mala by sa pravidelne kontrolovať citlivosť buniek voči UVA. Bunky sa nasadia v hustote, aká sa používa pri *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU, ďalší deň sa ožiaria UVA v dávkach 1-9 J/cm^2 a o deň neskôr sa určí životaschopnosť buniek s použitím skúšky NRU. Bunky spĺňajú kvalitatívne kritériá, ak ich životaschopnosť po ožiarení 5 J/cm^2 UVA nie je nižšia ako 80 % životaschopnosti kontrolných vzoriek v tme. Pri najvyššej dávke UVA 9 J/cm^2 by životaschopnosť nemala byť nižšia ako 50 % životaschopnosti kontrolných vzoriek v tme. Táto skúška by sa mala opakovať vždy asi po 10 prechodoch buniek.

UVA citlivosť negatívnych kontrolných buniek, bežný test: test spĺňa kvalitatívne kritériá, ak negatívne kontrolné bunky (bunky v Earlovom tlmivom soľnom roztoku (EBSS) s alebo bez 1 % dimetylsulfoxidu (DMSO) alebo 1 % etanolu (EtOH)) pri experimente + UVA nevykazujú životaschopnosť nižšiu ako 80 % životaschopnosti neožiarených buniek v rovnakom roztoku pri súbežnom experimente v tme (-UVA).

Životaschopnosť negatívnych kontrolných buniek: absolútna optická hustota ($OD_{540\ NRU}$) meraná v extrakte NR negatívnych kontrolných buniek ukazuje, či 1×10^4 buniek nasadených do každého otvoru rástlo s dvojnásobkom času počas dvoch dní skúšky. Test spĺňa akceptačné kritériá, ak stredná hodnota $OD_{540\ NRU}$ pre kontrolné bunky nevystavené pôsobeniu chemikálie, činí ≥ 0,2.

Pozitívna kontrola: súbežne s každým *in vitro* testom fototoxicity 3T3 NRU sa otestuje známa fototoxická chemikália. Pri overovacej štúdii EU/COLIPA sa ako pozitívna kontrolná látka použil chlorpromazín (CPZ), a preto sa odporúča jeho použitie. Pre CPZ testovaný *in vitro* testom fototoxicity 3T3 NRU pri štandardnom testovacom postupe boli stanovené nasledovné akceptačné kritériá: CPZ ožiarený (+ UVA): EC_{50} = 0,1 až 2,0 μg/ml, CPZ neožiarený (-UVA): EC_{50} = 7,0 až 90,0 μg/ml. Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF), t. j. posun EC_{50} by mal byť aspoň 6.

Pre súbežné pozitívne kontroly je namiesto CPZ možné použiť aj iné známe fototoxické chemikálie vhodné pre triedu chemikálie alebo charakteristiku rozpustnosti vyhodnocovanej testovacej chemikálie. V tomto prípade by sa na základe historických údajov mali primerane definovať rozpätia hodnôt EC_{50} a PIF alebo MPE (stredný svetelný účinok) ako akceptačné kritériá pre test.

1.7. **Popis testovacej metódy**

1.7.1. *Prípravy*

1.7.1.1. Bunky

Pri overovacej štúdii bola použitá permanentná bunková línia myšacích fibroblastov — Balb/c 3T3, klon 31 — buď z ATCC alebo ECACC a preto sa odporúča jeho použitie. Pri tom istom testovacom postupe je možné úspešne použiť aj iné bunky alebo bunkové línie, ak sú podmienky kultúry prispôsobené špecifickým potrebám buniek, je nutné ale preukázať ekvivalentnosť.

Bunky by mali byť pravidelne kontrolované na neprítomnosť mykoplazmovej kontaminácie a mali by byť použité len ak sú výsledky takejto kontroly uspokojivé.

Keďže UVA citlivosť buniek môže s počtom prechodom stúpnuť, vždy by mali byť použité bunky Balb/c 3T3 s najnižším možným počtom prechodov, podľa možnosti menším ako 100. Je dôležité pravidelne kontrolovať UVA citlivosť buniek Balb/c 3T3 podľa postupu kontroly kvality, popísaného v tejto smernici.

1.7.1.2. Médiáakultivačnépodmienky

Na rutinný prechod buniek a počas testovacieho postupu by sa mali použiť vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky. Pre bunky Balb/c 3T3 je to DMEM doplnené 10 % sérom z novonarodeného teľaťa, 4 mM glutamínom, penicilínom a streptomycínom; a zvlhčovaná inkubácia pri 37 °C/7,5 % CO_2. Zvlášť dôležité je, aby kultivačné podmienky zabezpečili dobu bunkového cyklu v rámci normálneho historického rozpätia pre použité bunky alebo bunkovú líniu.

1.7.1.3. Prípravakultúr

Bunky zo zmrazených zásob kultúr sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote a pred použitím v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU sa aspoň raz subkultivujú.

Na test fototoxicity sa bunky nasadia v kultivačnom médiu v takej hustote, že kultúry nedosiahnu zhluk do konca testu, t. j. do stanovenia životaschopnosti buniek 48 h po nasadení buniek. Pre bunky Balb/c 3T3 v 96-otvorových doštičkách sa odporúča hustota buniek 1×10^4 na každý otvor.

Pre každú testovanú chemikáliu sa bunky nasadia rovnakým spôsobom do dvoch samostatných 96-otvorových doštičiek, ktoré sa potom súbežne podrobia celému testovaciemu postupu za rovnakých kultivačných podmienok okrem časového úseku, keď jedna z doštičiek sa ožiari (+ UVA/viditeľné svetlo) a druhá sa uchováva v tme (-UVA/viditeľné svetlo).

1.7.1.4. Metabolickáaktivácia

Keďže používanie metabolizujúcich systémov je všeobecnou požiadavkou pre všetky *in vitro* testy na predikciu genotoxického a karcinogénneho potenciálu, v prípade fototoxikológie nie je zatiaľ známa chemikália, pri ktorej by bola potrebná metabolická premena na to, aby sa správala ako fototoxín *in vivo* alebo *in vitro*. Uskutočňovanie tohto testu so systémom metabolickej aktivácie sa teda nepovažuje za potrebné a nie je ani vedecky opodstatnené.

1.7.1.5. Testovanáchemikália/prípravok

Testované chemikálie musia byť čerstvo pripravené tesne pred použitím, s výnimkou prípadov, keď údaje o stabilite dokazujú prijateľnosť skladovania. Ak existuje pravdepodobnosť rýchlej fotodegradácie, je potrebná príprava pri červenom svetle.

Testované chemikálie by mali byť rozpustené v tlmivých soľných roztokoch, napríklad v Earlovom tlmivom soľnom roztoku (EBSS) alebo v tlmivom soľnom roztoku fosforečnanu (PBS), ktoré musia byť bez proteínových zložiek a indikátorových farbív na určenie pH absorbujúcich svetlo, aby sa predišlo interferencii počas ožarovania.

Testované chemikálie s obmedzenou rozpustnosťou vo vode by sa mali rozpustiť vo vhodných rozpúšťadlách pri 100-násobku požadovanej výslednej koncentrácie a potom zriediť v pomere 1:100 s tlmivým soľným roztokom. Ak sa použije rozpúšťadlo, musí byť prítomné vo všetkých kultúrach, t. j. v negatívnych kontrolách ako aj vo všetkých koncentráciách testovanej chemikálie v konštantnom objeme 1 % (v/v).

Odporúčané rozpúšťadlá sú dimetylsulfoxid (DMSO) a etanol (EtOH). Vhodné môžu byť aj iné rozpúšťadlá s nízkou cytotoxicitou (napr. acetón), dôsledne by sa však mali posúdiť ich špecifické vlastnosti, napr. reakcia s testovanou chemikáliou, tlmenie fototoxického účinku, zadržiavanie radikálov.

Na podporu rozpustnosti je v prípade potreby možné použiť vírivé miešanie a/alebo ultrazvukové vibrácie a/alebo zahriatie na 37 °C.

1.7.1.6. UVožarovanie/príprava

Svetelný zdroj: pri testovaní fototoxicity je najkritickejším faktorom výber vhodného svetelného zdroja a vhodného filtrovania. S fotosenzibilizáciou sa zvyčajne spájajú oblasti UVA a viditeľného svetla (7) (10), zatiaľ čo UVB má menší význam a je priamo vysoko cytotoxické, keď v oblasti 313 až 280 nm sa jeho cytotoxicita zvyšuje až 1 000-násobne (11). Kritériá na výber vhodného svetelného zdroja by mali obsahovať základnú požiadavku, že svetelný zdroj vysiela vlnové dĺžky absorbované testovacou chemikáliou, a že dávka svetla (dosiahnuteľná v priebehu primeraného časového úseku) by mala byť dostatočná na rozpoznanie známych fotosenzibilizátorov. Okrem toho, použité vlnové dĺžky a dávky by nemali byť príliš škodlivé pre testovaciu sústavu, čo zahŕňa aj vyžarovanie tepla (infračervená oblasť).

Za optimálny svetelný zdroj sa považuje simulácia slnečného svetla solárnymi simulátormi. V solárnych simulátoroch sa používajú xenónové oblúky i (legované) ortuťovo-kovové halogenidové oblúky. Posledné majú tú výhodu, že vyžarujú menej tepla a sú lacnejšie, avšak zhoda so slnečným svetlom nie je dokonalá. Keďže všetky solárne simulátory vyžarujú nezanedbateľné množstvá UVB, mali by sa vhodne filtrovať, aby tlmili vysoko cytotoxické vlnové dĺžky UVB.

Pri *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU by sa malo použiť spektrum žiarenia prakticky neobsahujúce UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Príklad rozdelenia spektra žiarenia filtrovaného solárneho simulátora použitého pri overovacej štúdii *in vitro* testu fototoxicity 3T3 NRU bol publikovaný (3).

Dozimetria: intenzita svetla (žiarenia) by sa mala pravidelne kontrolovať pred každým testom fototoxicity použitím vhodného širokopásmového UV-merača. Tento UV-merač musí byť kalibrovaný na príslušný zdroj. Fungovanie UV-merača by malo byť kontrolované, a na tento účel sa odporúča používanie druhého, referenčného UV-merača rovnakého typu a s rovnakou kalibráciou. V ideálnom prípade by sa v dlhších intervaloch mal na meranie spektrálneho žiarenia filtrovaného svetelného zdroja a na kontrolu kalibrácie širokopásmového UV-merača využívať spektrorádiometer, avšak takéto prístroje si vyžadujú odbornú obsluhu náležite vyškolenými osobami.

Pri overovacej štúdii bola dávka 5 J/cm^2 (UVA) určená ako necytotoxická pre bunky Balb/c 3T3, a dostatočne silná na vybudenie aj slabo fototoxických chemikálií. Na dosiahnutie 5 J/cm^2 v priebehu 50 minút musí byť žiarenie nastavené na 1,666 MW/cm^2. Pri použití inej bunkovej línie alebo iného svetelného zdroja môže byť potrebná dávka UVA mierne upravená pri dodržaní podmienky, že dávka nesmie byť škodlivá pre bunky a musí byť dostatočná na rozpoznanie štandardných fototoxínov. Doba expozície svetlom sa vypočíta nasledovným spôsobom:

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

1.7.2. *Testovacie podmienky*

Maximálna koncentrácia testovanej chemikálie by nemala prekročiť 100 μg/ml, nakoľko všetky fototoxické chemikálie boli rozpoznané pri nižších koncentráciách, zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách sa zvyšuje výskyt falošne pozitívnych výsledkov (nadhodnotených predpovedí) (13). Hodnota pH najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by mala byť uspokojivá (rozpätie pH: 6,5 — 7,8).

Rozpätie koncentrácií chemikálie testovanej za prítomnosti (+ UVA) a za neprítomnosti (-UVA) svetla, by sa malo vopred primerane stanoviť v predchádzajúcich experimentoch. Rozpätie postupnosti koncentrácií a skoky medzi jednotlivými koncentráciami sa upravia tak, aby krivky koncentrácia/účinok boli dostatočne podložené experimentálnymi údajmi. Mal by sa použiť geometrický rad koncentrácií (s konštantným koeficientom riedenia).

1.7.3. *Testovací postup* [1]

1.7.3.1. Prvýdeň

Pripravte bunkovú suspenziu 1×100^5 buniek/ml v kultivačnom médiu a nadávkujte po 100 µl kultivačného média len do okrajových otvorov 96-otvorovej mikrotitračnej doštičky na tkanivové kultúry (= slepé pokusy). Do zostávajúcich otvorov nadávkujte po 100 µl bunkovej suspenzie 1×10^5 buniek/ml (= 1×10^4 buniek/otvor). Pre každú testovanú chemikáliu pripravte dve doštičky: jednu na stanovenie cytotoxicity (-UVA), druhú na stanovenie fotocytotoxicity (+ UVA).

Inkubujte bunky po dobu 24 h (7,5 % CO_2, 37 °C), až kým nevytvoria polosplývajúcu monomolekulovú vrstvu. Táto doba inkubácia umožňuje obnovu buniek, ich adhéziu a exponenciálny rast.

1.7.3.2. Druhýdeň

Po inkubácii odlejte kultivačné médium z buniek a dvakrát omyte so 150 µl EBSS/PBS na každý otvor. Pridajte 100 µl EBSS/PBS obsahujúcich príslušnú koncentráciu testovanej chemikálie alebo len rozpúšťadlo (negatívna kontrola). Aplikujte osem rôznych koncentrácií testovanej chemikálie. Inkubujte bunky s testovanou chemikáliou v tme po dobu 60 minút (7,5 % CO_2, 37 °C).

Na uskutočnenie (+ UVA) časti skúšky ožarujte bunky s 1,7 MW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2 pri izbovej teplote po dobu 50 minút cez veko 96-otvorovej doštičky. Používajte ventilátor, aby sa zabránilo kondenzácii H_2O pod vekom. Druhú doštičku (-UVA) uchovajte pri izbovej teplote v tmavej škatuli po dobu 50 min. (= doba expozície UVA).

Odlejte testovaný roztok a dvakrát omyte so 150 µl EBSS/PBS. Nahraďte EBSS/PBS kultivačným médiom a inkubujte (7,5 % CO_2, 37 °C) cez noc (18-22 h).

1.7.3.3. Tretídeň

Mikroskopické vyhodnotenie

Preskúmajte bunky pod mikroskopom s fázovým kontrastom. Zaznamenajte zmeny v morfológii buniek vyvolané cytotoxickými účinkami testovanej chemikálie. Táto kontrola sa odporúča na vylúčenie experimentálnych chýb, ale tieto záznamy sa nepoužijú na vyhodnotenie cytotoxicity alebo fotocytotoxicity.

Test prenikania neutrálnej červene

Omyte bunky so 150 µl predhriateho EBSS/PBS. Odstráňte premývací roztok jemným poklepaním. Pridajte 100 µl média NR (neutrálna červeň) a inkubujte pri 37 °C vo zvlhčovanej atmosfére so 7,5 % CO_2 po dobu 3 h.

Po inkubácii odstráňte médium NR a omyte bunky so 150 µl EBSS/PBS. Odlejte a úplne vysajte EBSS/PBS. (Voliteľné: odstreďujte obrátenú doštičku).

Pridajte presne 150 µl roztoku desorbujúceho NR (čerstvo pripravený etanol/kyselina octová).

Prudko pretrepte mikrotitračnú doštičku na trepačke mikrotitračných doštičiek po dobu 10 min., až kým sa NR extrahuje z buniek a vytvorí homogénny roztok.

Zmerajte optickú hustotu extraktu NR pri 540 nm v spektrofotometri, s použitím slepých pokusov ako referenčných. Uchovajte údaje na neskoršiu analýzu vo vhodnom formáte súboru (napr. ASCII).

2. **ÚDAJE**

2.1. **Kvalita a kvantita údajov**

Údaje by mali umožňovať zmysluplný rozbor vzťahu koncentrácia/účinok, pozorovaného za prítomnosti a za neprítomnosti UVA/viditeľného žiarenia. Ak sa zistí cytotoxicita, rozpätie koncentrácií aj skoky medzi jednotlivými koncentráciami by sa mali zvoliť tak, aby umožňovali zostrojenie krivky na základe experimentálnych údajov. Vzhľadom na skutočnosť, že testovaná chemikália nemusí byť pri experimente za tmy (-UVA) až do stanovenej hraničnej koncentrácie 100 μg/ml cytotoxická, avšak po ožiarení (+ UVA) môže byť vysoko cytotoxická, rozpätia koncentrácií určených na otestovanie v oboch častiach experimentu sa možno budú musieť rádovo odlišovať, aby sa splnila požiadavka primeranej kvality údajov. Ak sa v oboch častiach pokusu (-UVA a + UVA) nezistí žiadna cytotoxicita, postačujúce je testovanie s veľkými skokmi medzi jednotlivými dávkami až po najvyššiu koncentráciu.

Overovanie jednoznačného pozitívneho výsledku opakovaným experimentom sa nevyžaduje. Nie je tiež potrebné overovať jednoznačné negatívne výsledky za predpokladu, že chemikália bola testovaná pri dostatočne vysokých koncentráciách.

V takýchto prípadoch je postačujúci jeden hlavný experiment podporený jedným alebo viacerými predbežnými experimentmi na určenie rozpätia.

Testy s hraničnými výsledkami v blízkosti hraničnej hodnoty predikčnej vzorky by sa mali pre overenie zopakovať.

Ak je potrebné opakované testovanie, zmena podmienok experimentu môže byť dôležitá na dosiahnutie jednoznačného výsledku.. Kľúčovou regulovateľnou veličinou v tomto teste je príprava roztokov testovanej chemikálie. Zmena týchto podmienok (pomocné rozpúšťadlo, rozdrvenie, ultrazvukové vibrácie) môže mať teda pri opakovaní testu najväčší význam. Alternatívou je prípadná zmena doby inkubácie pred ožiarením. Pre chemikálie nestále vo vode môže byť vhodná kratšia doba.

2.2. **Spracovanie výsledkov**

Ak je to možné, stanovuje sa koncentrácia testovanej chemikálie, spôsobujúca 50 % zníženie bunkového NRU (EC_{50}). To je možné docieliť použitím vhodného postupu nelineárnej regresie (prednostne Hillova funkcia alebo logaritmická regresia) s údajmi o vzťahu koncentrácia/účinok, alebo použitím iných štatistických postupov (14). Pred použitím EC_{50} v ďalších výpočtoch by sa mala kvalita súladu štatistických pozorovaní s príslušnými hodnotami primerane skontrolovať. Na výpočet EC_{50} je možné použiť aj grafické štatistické metódy. V takom prípade sa odporúča použitie pravdepodobnostného papiera (stupnica x: log, stupnica y: probit (= jednotka štatistickej pravdepodobnosti)), keďže v mnohých prípadoch funkcia reakcie na koncentráciu nadobúda po tejto transformácii takmer lineárnu podobu.

2.3. **Vyhodnocovanie výsledkov predikčných vzoriek**

2.3.1. *Predikčná vzorka, verzia 1: koeficient svetelnej dráždivosti (PIF)*

Po získaní oboch úplných kriviek vzťahu koncentrácia/účinok, teda za prítomnosti (+ UVA) a za neprítomnosti (-UVA) svetla, sa pomocou nasledovného vzorca vypočíta koeficient svetelnej dráždivosti (PIF):

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

Hodnota PIF < 5 naznačuje neprítomnosť fototoxického potenciálu, kdežto PIF ≥ 5 naznačuje jeho prítomnosť.

Ak je chemikália cytotoxická len pri teste + UVA a pri teste –UVA nie je cytotoxická, PIF nie je možné vypočítať, hoci takýto výsledok naznačuje fototoxický potenciál. V takýchto prípadoch je možné vypočítať hodnotu ‚> PIF'. Ak sa test cytotoxicity (-UV) robí až po najvyššiu testovanú koncentráciu (C_{max}), táto hodnota sa použije na výpočet ‚> PIF':

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

Ak je možné získať len hodnotu ‚> PIF', akákoľvek hodnota > 1 naznačuje fototoxický potenciál.

Ak ani jednu z hodnôt EC_{50} (-UV) a EC_{50} (+ UV) nie je možné vypočítať, nakoľko chemikália až do najvyššej testovanej koncentrácie nevykazuje žiadnu cytotoxicitu, naznačuje to neprítomnosť fototoxického potenciálu. V takýchto prípadoch sa na charakterizovanie výsledku použije formálna hodnota ‚PIF = *1':

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

Ak je možné získať len hodnotu ‚PIF = *1', naznačuje to neprítomnosť fototoxického potenciálu.

V prípadoch b) a c) by sa koncentrácie, dosiahnuté v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU, mali pri predpovedaní fototoxického potenciálu dôsledne vziať do úvahy.

2.3.2. *Predikčná vzorka, verzia 2: stredný svetelný účinok (MPE)*

Alternatívou je použitie novej verzie vzorky na predpoveď fototoxického potenciálu, ktorá bola vyvinutá s použitím údajov overovacej štúdie EU/COLIPA (15) a testovaná pri slepých pokusoch v následnej štúdii *in vitro* fototoxicity UV filtračných chemikálií (13). Táto vzorka prekonáva obmedzenie vzorky PIF v prípadoch, kde nie je možné získať EC_{50}. Vzorka používa ‚stredný svetelný účinok' (MPE), veličinu založenú na porovnaní úplných kriviek koncentrácia/účinok. Na aplikovanie vzorky MPE bol na Humboldtovej univerzite (Berlín) vyvinutý špeciálny počítačový software, ktorý je možné získať bezplatne.

2.4. **Interpretácia výsledkov**

Pozitívny výsledok v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU (PIF ≥ 5 alebo MPE ≥ 0,1) naznačuje, že testovaná látka má fototoxický potenciál. Ak sa tento výsledok získa pri koncentráciách menších ako 10 μg/ml, testovaná chemikália sa pravdepodobne bude správať ako fototoxín aj za rôznych podmienok ožiarenia *in vivo*. Ak sa pozitívny výsledok dosiahne len pri najvyššej testovanej koncentrácii 100 μg/ml, na posúdenie rizika alebo nebezpečnosti fototoxicity budú možno potrebné ďalšie informácie. Sem môžu spadať údaje o prenikaní, absorpcii a možnej akumulácii chemikálie v koži, alebo otestovanie chemikálie alternatívnym testom, napr. s použitím *in vitro* modelu ľudskej pokožky.

Negatívny výsledok v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU (PIF < 5 alebo MPE < 0,1) svedčí o tom, že testovaná látka nebola pri použitých podmienkach fototoxická pre kultivované bunky cicavca. V prípadoch, kde sa chemikália mohla testovať až do najvyššej koncentrácie 100 μg/ml, negatívny výsledok naznačuje, že chemikália nemá fototoxický potenciál, a fototoxicitu *in vivo* je možné pokladať za nepravdepodobnú. V prípadoch, kde boli pri nižších koncentráciách zistené totožné vzťahy medzi koncentráciou a toxicitou (EC_{50} +UV a EC_{50} –UV), bude interpretácia údajov rovnaká. Naopak, ak nebola preukázaná žiadna cytotoxicita (+ UV a –UV) a ak rozpustnosť vo vode obmedzila koncentrácie na hodnoty menšie ako 100 μg/ml, kompatibilita testovanej látky a tejto skúšky môže byť spochybniteľná a malo by sa zvážiť otestovanie na potvrdenie výsledku (napr. s použitím *in vitro* vzorky kože, alebo *ex vivo* vzorky kože, alebo testom *in vivo*).

3. **VYKAZOVANIE VÝSLEDKOV**

Správa z testu

Správa z testu musí obsahovať nasledovné informácie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje a číslo CAS, ak je známe,

— fyzikálna povaha a čistota,

— fyzikálnochemické vlastnosti, relevantné pre uskutočnenie štúdie,

— stabilita a fotostabilita, ak je známa.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— rozpustnosť testovanej chemikálie v tomto rozpúšťadle,

— percentuálny obsah rozpúšťadla v pôsobiacom médiu (EBSS alebo PBS).

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— počet prechodov buniek, ak je známy,

— UVA citlivosť buniek, stanovená ožarovacím vybavením, použitým v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU.

Testovacie podmienky a) — inkubácia pred a po expozícii chemikáliou:

— typ a zloženie kultivačného média,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2, teplota, vlhkosť),

— doba trvania inkubácie (predúprava, dodatočná úprava).

Testovacie podmienky b) — pôsobenie chemikálie:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií testovanej chemikálie, použitých za prítomnosti aj za neprítomnosti UV/viditeľného žiarenia,

— v prípade obmedzenej rozpustnosti testovanej chemikálie a neprítomnosti cytotoxicity, zdôvodnenie najvyššej testovanej koncentrácie,

— typ a zloženie testovacieho média (tlmivý soľný roztok),

— doba pôsobenia chemikálie.

Testovacie podmienky c) — ožiarenie:

— zdôvodnenie výberu použitého svetelného zdroja,

— spektrálna charakteristika žiarenia svetelného zdroja,

— transmisná/absorpčná charakteristika použitého filtra (filtrov),

— charakteristika rádiometra a podrobnosti o jeho kalibrácii,

— vzdialenosť svetelného zdroja od testovacej sústavy,

— ožiarenie UVA pri tejto vzdialenosti, vyjadrené v mW/cm^2,

— doba vystavenia UV/viditeľnému svetlu,

— dávka UVA (ožiarenie × čas), vyjadrená v J/cm^2,

— teplota bunkových kultúr počas ožarovania, a bunkových kultúr súbežne uchovávaných v tme.

Testovacie podmienky d) — test NRU:

— zloženie média NR,

— doba inkubácie NR,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2, teplota, vlhkosť),

— podmienky extrakcie NR (extrahovaná látka, doba trvania),

— vlnová dĺžka použitá na spektrofotometrické zistenie optickej hustoty NR,

— druhá vlnová dĺžka (referenčná), ak sa použije,

— slepý pokus spektrofotometra, ak sa použije.

Výsledky:

— hodnoty životaschopnosti buniek, zistené pri každej koncentrácii testovanej chemikálie, vyjadrené v percentách zo strednej životaschopnosti kontrolných buniek,

— krivky koncentrácia/účinok (koncentrácia testovanej chemikálie v závislosti od relatívnej životaschopnosti buniek), získané pri súbežných experimentoch (+ UVA) a (–UVA),

— rozbor údajov kriviek koncentrácia/účinok: ak je to možné, odhad/výpočet EC_{50} (+ UVA) a EC_{50} (-UVA),

— porovnanie oboch kriviek koncentrácia/účinok, získaných za prítomnosti a za neprítomnosti UVA/viditeľného žiarenia, buď vypočítaním koeficientu svetelnej dráždivosti (PIF), alebo vypočítaním stredného svetelného účinku (MPE),

— klasifikácia fototoxického potenciálu,

— akceptačné kritériá testu a) — súbežná negatívna kontrola:

  — absolútna životaschopnosť (optická hustota extraktu NR) ožiarených a neožiarených buniek,

  — historické údaje negatívnej kontroly, stredná hodnota a štandardná odchýlka.

— akceptačné kritériá testu b) — súbežná pozitívna kontrola:

  — EC_{50} (+ UVA) a EC_{50} (-UVA) a PIF pozitívnej kontrolnej chemikálie,

  — historické údaje pozitívnej kontrolnej chemikálie: EC_{50} (+ UVA) a EC_{50} (-UVA) a PIF, stredná hodnota a štandardná odchýlka

Diskusia výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

(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. a Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay (Projekt EHS/COLIPA v oblasti testovania fototoxicity *in vitro*: Prvé výsledky získané so skúškou fototoxicity na bunkách Balb/c 3T3), *Toxicology in Vitro* 8, s. 793-796.

(2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity) (Správa o vedeckej prijateľnosti testu 3T3 NRU PT (*in vitro* test na zisťovanie fototoxicity)), Európska Komisia, Spoločné výskumné stredisko: ECVAM a DGXI/E/2, 3. november 1997, *ATLA* 26, s. 7-8.

(3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. a Brantom, P. (1998), EU/COLIPA ‚*In vitro* phototoxicity' validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test (Overovacia štúdia EU/COLIPA ‚Fototoxicita *in vitro*', výsledky fázy II (slepá skúška), časť 1: test fototoxicity 3T3 NRU), *Toxicology in Vitro* 12, s. 305-327.

(4) Program OECD pre testovacie postupy, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods (Záverečná správa seminára OECD o harmonizácii overovania a akceptačných kritérií alternatívnych toxikologických testovacích metód), OECD Publications Office, Paríž, 1996.

(5) Lovell, W. W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergical potential (Postup pre *in vitro* skúmanie látok z hľadiska fotoalergického potenciálu, *Toxicology in Vitro* 7, s. 95-102.

(6) Santamaria, L. a Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, Research progress in organic, biological and medicinal chemistry (Zoznam fotodynamických látok, Napredovanie výskumu v oblasti organickej, biologickej a lekárskej chémie) zväzok 3, časť 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI-XXXV.

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

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

(9) Borenfreund, E. a Puerner, J. A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption (Stanovovanie toxicity *in vitro* pomocou morfologických zmien a absorpcie neutrálnej červene), *Toxicology Letters* 24, s. 119-124.

(10) Lambert, L. A., Warner, W. G. a Kornhauser, A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach (Živočíšne modely na testovanie fototoxicity, *Dermatotoxikológia*, redigované FN Marzullim a HI Maibachom), Taylor & Francis, Washington DC, 5. vydanie, s. 515-530.

(11) Tyrell, R. M. a 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 (Spektrá vplyvu na bunky ľudskej kože: odhady relatívnej cytotoxicity strednej ultrafialovej, blízkoultrafialovej a fialovej oblasti slnečného svetla na epidermálne keratínocyty), *Cancer Research* 47, s.1825-1829.

(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test (Štandardný pracovný postup: Test fototoxicity Balb/c 3T3 NRU), vypracované 23. decembra 1997 M. Liebschom a schválené 6. marca 1998 riadiacim tímom projektu EU/COLIPA ‚*In vitro* Photoirritation'.

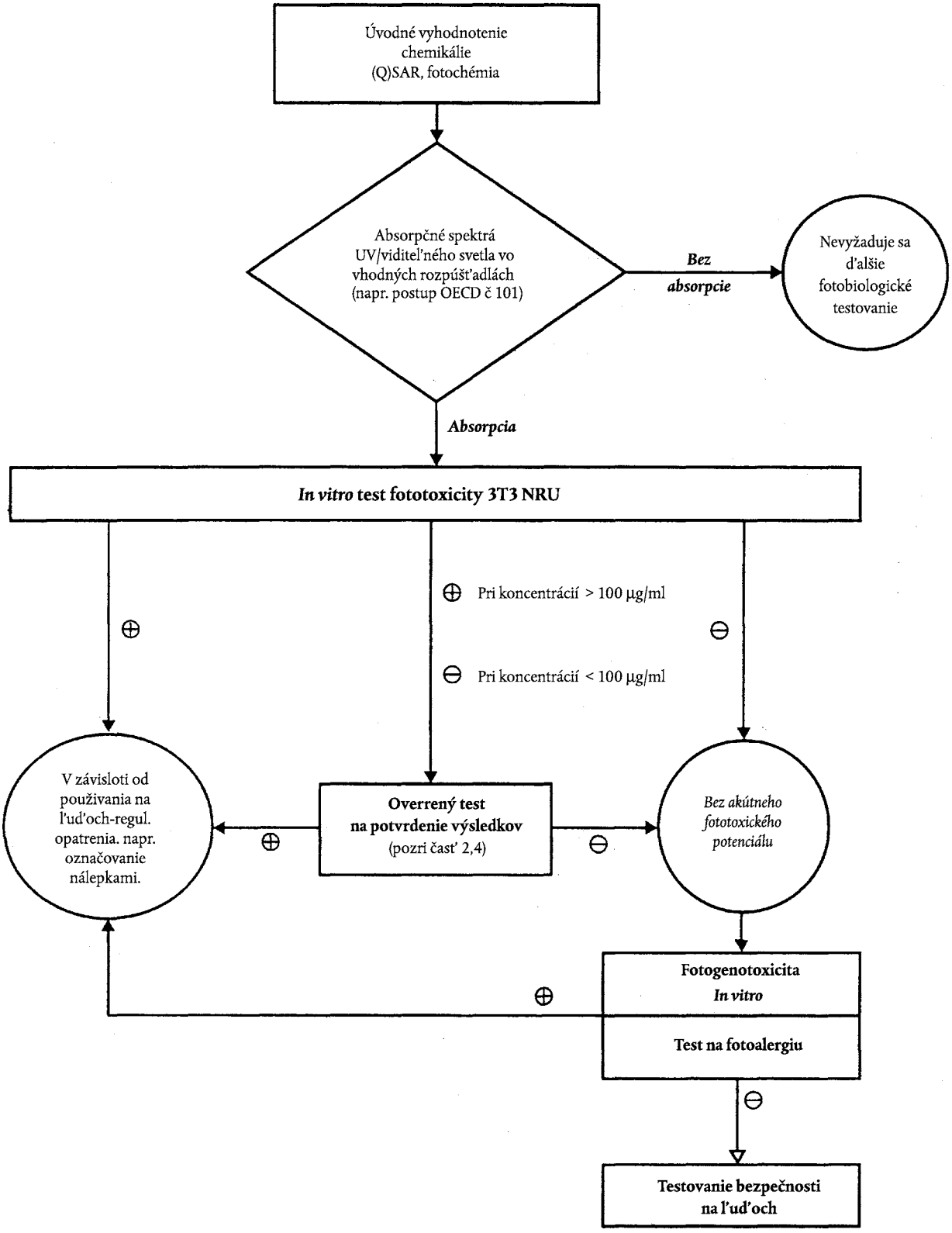
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. a Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In vitro* Phototoxicity Test (Štúdia o fototoxickom potenciále UV filtračných chemikálií z Prílohy VII smernice EU 76/768/EHS v *in vitro* teste fototoxicity 3T3 NRU), *ATLA* 26, s. 679-708.

(14) Holzhütter, H. G. a Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals (Matematické modelovanie reakcií buniek na externé podnety), *Journal of Biological Systems* 3, s. 127-138.

(15) Holzhütter, H. G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals (Všeobecná miera fototoxicity *in vitro*, odvodená z dvojíc kriviek dávka/účinok, a jej použitie na predikciu fototoxicity chemikálií *in vivo*), *ATLA* 25, s. 445-462.

PRÍLOHA II

Úloha testu fototoxicity 3T3 NTU v sekvenčnom prístupe k testovaniu fototoxicity chemikálií



(1) Prijaté pred 26. úpravou."