32000L0033

8.6.2000 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI L 136/90

DIREKTIVA KOMISIJE 2000/33/ES

z dne 25. aprila 2000

o 27. prilagoditvi direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi (*) tehničnemu napredku

(Besedilo velja za EGP)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 67/548/EGS z dne 27. junija 1967 o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Evropskega parlamenta in Sveta 1999/33/ES ([2]), in zlasti člena 28 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Priloga V k Direktivi 67/548/EGS določa metode za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti ter ekotoksičnosti snovi in pripravkov. To prilogo je treba prilagoditi tehničnemu napredku.

(2) V skladu s členom 7(2) Direktive Sveta 86/609/EGS z dne 24. novembra 1986 o približevanju zakonov in drugih predpisov držav članic o varstvu živali, ki se uporabljajo v poskusne in druge znanstvene namene ([3]), se poskus, v katerem se uporabljajo živali, ne opravi, če je na voljo kaka druga znanstveno zadovoljiva, smiselna in praktična metoda za pridobitev iskanega rezultata.

(3) Komisija namerava vključiti v Prilogo V k Direktivi 67/548/EGS nekatere alternativne preskusne metode, pri katerih se živali ne uporabljajo, da bi bile na voljo za preskušanje kemikalij v skladu s členom 3(1) Direktive 67/548/EGS.

(4) Ukrepi, predvideni s to direktivo, so v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje tehničnemu napredku direktiv o odpravi tehničnih ovir pri trgovanju z nevarnimi snovmi in pripravki –

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Besedila iz prilog I in II k tej direktivi se dodajo delu B Priloge V k Direktivi 67/548/EGS.

Člen 2

1. Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. oktobra 2001. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklicevanje nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

2. Države članice predložijo Komisiji besedila temeljnih predpisov nacionalne zakonodaje, sprejetih na področju, ki ga ureja ta direktiva, ter tabelo skladnosti med to direktivo in sprejetimi nacionalnimi predpisi.

Člen 3

Ta direktiva začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 25. aprila 2000

Za Komisijo

Margot WALLSTRÖM

Članica Komisije

(*) Sprejeta pred 26. prilagoditvijo.
([1]) UL 196, 16.8.1967, str. 1.
([2]) UL L 199, 30.7.1999, str. 57.
([3]) UL L 358, 18.12.1986, str. 1.

PRILOGA I

„B.40 JEDKOST ZA KOŽO

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Skupni raziskovalni center, Evropska Komisija, je kot znanstveno veljavna uvedel dva preskusa jedkosti za kožo *in vitro*, in sicer preskus transkutane električne upornosti (TER) na podganji koži in preskus, pri katerem je uporabljen model človeške kože (1) (2) (3). Validacijska študija ECVAM je pokazala, da je z obema preskusoma možno zanesljivo razlikovati med znanimi jedkovinami in kemikalijami, ki niso jedke. Nadalje je preskus na podlagi modela človeške kože omogočil pravilno razlikovanje različnih stopenj jedkega učinkovanja (znana močno jedka sredstva, R35 in druga jedka sredstva, R34) (2). Opis in postopki za oba preskusa so navedeni; izbira preskusa je odvisna od posebnih zahtev in prednostne izbire uporabnika.

Glej tudi del B splošnega uvoda.

1.2 **Opredelitev pojmov**

Jedkost za kožo: nastanek nepovratnih poškodb kožnega tkiva po nanosu preskušanega materiala.

1.3 **Referenčne snovi**

Niso določene, vendar glej točki 1.5.3.4 in 1.7.2.3.

1.4 **Načelo preskusne metode — preskus TER na podganji koži**

Preskušani material se nanese za največ 24 ur na epidermalne površine kožnih ploščic, odvzetih iz neustrojene kože mladih, humano usmrčenih podgan. Jedki materiali se identificirajo glede na zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice, ki se meri kot znižanje notranjega TER pod raven praga (5 kΩ) (4) (5). Dražilni in nedražilni materiali ne znižajo TER pod raven praga. Pri preskušanju površinsko aktivnih snovi in nevtralnih organskih snovi (za opredelitev glej navedbo literature pod številko (6)) je mogoče v postopek preskušanja vključiti vezavo barvila, da se zmanjša število napačno pozitivnih rezultatov, pridobljenih posebej s temi vrstami kemikalij (2) (7).

1.5 **Opis preskusne metode — preskus TER na podganji koži**

1.5.1 *Živali*

Za pripravo kožnih ploščic se zahtevajo mlade (20-23 dni stare) podgane (wistar ali podobne pasme). Dlaka na hrbtu in bokih se previdno odstrani z majhnimi škarjami za striženje živali. Živali se nato s pazljivim brisanjem umijejo, površina pa se potopi v antibiotično raztopino (ki denimo vsebuje streptomicin, penicilin, kloramfenikol in amfotericin v koncentracijah, ki učinkovito preprečujejo rast bakterij). Živali se z antibiotično raztopino ponovno umijejo tretji ali četrti dan po prvem umivanju, uporabijo pa se v 3 dneh (za pripravo kože živali ne smejo biti starejše od 31 dni).

1.5.2 *Priprava kožnih ploščic*

Živali se humano usmrtijo. Hrbtna koža vsake posamezne živali se nato odstrani in z nje previdno odlušči vsa odvečna maščoba. Koža se nato namesti čez konec politetrafluoroetilenske (PTFE) cevi, pri čemer se mora površina pokožnice dotikati cevi. Čez konec cevi se tesno namesti gumijast obroč, s katerim se koža pričvrsti, nato se obreže odvečno tkivo. Mere cevi in obroča so prikazane na sliki 1. Gumijasti obroč se nato z naravnim vazelinom pazljivo pritesni na konec cevi PTFE. Cev se s pomočjo vzmetne sponke namesti v receptorsko komoro, ki vsebuje raztopino magnezijevega sulfata (154 mM) (Slika 2).

1.5.3 *Preskusni postopek*

1.5.3.1 Nanos preskušanega materiala

Tekoče preskušane snovi (150 µl) se nanesejo na površino pokožnice v cevi (Slika 2). Pri preskušanju trdnega materiala se na kožno ploščico nanese dovolj trdne snovi, da se zagotovi, da je prekrita celotna površina pokožnice. Nato se na trdno snov doda deionizirana voda (150 µl), cevi pa se rahlo pretresejo. Preskušana snov mora biti v kar največjem možnem stiku s kožo. Pri nekaterih trdnih snoveh je to mogoče doseči s segrevanjem do 30 °C, da se preskušana snov stali, ali z mletjem, da nastane granulat ali prašek.

Za vsako preskušano snov se uporabijo tri kožne ploščice. Snovi ostanejo na koži 24 ur (glej tudi 1.5.3.4). Preskušana snov se odstrani tako, da se spira s curkom tekoče vode, ki ima do 30 °C, dokler ni mogoče odstraniti nič več materiala. Pri odstranjevanju preskušane snovi, ki se je strdila v cevi, si je mogoče pomagati s curkom tople vode pri približno 30 °C.

1.5.3.2 Meritve TER

TER se meri s pomočjo merilnega mostiča nizke napetosti in izmeničnega toka (npr. AIM 401 ali 6401 ali enakovreden). Pred merjenjem električnega upora se površinska napetost kože zmanjša, tako da se doda zadostna količina 70 % etanola, da prekrije pokožnico. Po nekaj sekundah se etanol odstrani, tako da se cev obrne, tkivo pa se nato navlaži s 3 ml raztopine magnezijevega sulfata (154 mM). Za merjenje upora v kΩ/kožno ploščico se elektrode merilnega mostiča namestijo na vsako stran kožne ploščice (slika 2). Mere elektrod in dolžina elektrode pod krokodilsko sponko so navedene na sliki 1. Sponka notranje (debele) elektrode med merjenjem upora leži na vrhu cevi PTFE, s čimer se zagotovi, da je v raztopino magnezijevega sulfata ves čas potopljena enaka dolžina elektrode. Zunanja (tenka) elektroda je v receptorski komori, in sicer se dotika njenega dna. Razdalja med spodnjim koncem vzmetne sponke in dnom cevi PTFE je konstantna (Slika 1), saj ta razdalja vpliva na dobljeno vrednost upora.

Če je vrednost izmerjenega upora večja od 20 kΩ, je to morda posledica tega, da preskušana snov prekriva površino pokožnice kožne ploščice. Za odstranitev te plasti se lahko na primer začepi cev PTFE z orokavičenim palcem in jo stresa približno 10 sekund; raztopina magnezijevega sulfata se zavrže, merjenje upora pa se ponovi s svežim magnezijevim sulfatom.

Povprečni rezultati TER se sprejmejo pod pogojem, da so vrednosti istočasne pozitivne in negativne kontrole v mejah sprejemljivosti za to metodo. Predlagane kontrolne snovi in njihove pripadajoče sprejemljive meje upora za opisano metodologijo in napravo so naslednje:

Kontrola	Snov	Meje upora (kΩ)
Pozitivno	10 M klorovodikova kislina (36 %)	0,5-1,0
Negativno	Destilirana voda	10-25

1.5.3.3 Spremenjeni postopek za površinsko aktivne snovi in nevtralne organske snovi

Če so vrednosti TER pri preskušanih snoveh, ki so bodisi površinsko aktivne snovi bodisi nevtralne organske snovi, manjše ali enake 5 kΩ, je mogoče na tkivih opraviti oceno penetracije barvila. Ta postopek bo pokazal, ali so rezultati napačno pozitivni (2).

1.5.3.3.1 Nanos in odstranitev barvila sulforhodamin B

Po začetni obdelavi s preskušano snovjo se na površino pokožnice vsake kožne ploščice za 2 uri nanese 150 µl 10 % (ut./vol.) raztopine barvila sulforhodamin B v destilirani vodi. Kožne ploščice se nato približno 10 sekund spirajo s tekočo vodo pri največ sobni temperaturi, da se odstrani morebitno odvečno/nevezano barvilo. Vsaka kožna ploščica se pazljivo odstrani iz cevi PTFE in se prenese v vialo (npr. 20 ml stekleničko za scintilacijsko tekočino), ki vsebuje deionizirano vodo (8 ml). Viale se 5 minut rahlo stresajo, da se odstrani še preostalo odvečno/nevezano barvilo. Postopek izpiranja se ponovi, nato pa se kožne ploščice odstranijo in prenesejo v viale, ki vsebujejo 5 ml 30 % (ut./vol.) natrijevega dodecil sulfata (SDS) v destilirani vodi in se v inkubatorju čez noč shranijo pri 60 °C. Po inkubaciji se vse kožne ploščice odstranijo in zavržejo, preostala raztopina pa se 8 minut centrifugira pri 21 °C (relativna centrifugalna sila ˜ 175). Vzorec supernatanta v količini 1 ml se nato razredči 1 proti 5 (vol./vol.) (tj. 1 ml + 4 ml) s 30 % (ut./vol.) SDS v destilirani vodi. Optična gostota (OD) raztopine se meri pri približno 565 nm.

1.5.3.3.2 Izračun vsebnosti barvila

Vsebnost barvila sulforhodamin B v ploščici se izračuna iz vrednosti OD (koeficient molarne ekstinkcije barvila sulforhodamin B pri 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molska masa = 580). Vsebnost barvila sulforhodamin B se določi za vsako kožno ploščico, nato pa se izračuna srednja vrednost vsebnosti barvila za ponovitve. Povprečni rezultati vezanja barvila se sprejmejo pod pogojem, da so vrednosti istočasne kontrole v mejah sprejemljivosti za metodo. Predlagane sprejemljive meje vsebnosti barvila za kontrolne snovi za opisano metodologijo in napravo so naslednje:

Kontrola	Snov	Meje vsebnosti barvila (μg/košček)
Pozitivno	10 M klorovodikova kislina (36 %)	40-100
Negativno	Destilirana voda	15-35

1.5.3.4 Dodatne informacije

Preskušane snovi je mogoče nanesti na kožne ploščice tudi za krajši čas (npr. 2 uri), da se identificirajo močno jedki materiali. Vendar se je v validacijski študiji izkazalo, da preskus TER po dvournem nanosu na kožne ploščice (2) precenjuje jedki potencial več preskušanih kemikalij, medtem ko je po 24-urnem nanosu omogočil pravilno identifikacijo jedkih sredstev in sredstev, ki niso jedka.

Lastnosti in mere preskusne naprave in uporabljenega poskusnega postopka lahko vplivajo na pridobljene vrednosti TER. Prag za jedkost 5 kΩ je bil ugotovljen na podlagi podatkov, pridobljenih s posebnimi napravami in postopki, opisanimi v tej metodi. Če se preskusni pogoji bistveno spremenijo, se lahko uporabijo različni pragovi in kontrolne vrednosti. Zaradi tega je priporočljivo, da se metodologija in prag upora umerjata s preskušanjem vrste referenčnih standardov, ki se izberejo izmed kemikalij, uporabljenih v validacijski študiji (3).

1.6 **Načelo preskusne metode — preskus z modelom človeške kože**

Preskušani material se največ za 4 ure površinsko nanese na tridimenzionalni model človeške kože, ki obsega rekonstruirano pokožnico s funkcionalno rožen plastjo. Jedki materiali se identificirajo glede na sposobnost, da v specifičnem času izpostavljenosti zmanjšajo sposobnost celic za življenje — viabilnost (ki se določi npr. z uporabo preskusa zmanjševanja MTT) pod opredeljene pragove. Načelo preskusa je skladno s hipotezo, da so jedke kemikalije tiste, ki lahko prodrejo v rožen plast (z difuzijo ali erozijo) in so dovolj citotoksične, da povzročijo odmiranje celic v spodaj ležečih slojih celic.

1.7 **Opis preskusne metode — preskus z modelom človeške kože**

1.7.1 *Modeli človeške kože*

Modeli človeške kože sicer lahko izvirajo iz različnih virov, vendar morajo izpolnjevati nekatera merila. Model mora imeti funkcionalno rožen plast s spodaj ležečim slojem živih celic. Pregradna funkcija rožene plasti mora biti zadostna. To se lahko pokaže, tako da se prikaže odpornost modela na citotoksičnost po nanosu snovi, za katere je znano, da so citotoksične za celice, vendar pa običajno ne prodrejo skozi rožen plast. Model mora dati pri opredeljenih pogojih preskusa ponovljive rezultate.

Viabilnost živih celic v modelu mora biti dovolj visoka, da je mogoče dobro razlikovati med pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi snovmi. Viabilnost celic (npr. izmerjena s količino zmanjšanja MTT, tj. vrednostjo OD) po izpostavljenosti negativni kontrolni snovi mora biti v mejah sprejemljivosti za posamezni model. Podobno morajo biti vrednosti viabilnosti celic s pozitivno kontrolno snovjo (v primerjavi z vrednostmi za negativno kontrolo) v opredeljenih mejah sprejemljivosti. Najpomembneje pa je, da mora uporabljeni model za napovedovanje ustrezati mednarodnemu validacijskemu standardu (2).

1.7.2 *Preskusni postopek*

1.7.2.1 Nanos preskušanega materiala

Pri tekočih materialih je treba nanesti dovolj preskušane snovi, da se prekrije površina kože (najmanj 25 μl/cm^2. Pri trdnih materialih je treba nanesti dovolj preskušane snovi, da se prekrije koža, nato pa je treba snov navlažiti, da se zagotovi dober stik s kožo; kadar je primerno, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v prašek. Metoda nanašanja mora biti primerna za širok razpon vrst kemikalij (2). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskušani material skrbno izmiti s površine kože z raztopino soli.

1.7.2.2 Meritve viabilnosti celic

Za merjenje viabilnosti celic je možno uporabiti katero koli kvantitativno, validirano metodo. Najpogosteje uporabljeni preskus je zmanjšanje MTT, za katerega se je v več laboratorijih izkazalo, da daje natančne in ponovljive rezultate (2). Kožna ploščica se za 3 ure položi v raztopino 0,3 mg MTT/ml pri 20-28 °C. Oborina modrega formazana se nato ekstrahira (ekstrakcija topila), koncentracija formazana pa se izmeri tako, da se določi vrednost OD pri valovni dolžini med 545 in 595 nm.

1.7.2.3 Dodatne informacije

Uporabljeni model kože in natančni protokol glede časa izpostavljenosti, postopkov umivanja, itd. bodo imeli velik učinek na rezultate preskusa viabilnosti celic. Priporočljivo je, da se metodologija in model za napovedovanje umerjata s preskušanjem vrste referenčnih standardov, izbranih izmed kemikalij, uporabljenih v validacijski študiji ECVAM (3). Odločilnega pomena je, da je uporabljena metoda ponovljiva v istem laboratoriju in v drugih laboratorijih za širok spekter kemikalij, in sicer v skladu z mednarodnimi standardi. Metoda mora izpolnjevati najmanj merila za predhodno opredeljeno znanstveno veljavnost (2), rezultati takšne validacijske študije pa morajo biti objavljeni v recenzirani znanstveni publikaciji.

2. PODATKI

2.1 Obdelava rezultatov

2.1.1 *Preskus TER na podganji koži*

Vrednosti upora (kΩ) za preskušani material, pozitivne in negativne kontrole ter vse standardne referenčne kemikalije, vključno s podatki o ponovljenih poskusih, srednjih vrednostih in iz njih izpeljanih razvrstitvah, je treba prikazati v obliki razpredelnice.

2.1.2 *Preskus z modelom človeške kože*

Podatki o vrednosti OD in izračunanih odstotnih vrednostih viabilnosti celic za preskušano snov, pozitivne in negativne kontrole ter vse standardne referenčne kemikalije, vključno s podatki o ponovljenih poskusih, srednjih vrednostih in iz njih izpeljanih razvrstitvah, je treba prikazati v obliki razpredelnice.

2.2 Vrednotenje in razlaga rezultatov

2.2.1 *Preskus TER na podganji koži*

Če je srednja vrednost TER, dobljena za preskušano snov, večja od 5 kΩ, snov ni jedka. Če je vrednost TER manjša ali enaka 5 kΩ, preskušana snov pa ni površinsko aktivna snov ali nevtralna organska snov, potem je snov jedka.

Za površinsko aktivne snovi ali nevtralne organske snovi, katerih vrednosti TER so manjše ali enake 5 kΩ, se lahko izvede preskus penetracije barvila. Če je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici enaka ali večja od istočasno določene srednje vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole s 36 % HCl, potem je preskušana snov pravilno pozitivna in je torej jedka. Če je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici manjša od istočasno določene srednje vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole s 36 % HCl, potem je preskušana snov napačno pozitivna in torej ni jedka.

2.2.2 *Preskus z modelom človeške kože*

Vrednost OD negativne kontrole predstavlja 100 % viabilnost celic; torej se lahko vrednosti OD, pridobljene za vsak preskušani vzorec, uporabijo za izračun odstotne viabilnosti celic v primerjavi z negativno kontrolo. Mejna vrednost odstotne viabilnosti celic, ki se uporablja za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskušanimi materiali (ali za razlikovanje med različnimi razredi jedkega učinkovanja), mora biti v modelu za napovedovanje natančno opredeljena, še preden se metoda validira, naknadna validacijska študija pa mora potrditi ustreznost te mejne vrednosti (2).

3. POROČANJE

Poročilo o preskusu

Poročilo o preskusu mora vključevati vsaj naslednje informacije:

Preskušana snov:

— identifikacijski podatki, fizikalne lastnosti in, kadar je pomembno, fizikalno-kemijske lastnosti. Podobne informacije je treba zagotoviti tudi za referenčne snovi, če se uporabijo.

Preskusni pogoji:

— podrobni podatki o uporabljenem preskusnem postopku,

— opis in utemeljitev morebitnih sprememb.

Rezultati:

— tabelarni prikaz vrednosti upora (preskus TER) ali vrednosti odstotne viabilnosti celic (preskus z modelom človeške kože) za preskušani material, pozitivne in negativne kontrole ter vse standardne referenčne kemikalije, vključno s podatki o ponovljenih poskusih in srednjih vrednostih,

— opis kakršnih koli drugih opaženih učinkov.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **LITERATURA**

(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.

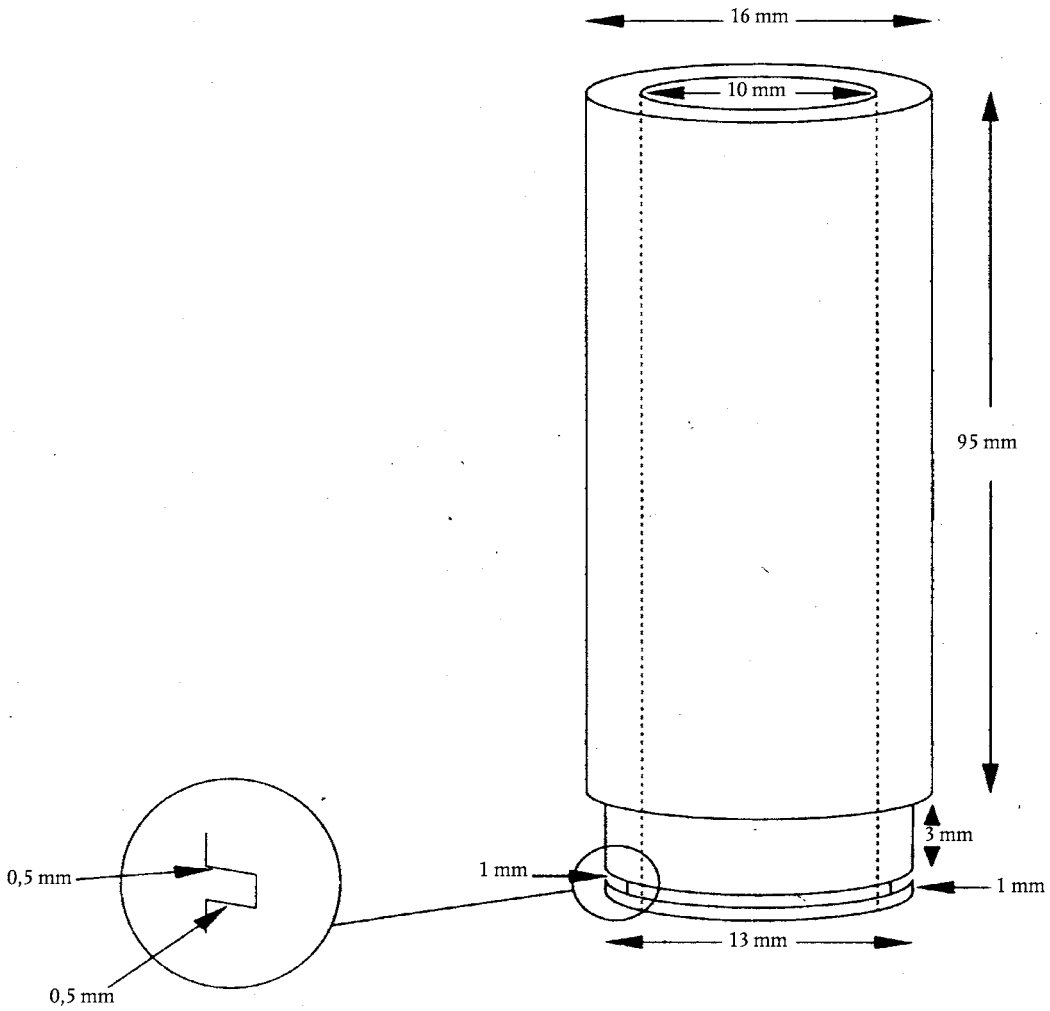
(5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity *test in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, str. 191-194.

(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.

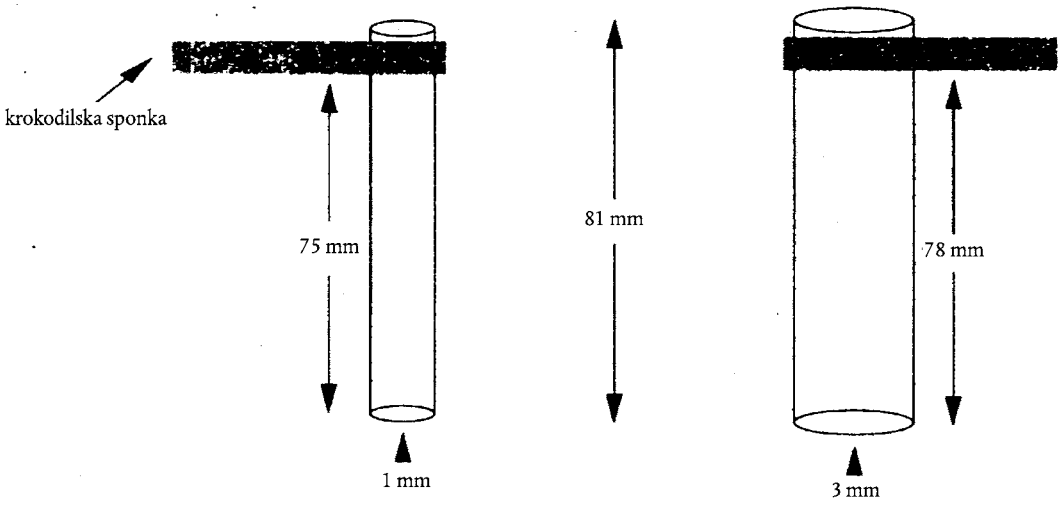
(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity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

Slika 1

Mere cevi PTFE

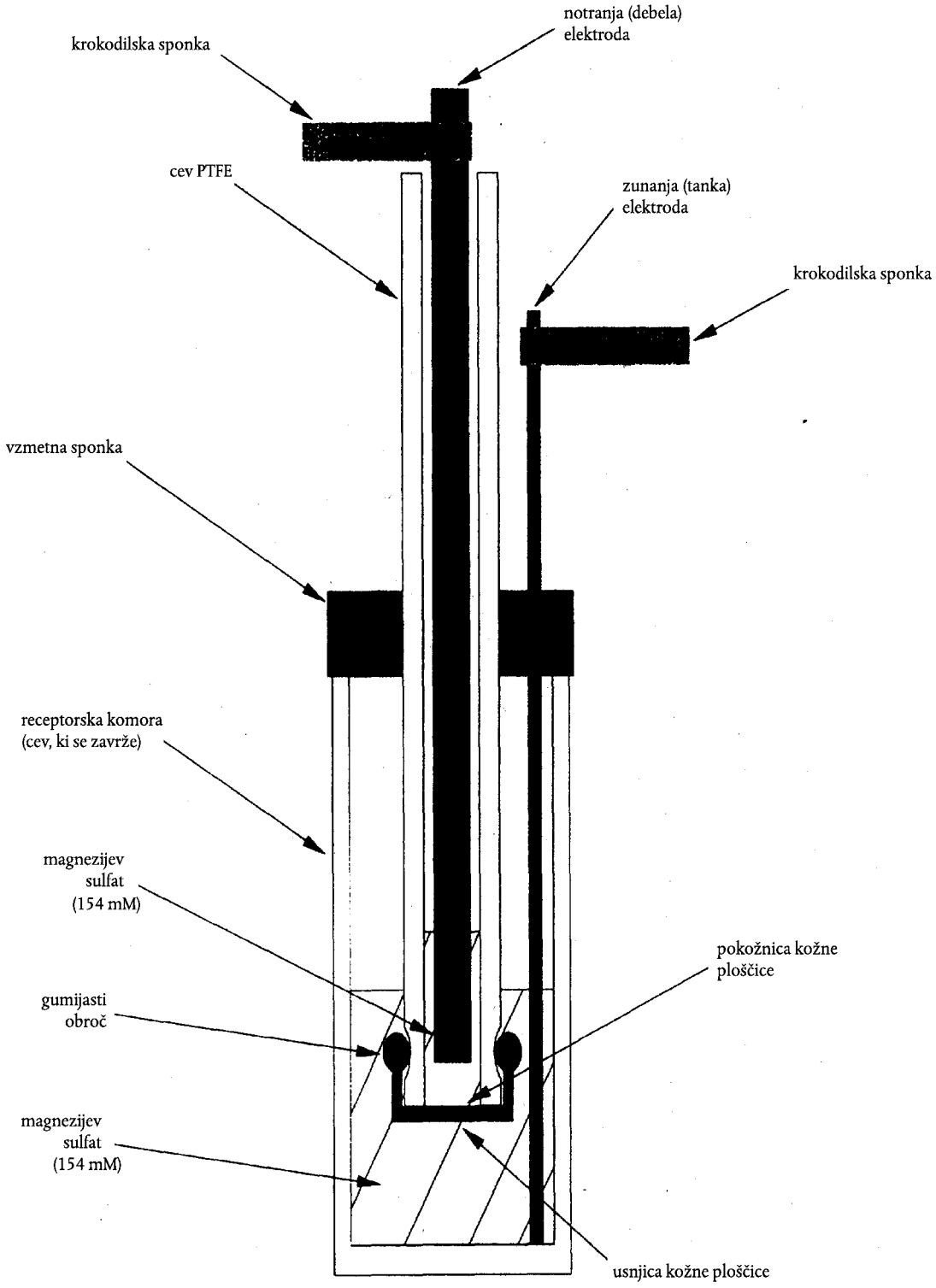


Mere elektrod



Slika 2

Naprava za preskus TER s podganjo kožo



PRILOGA II

„B.41 FOTOTOKSIČNOST –PRESKUS FOTOTOKSIČNOSTI 3T3 NRU *IN VITRO*

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Fototoksičnost je opredeljena kot toksična reakcija, ki nastane po prvotni izpostavljenosti kože nekaterim kemikalijam ter naknadni izpostavljenosti svetlobi, ali se podobno sproži z obsevanjem kože po sistemskem dajanju kemikalije.

Informacije, pridobljene pri preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*, se uporabljajo za ugotavljanje fototoksičnega potenciala preskušane snovi, tj. prisotnosti ali odsotnosti možnih nevarnosti, ki se lahko pojavijo zaradi preskušane snovi v povezavi z izpostavljenostjo UV in vidni svetlobi.

Ker je končni toksikološki cilj preskusa *in vitro* določiti fotocitotoksičnost, ki jo sproži kombinirano delovanje kemikalije in svetlobe, je mogoče s preskusom ugotoviti tako spojine, ki so fototoksične *in vivo* po sistemskem dajanju in porazdelitvi po koži, kot spojine, ki delujejo kot fotoiritanti po površinskem nanosu na kožo.

Preskus fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* se je razvil in validiral v skupnem projektu EU/COLIPA v obdobju 1992-1997 (1) (2) (3) za pridobitev veljavne alternative *in vitro* raznim preskusom *in vivo*, ki so bili v uporabi. Leta 1996 je delavnica v okviru OECD priporočila stopenjski preskus *in vitro* za ocenjevanje fototoksičnosti (4).

Rezultati preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* so se primerjali z akutnimi učinki fototoksičnosti/fotoiritacije *in vivo* pri živalih in ljudeh, in izkazalo se je, da preskus omogoča odlično napovedovanje teh učinkov. Preskus ni namenjen napovedovanju drugih škodljivih učinkov, ki lahko nastanejo zaradi kombiniranega delovanja kemikalije in svetlobe, npr. fotogenotoksičnosti, fotoalergenosti in fotorakotvornosti, čeprav bodo številne kemikalije, ki imajo takšne lastnosti, v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* reagirale pozitivno. Poleg tega preskus tudi ni namenjen ocenjevanju fototoksičnega potenciala.

Zaporedni pristop k preskušanju fototoksičnosti kemikalij je podrobno razložen v dodatku.

1.2 **Opredelitve**

Obsevanje: intenziteta ultravijolične (UV) ali vidne svetlobe, ki doseže površino, merjena v W/m^2

Odmerek svetlobe: količina (= intenziteta × čas) ultravijoličnega (UV) ali vidnega sevanja, ki doseže površino, izražena v joulih (= W × s) na enoto površine, npr. J/m^2 ali J/cm^2

Valovni pasovi UV-svetlobe: oznake, ki jih priporoča CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), so: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) in UVC (100-280 nm). Uporabljajo se tudi druge oznake: ločnica med UVB in UVA je pogosto pri 320 nm, UVA pa se lahko razdeli v UV-A1 in UV-A2, pri čemer je ločnica pri približno 340 nm.

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti populacije celic (npr. sprejemanje vitalnega barvila nevtralno rdeče v celične lizosome), ki se glede na merjeni ciljni učinek in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo celic.

Relativna viabilnost celic: viabilnost celic, izražena glede na negativne kontrole (topilo), ki potekajo ves čas preskusnega postopka (bodisi + UV bodisi – UV), vendar se ne obdelajo s preskušano kemikalijo.

Model za napovedovanje: algoritem, ki se uporablja za pretvorbo rezultatov preskusa toksičnosti v napoved toksičnega potenciala. V pričujočem navodilu za preskus se lahko za pretvorbo rezultatov preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* v napoved fototoksičnega potenciala uporabita PIF in MPE.

PIF (faktor fotoiritacije): faktor, pridobljen s primerjanjem dveh enako učinkovitih citotoksičnih koncentracij (EC_{50}) preskušane kemikalije, dobljenih v odsotnosti (– UV) in v prisotnosti (+ UV) necitotoksičnega obsevanja z UVA/vidno svetlobo.

MPE (srednji fotoučinek): novejša mera, izpeljana iz matematične analize celotne oblike krivulj reakcije na dve koncentraciji, pridobljenih v odsotnosti (– UV) in v prisotnosti (+ UV) necitotoksičnega obsevanja z UVA/vidno svetlobo.

Fototoksičnost: akutna toksična reakcija, ki nastane po prvotni izpostavljenosti kože nekaterim kemikalijam in naknadni izpostavljenosti svetlobi, ali se podobno sproži z obsevanjem kože po sistemskem dajanju kemikalije.

Fotoiritacija: podvrsta izraza ‚fototoksičnost', ki se uporablja le za opis tistih fototoksičnih reakcij, ki nastanejo na koži po izpostavljenosti kemikalijam (površinsko ali oralno). Te fototoksične reakcije vselej vodijo do nespecifičnih poškodb celic (reakcije, podobne sončnim opeklinam).

Fotoalergenost: pridobljena imunološka reakcija, ki se ne pojavi pri prvi obdelavi s kemikalijo in svetlobo in pri kateri je potrebno indukcijsko obdobje enega tedna ali dveh, preden se pojavi reakcija kože.

Fotogenotoksičnost: genotoksična reakcija, opažena pri genetskem končnem cilju, ki nastopi po izpostavljenosti celic negenotoksičnemu odmerku UV/vidne svetlobe in negenotoksični kemikaliji.

Fotorakotvornost: rakotvornost, ki jo sproži ponovljena uporaba svetlobe in kemikalije. Izraz ‚foto ko-karcinogeneza' se uporablja, če se tumorigeneza, inducirana z UV, poveča zaradi kemikalije.

1.3 Referenčne snovi

Poleg kemikalije pozitivne kontrole klorpromazin, ki jo je treba hkrati preskušati v vsakem preskusu, se za novo vzpostavljeni preskus fototoksičnosti 3T3 NRU priporoča, da se kot referenčne kemikalije uporabljajo nekateri predstavniki kemikalij, uporabljenih v medlaboratorijskih preskušanjih pričujočega preskusa (1) (3) (13).

1.4 Začetni preudarki

Za več vrst kemikalij je bilo ugotovljeno, da sprožajo fototoksične učinke (5) (6) (7) (8). Njihova edina skupna lastnost je sposobnost, da v območju sončne svetlobe absorbirajo svetlobno energijo. Po prvem zakonu fotokemije (Grotthaus-Draperjev zakon) zahteva fotoreakcija zadostno absorpcijo svetlobnih kvantov. Zato je treba, še preden se začne razmišljati o biološkem preskušanju po pričujočih navodilih za preskus, določiti absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe pri preskušani kemikaliji (npr. v skladu z Navodilom za preskušanje 101 OECD). Če je koeficient molarne ekstinkcije/absorpcije manjši od 10 litrov × mol^{-} × cm^{-}, kemikalija nima fotoreaktivnega potenciala in je ni treba preskušati niti v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* niti v katerem koli drugem biološkem preskusu škodljivih fotokemičnih učinkov (dodatek).

1.5 Načelo preskusne metode

Ugotovljeni so bili štirje mehanizmi, pri katerih absorpcija svetlobe v (kemični) kromatofori lahko povzroči fototoksično reakcijo (7). Pri vseh pride do poškodbe celic. Zaradi tega temelji preskus fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* na primerjavi citotoksičnosti kemikalije, kadar se preskuša v prisotnosti in v odsotnosti izpostavljenosti necitotoksičnemu odmerku UVA/vidne svetlobe. Citotoksičnost se v tem preskusu izraža kot od koncentracije odvisno zmanjšanje sprejemanja vitalnega barvila nevtralno rdeče (NR) (9) 24 ur po obdelovanju s preskusno kemikalijo in obsevanju.

Celice stalne celične linije mišjih fibroblastov Balb/c 3T3 se kultivirajo 24 ur, da se oblikujejo enoslojne celične plasti. Dve 96-kanalni plošči na eno preskušano kemikalijo se nato eno uro predinkubirata z osmimi različnimi koncentracijami kemikalije. Nato se ena od obeh plošč izpostavi necitotoksičnemu odmerku UVA/vidne svetlobe v odmerku 5 J/cm^2 UVA (poskus + UV), medtem ko druga plošča ostane v temi (poskus – UV). Na obeh ploščah se nato gojišče za obdelovanje nadomesti z gojiščem kulture, po nadaljnjih 24 urah inkubacije pa se 3 ure določa viabilnost celic s sprejemanjem nevtralne rdeče (NRU). Relativna viabilnost celic, izražena kot odstotek neobdelanih negativnih kontrol, se izračuna za vsako od osmih preskusnih koncentracij. Za napoved fototoksičnega potenciala se reakcije na koncentracije, pridobljene v prisotnosti (+ UV) in v odsotnosti (– UV) obsevanja, med seboj primerjajo, običajno na ravni EC_{50}, tj. pri koncentraciji, ki viabilnost celic v primerjavi z neobdelanimi kontrolami zmanjša za 50 %.

1.6 Merila kakovosti

Občutljivost celic na UVA, historični podatki: pri celicah je treba redno preverjati občutljivost na UVA. Celice se sprva zasejejo pri gostoti, uporabljeni v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*, naslednji dan se obsevajo z odmerki UVA od 1-9 J/cm^2, nato pa se dan pozneje s pomočjo preskusa NRU določi viabilnost celic. Celice izpolnjujejo merila kakovosti, če njihova viabilnost po obsevanju s 5 J/cm^2 UVA ni manjša od 80 % viabilnosti temnih kontrol. Pri najvišjem odmerku UVA v višini 9 J/cm^2 viabilnost ne sme biti manjša od 50 % viabilnosti temnih kontrol. To preverjanje je treba ponoviti približno pri vsaki 10. pasaži celic.

Občutljivost celic negativne kontrole na UVA, trenutni preskus: preskus izpolnjuje merila kakovosti, če negativne kontrole (celice v Earlovi uravnoteženi raztopini soli (EBSS) z 1 % dimetilsulfoksidom (DMSO) ali brez njega ali 1 % etanola (EtOH)) v poskusu + UVA pokažejo viabilnost, ki ni manjša od 80 % viabilnosti neobsevanih celic v istem topilu hkratnega temnega poskusa (– UVA).

Viabilnost negativnih kontrol: absolutna optična gostota ($OD_{540\ NRU}$), merjena v ekstraktu NR negativnih kontrol, pokaže, ali so celice 1×10^4, zasejane na vsak posamezni kanal, v dveh dneh preskusa zrasle v običajnem času podvajanja. Preskus izpolnjuje merila sprejemljivosti, če je srednja vrednost $OD_{540\ NRU}$ neobdelanih kontrol ≥ 0,2.

Pozitivna kontrola: skupaj z vsakim preskusom fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* se obenem preskuša tudi znana fototoksična kemikalija. Klorpromazin (CPZ) se je kot pozitivna kontrola uporabil v validacijski študiji EU/COLIPA in se zato priporoča. Za CPZ, ki se je preskušal s standardnim protokolom v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*, so bila opredeljena naslednja merila sprejemljivosti: obsevani CPZ (+ UVA): EC_{50} = 0,1 do 2,0 μg/ml, neobsevani CPZ (– UVA): EC_{50} = 7,0 do 90,0 μg/ml. Faktor fotoiritacije (PIF), tj. premik EC_{50}, mora biti najmanj 6.

Namesto CPZ se lahko kot hkratna pozitivna kontrola uporabijo tudi druge znane fototoksične kemikalije, ki ustrezajo vrsti preskušane kemikalije, ki se vrednoti, ali njenim značilnostim glede topnosti. V tem primeru je treba na podlagi zgodovinskih podatkov območja vrednosti EC_{50} in PIF ali MPE (srednji fotoučinek) ustrezno opredeliti kot merila sprejemljivosti preskusa.

1.7 **Opis preskusne metode**

1.7.1 *Priprave*

1.7.1.1 Celice

Stalna celična linija mišjih fibroblastov — Balb/c 3T3, klon 31 — bodisi iz ATCC bodisi iz ECACC je bila uporabljena v validacijski študiji in je zato priporočljiva. Z istim preskusnim protokolom je mogoče uspešno uporabiti tudi druge celice ali celične linije, če so pogoji kulture prilagojeni specifičnim potrebam celic, vendar pa je treba dokazati enakovrednost.

Celice je treba redno preverjati glede odsotnosti kontaminacije z mikoplazmo, uporabiti pa se smejo le, če so rezultati takšnih preverjanj zadovoljivi.

Ker se občutljivost celic na UVA lahko poveča s številom pasaž, je treba uporabiti celice Balb/c 3T3 z najmanjšim možnim številom pasaž, po možnosti nižjim od 100. Pomembno je, da se občutljivost celic Balb/c 3T3 na UVA redno preverja v skladu s postopkom kontrole kakovosti, opisanim v teh navodilih.

1.7.1.2 Gojišče in pogoji kultiviranja

Tako za rutinske pasaže celic kot med samim preskusnim postopkom je treba uporabiti ustrezna gojišča kulture in ustrezne inkubacijske pogoje. Pri celicah Balb/c 3T3 je to DMEM z dodatkom 10 % seruma novorojenih telet, 4 mM glutamina, penicilina in streptomicina; ter vlažna inkubacija pri 37 °C/7,5 % CO_2. Pri tem je še zlasti pomembno, da pogoji celične kulture zagotavljajo čas celičnega cikla v okviru običajnih historičnih meja uporabljenih celic ali celične linije.

1.7.1.3 Priprava kultur

Celice iz zamrznjene zaloge kultur se v gojišče kulture zasejejo v ustrezni gostoti in se ponovno kultivirajo vsaj enkrat, preden se uporabijo v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*.

Za preskus fototoksičnosti se celice v gojišče kulture zasejejo v takšni gostoti, da se kulture do konca preskusa ne bodo spojile, tj. ko se 48 ur po zasejanju celic določa viabilnost celic. Za celice Balb/c 3T3, ki se kultivirajo v 96-kanalnih ploščah, se priporoča gostota celic 1×10^4 celic na kanal.

Za vsako preskušano kemikalijo se celice enako zasejejo v dve ločeni 96-kanalni plošči, ki gresta nato hkrati čez celotni preskusni postopek pod enakimi pogoji kultiviranja, razen časovnega obdobja, v katerem se ena plošča obseva (+ UVA/vidna svetloba), druga pa ostane v temi (– UVA/vidna svetloba).

1.7.1.4 Aktivacija presnove

Medtem ko je uporaba presnovnih sistemov splošna zahteva za vse preskuse *in vitro* za napovedovanje genotoksičnega in karcinogenega potenciala, doslej v primeru fototoksikologije ni znana nobena kemikalija, za katero bi bila potrebna presnovna transformacija, da bi kemikalija učinkovala kot fototoksin *in vivo* ali *in vitro*. Zaradi tega ni niti potrebno niti znanstveno upravičeno, da se pričujoči preskus opravi s sistemom za aktivacijo presnove.

1.7.1.5 Preskušana kemikalija/priprava

Preskušane kemikalije je treba sveže pripraviti tik pred uporabo, razen če podatki o stabilnosti potrjujejo sprejemljivost hranjenja. Lahko se zahteva priprava pod rdečo lučjo, kadar je velika verjetnost hitre fotodegradacije.

Preskušane kemikalije je treba raztopiti v puferskih raztopinah soli, npr. EBSS (Earlovi uravnoteženi raztopini soli) ali fosfatpuferni raztopini soli (PBS), v katerih zato, da med obsevanjem ne pride do interference, ne sme biti proteinskih sestavin in pH indikatorskih barv, ki absorbirajo svetlobo.

Preskušane kemikalije z omejeno topnostjo v vodi je treba v ustreznih topilih raztopiti v koncentraciji, enaki 100-kratni želeni končni koncentraciji, in jih nato razredčiti v razmerju 1: 100 s pufersko raztopino soli. Če se uporabi topilo, mora imeti stalni volumen 1 % (vol./vol.) v vseh kulturah, tj. v negativnih kontrolah in v vseh koncentracijah preskušane kemikalije.

Priporočeni topili sta dimetilsulfoksid (DMSO) in etanol (EtOH). Druga topila z nizko citotoksičnostjo (npr. aceton) so sicer lahko ustrezna, vendar je treba pri njih skrbno preveriti specifične lastnosti, npr. reagiranje s preskušano kemikalijo, izničenje fototoksičnega učinka, lovljenje radikalov.

Za boljšo topnost se lahko po potrebi uporabi vrtinčno mešanje in/ali uporaba ultrazvoka in/ali segrevanje na 37 °C.

1.7.1.6 UV obsevanje/priprava

Vir svetlobe: izbira primernega vira svetlobe in ustreznega filtra je ključni dejavnik pri preskušanju fototoksičnosti. UVA in vidna območja so navadno povezana z nastankom preobčutljivosti na svetlobo (fotosenzitizacijo) (7) (10), medtem ko je UVB manj pomemben in je sam neposredno močno citotoksičen, saj svojo citotoksičnost med 313 in 280 nm poviša tisočkrat (11). Merila za izbiro ustreznega vira svetlobe morajo vključevati bistveno zahtevo, da vir svetlobe oddaja valovne dolžine, ki jih preskušana kemikalija absorbira, ter da mora odmerek svetlobe (ki ga je mogoče doseči v razumnem času) zadostovati za odkrivanje znanih fotosenzitizatorjev. Nadalje uporabljene valovne dolžine in odmerki ne smejo po nepotrebnem škodovati preskusnemu sistemu, pri čemer je vključeno oddajanje toplote (infrardeče območje).

Simulacija sončne svetlobe s solarnimi simulatorji velja za optimalni vir svetlobe. V solarnih simulatorjih se uporabljajo tako ksenonove obločne svetilke kakor (dopirane) živosrebrove kovinske halogenidne obločne svetilke. Slednje imajo to prednost, da oddajajo manj toplote in da so cenejše, vendar ujemanje s sončno svetlobo ni popolno. Ker vsi solarni simulatorji oddajajo precejšnje količine UVB, jih je treba ustrezno filtrirati, da se oslabijo močno citotoksične valovne dolžine UVB.

Za preskus fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* je treba uporabiti sevalni spekter, v katerem praktično ni UVB (UVA:UVB ˜ 1:20). Primer spektralne razdelitve filtriranega solarnega simulatorja, uporabljenega v validacijski študiji preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*, je bil objavljen (3).

Dozimetrija: pred vsakim preskusom fototoksičnosti je treba redno preverjati intenzivnost svetlobe (obsevanja), in sicer z uporabo primernega širokospektralnega UV-metra. UV-meter je treba predhodno kalibrirati za vir svetlobe. Preveriti je treba delovanje UV-metra in v ta namen se priporoča uporaba drugega, referenčnega UV-metra iste vrste in iste umeritve. Idealno je treba pri večjih intervalih uporabiti spektroradiometer, da se meri spektralno sevanje filtriranega vira svetlobe in preveri kalibracija širokospektralnega UV-metra, vendar pa mora takšne instrumente vešče upravljati ustrezno usposobljeno osebje.

V validacijski študiji je bilo ugotovljeno, da odmerek v višini 5 J/cm^2 (UVA) ni citotoksičen za celice Balb/c 3T3 in da je dovolj močan, da sam zazna celo šibko fototoksične kemikalije. Da se doseže 5 J/cm^2 v 50 minutah, mora biti sevanje nastavljeno na 1,666 mW/cm^2. Če se uporabi druga celična linija ali drugačen vir svetlobe, je morda potrebna rahla prilagoditev odmerka UVA, in sicer je merilo neškodljivost za celice in zadostna moč za zaznavanje standardnih fototoksinov. Čas izpostavljenosti svetlobi se izračuna takole:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Odmerek sevanja (J/cm}^2) \times 1000}{\text{Sevanje] (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$$

1.7.2 *Preskusni pogoji*

Maksimalna koncentracija preskušane kemikalije ne sme preseči 100 µg/ml, saj so bile vse fototoksične kemikalije ugotovljene pri nižjih koncentracijah, pri višjih koncentracijah pa se pojavnost napačno pozitivnih vrednosti poveča (13). Vrednost pH najvišje koncentracije preskušane kemikalije mora biti zadovoljiva (območje pH: 6,5-7,8).

Razpon koncentracij kemikalije, ki se preskuša v prisotnosti (+ UVA) in v odsotnosti (– UVA) svetlobe, je treba ustrezno določiti v predhodnih poskusih za ugotavljanje razpona. Razpon in razmak serije koncentracij se prilagodita tako, da podatki iz poskusov v zadostni meri podpirajo krivulje koncentracija-reakcija. Uporabiti je treba geometrične serije koncentracij (s konstantnim faktorjem razredčevanja).

1.7.3 *Preskusni postopek* [1]

1.7.3.1 Prvi dan

Pripraviti celično suspenzijo v vrednosti 1 × 105^5 celic/ml v gojišču kulture, samo 100 µl gojišča kulture pa razdeliti v stranske kanale ene 96-kanalne mikrotiterske plošče za tkivne kulture (= slepi vzorci). V preostale kanale razdeliti 100 µl celične suspenzije z 1 × 10^5 celicami/ml (= 1 × 10^4 celic/kanal). Za vsako preskušano kemikalijo pripraviti dve plošči: eno za ugotavljanje citotoksičnosti (– UVA), drugo pa za določanje fotocitotoksičnosti (+ UVA).

Celice inkubirati 24 ur (7,5 % CO_2, 37 °C), dokler ne oblikujejo na pol strnjene enojne plasti. S takšnim inkubacijskim časom se zagotovijo okrevanje celic, pritrjevanje in eksponentna rast.

1.7.3.2 Drugi dan

Po inkubaciji odcediti gojišče kulture s celic in jih dvakrat sprati s 150 µl EBSS/PBS na kanal. Dodati 100 µl EBSS/PBS, ki vsebuje ustrezno koncentracijo preskušane kemikalije ali zgolj topila (negativna kontrola). Uporabiti 8 različnih koncentracij preskušane kemikalije. Celice s preskušano kemikalijo v temi inkubirati 60 minut (7,5 % CO_2, 37 °C).

Za izvedbo (+ UVA) dela preskusa celice pri sobni temperaturi obsevati 50 minut prek pokrova 96-kanalne plošče z 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2. Zračiti z ventilatorjem, da se prepreči kondenzacija H_2O pod pokrovom. Dvojnike plošč (– UVA) zadržati pri sobni temperaturi 50 minut v temni škatli (= čas izpostavljenosti UVA).

Odcediti preskusno tekočino in dvakrat sprati s 150 µl EBSS/PBS. Zamenjati EBSS/PBS z gojiščem kulture in inkubirati (7,5 % CO_2, 37 °C) čez noč (18-22 ur).

1.7.3.3 Tretji dan

Mikroskopsko vrednotenje

Celice preučiti pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Zabeležiti morfološke spremembe celic zaradi citotoksičnega učinkovanja preskušane kemikalije. To preverjanje je priporočljivo zaradi izključevanja napak pri preskusu, vendar se te zabeležke ne uporabijo za vrednotenje citotoksičnosti ali fototoksičnosti.

Preskus sprejemanja nevtralne rdeče

Celice sprati s 150 µl predhodno segretega EBSS/PBS. Raztopino za spiranje odstraniti z rahlim stresanjem. Dodati 100 µl gojišča NR in 3 ure inkubirati pri 37 °C v vlažnem ozračju s 7,5 % CO_2.

Po inkubaciji odstraniti gojišče NR in celice sprati s 150 µl EBSS/PBS. Odcediti in v celoti popivnati EBSS/PBS. (Izbirno: centrifugirati obrnjeno ploščo.)

Dodati natančno 150 µl raztopine za desorpcijo NR (sveže pripravljen etanol/ocetna kislina)

Deset minut hitro stresati mikrotitersko ploščo na stresalniku za mikrotiterske plošče, dokler se NR ne ekstrahira iz celic in tvori homogeno raztopino.

Optično gostoto ekstrakta NR izmeriti pri 540 nm v spektrofotometru, slepe vzorce uporabiti kot reference. Podatke shraniti v ustreznem datotečnem formatu (npr. ASCII) za naknadno analizo.

[1] Dodatne podrobnosti so v literaturi pod navedbo 12.“

2. **PODATKI**

2.1 **Kakovost in količina podatkov**

Podatki naj omogočajo smiselno analizo povezave koncentracija-reakcija, pridobljene v prisotnosti in v odsotnosti obsevanja z UVA/vidno svetlobo. Če se ugotovi citotoksičnost, je treba tako razpon koncentracij kakor razmak med posameznimi koncentracijami izbrati tako, da je poskusne podatke mogoče predstaviti v obliki krivulje. Glede na dejstvo, da preskušana kemikalija morebiti ni citotoksična do določene mejne koncentracije v višini 100 μg/ml v temnem poskusu (– UVA), vendar je zelo citotoksična pri obsevanju (+ UVA), se bodo razponi koncentracij, namenjeni preskušanju v obeh delih poskusa, po velikosti morda morali razlikovati, da bo izpolnjena zahteva glede ustrezne kakovosti podatkov. Če se v nobenem od obeh delov preskusa (– UVA in + UVA) ne ugotovi citotoksičnost, zadostuje preskušanje z velikim razmakom med posameznimi odmerki do najvišje koncentracije.

Jasno pozitivnega rezultata ni treba potrditi s ponovitvijo poskusa. Poleg tega tudi ni treba potrditi jasno negativnih rezultatov, pod pogojem da je bila preskušana kemikalija preskušena pri dovolj visokih koncentracijah. V takšnih primerih zadostuje en glavni poskus, podprt z enim predhodnim poskusom ali več za ugotavljanje razpona.

Preskuse z mejnimi rezultati blizu mejne črte modela za napovedovanje je treba za potrditev ponoviti.

Če je ponovitev preskusa potrebna, je za doseganje jasnega rezultata morda treba spremeniti preskusne pogoje. Ključna spremenljivka tega preskusa je priprava raztopin preskušane kemikalije. Zaradi tega je spreminjanje pogojev (sotopilo, zmletje, uporaba ultrazvoka) morda najbolj primerno pri ponovitvi preskusa. Kot o alternativi se lahko razmisli tudi o spreminjanju inkubacijskega časa pred obsevanjem. Za kemikalije, ki so v vodi nestabilne, je lahko ustrezen krajši čas.

2.2 **Obdelava rezultatov**

Kadar je mogoče, se določi koncentracija preskušane kemikalije, ki izraža 50 % inhibicijo celičnega NRU (EC_{50}). To je mogoče izvesti z uporabo katerega koli ustreznega nelinearnega regresivnega postopka (najbolje funkcije Hill ali logistične regresije) na podatkih koncentracija-reakcija ali z uporabo drugih postopkov prilagajanja krivulje (14). Preden se vrednost EC_{50} uporabi za nadaljnje izračune, je treba ustrezno preveriti kakovost prilagoditve krivulje. Kot alternativa se lahko za izračun vrednosti EC_{50} uporabijo grafične metode prilagajanja krivulje. V takšnem primeru je priporočljiva uporaba verjetnostne mreže (os x: log, os y: probit), saj bo funkcija koncentracija-reakcija po tej transformaciji v številnih primerih postala skoraj linearna.

2.3 **Vrednotenje rezultatov (modeli za napovedovanje)**

2.3.1 *Model za napovedovanje — 1. različica: faktor fotoiritacije (PIF)*

Če se pridobita obe popolni krivulji koncentracija-reakcija (v prisotnosti (+ UVA) in v odsotnosti (– UVA) svetlobe), se faktor fotoiritacije (PIF) izračuna z uporabo naslednje formule:

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

(a) PIF < 5 ne napove nobenega fototoksičnega potenciala, medtem ko PIF ≥ 5 napove fototoksični potencial.

Če je kemikalija citotoksična le pri + UVA in ni citotoksična pri preskušanju – UVA, se PIF ne da izračunati, čeprav je to rezultat, ki kaže na fototoksični potencial. V takšnih primerih se ‚> PIF' lahko izračuna, če je (– UV) preskus citotoksičnosti izveden do najvišje preskusne koncentracije (C_{max}) in se ta vrednost uporabi za izračun ‚> PIF';

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

(b) Če je mogoče pridobiti le ‚> PIF', potem katera koli vrednost > 1 napove fototoksični potencial.

Če se ne moreta izračunati niti EC_{50} (– UV) niti EC_{50} (+ UV) zaradi tega, ker kemikalija ne kaže citotoksičnosti do najvišje preskusne koncentracije, to ne nakazuje fototoksičnega potenciala. V takšnih primerih se za karakterizacijo rezultata uporabi formalni ‚PIF = *1';

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

(c) Če je mogoče pridobiti le ‚PIF = *1', to ne napove fototoksičnega potenciala.

V primerih (b) in (c) je treba pri napovedovanju fototoksičnega potenciala skrbno upoštevati koncentracije, dosežene pri preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*.

2.3.2 *Model za napovedovanje — 2. različica: srednji fotoučinek (MPE)*

Kot alternativo je mogoče uporabiti novejšo različico modela za napovedovanje fototoksičnega potenciala, ki se je razvil z uporabo podatkov validacijske študije EU/COLIPA (15) in preskusil pod slepimi pogoji v nadaljnji študiji fototoksičnosti kemikalij *in vitro*, ki se uporabljajo kot UV-filter (13). Ta model zaobide omejitve modela PIF, kadar vrednosti EC_{50} ni mogoče pridobiti. Model uporablja ‚srednji fotoučinek' (MPE), mero, ki temelji na primerjavi celotnih krivulj koncentracija-reakcija. Za uporabo modela MPE so na Univerzi Humboldt (Berlin) razvili posebno računalniško programsko opremo, ki je na voljo brezplačno.

2.4 **Razlaga rezultatov**

Pozitivni rezultat v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU (PIF ≥ 5 ali MPE ≥ 0,1) *in vitro* kaže, da ima preskušana snov fototoksični potencial. Če se takšen rezultat pridobi pri koncentracijah pod 10 μg/ml, je verjetno, da preskušana kemikalija učinkuje fototoksično tudi pod različnimi pogoji izpostavljenosti *in vivo*. Če je pozitivni rezultat pridobljen le pri najvišji preskusni koncentraciji 100 μg/ml, je morda potreben nadaljnji razmislek o oceni nevarnosti ali fototoksičnega potenciala. Ta lahko zajema podatke o penetraciji, absorpciji in možni akumulaciji kemikalije v koži ali preskušanju kemikalije v potrdilnem alternativnem preskusu, denimo pri preskusu *in vitro* z modelom človeške kože.

Negativni rezultat iz preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU (PIF < 5 ali MPE < 0,1) *in vitro* kaže, da pod uporabljenimi pogoji preskušana snov ni bila fototoksična za kultivirane celice sesalcev. V primerih, v katerih je kemikalijo mogoče preskušati do najvišje koncentracije 100 μg/ml, negativni rezultat kaže, da kemikalija nima fototoksičnega potenciala, fototoksičnost *in vivo* pa je malo verjetna. V primerih, v katerih so bile identične vrednosti koncentracija-toksična reakcija (EC_{50} + UV in EC_{50} – UV) pridobljene pri nižjih koncentracijah, bi bila interpretacija podatkov enaka. Kadar pa nasprotno toksičnost ni bila ugotovljena (+ UV in – UV) in če je topnost v vodi omejila koncentracije na vrednosti pod 100 μg/ml, je združljivost preskušane snovi s preskusom vprašljiva, in je treba razmisliti o potrjevalnem preskusu (npr. z uporabo modela kože *in vitro* ali modela kože *ex vivo* ali preskusa *in vivo*).

3. **POROČANJE**

Poročilo o preskusu

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskušana kemikalija:

— identifikacijski podatki in št. CAS, če je znano,

— fizikalne lastnosti in čistota,

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije,

— stabilnost in fotostabilnost, če sta znani.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila,

— topnost preskušane kemikalije v tem topilu,

— odstotek topila v obdelovalnem mediju (EBSS ali PBS).

Celice:

— vrsta in izvor celic,

— odsotnost mikoplazme,

— število celičnih pasaž, če je znano,

— občutljivost celic na UVA, določena z obsevalno opremo, ki se uporablja pri preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*.

Preskusni pogoji (a) — inkubacija pred obdelavo in po njej:

— vrsta in sestava gojišča kulture,

— pogoji inkubacije (koncentracija CO_2, temperatura, vlažnost),

— trajanje inkubacije (predhodna obdelava, naknadna obdelava).

Preskusni pogoji (b) — obdelava s kemikalijo:

— utemeljitev izbire koncentracij preskušane kemikalije, uporabljenih tako v prisotnosti kot v odsotnosti obsevanja z UV/vidno svetlobo,

— pri omejeni topnosti preskušane kemikalije in odsotnosti citotoksičnosti utemeljitev najvišje preskušane koncentracije,

— vrsta in sestava obdelovalnega gojišča (puferska raztopina soli),

— trajanje kemičnega obdelovanja.

Preskusni pogoji (c) — obsevanje:

— utemeljitev izbora uporabljenega vira svetlobe,

— spektralne značilnosti sevanja vira svetlobe,

— značilnosti prepuščanja/absorpcije uporabljenega filtra(-ov),

— značilnosti radiometra in podatki o njegovi kalibraciji,

— oddaljenost vira svetlobe od preskusnega sistema,

— UVA-obsevanje s te razdalje, izraženo v mW/cm^2,

— trajanje izpostavljenosti UV/vidni svetlobi,

— odmerek UVA (obsevanje × čas), izražen v J/cm^2,

— temperatura celičnih kultur med obsevanjem in celičnih kultur, ki so bile istočasno v temi.

Preskusni pogoji (d) — preskus NRU:

— sestava gojišča NR,

— trajanje inkubacije NR,

— pogoji inkubacije (koncentracija CO_2, temperatura, vlažnost),

— pogoji ekstrakcije NR (ekstrakcijsko sredstvo, trajanje),

— valovna dolžina, uporabljena za spektrofotometrično merjenje optične gostote NR,

— druga valovna dolžina (referenca), če je bila uporabljena,

— vsebina spektrofotometričnega slepega vzorca, če je bil uporabljen.

Rezultati:

— viabilnost celic, pridobljena pri vsaki posamezni koncentraciji preskušane kemikalije, izražena kot odstotek srednje viabilnosti kontrol,

— krivulje koncentracija-reakcija (koncentracija preskušane kemikalije proti relativni viabilnosti celic), pridobljene v hkratnih poskusih + UVA in — UVA,

— analiza podatkov o krivuljah koncentracija-reakcija: če je mogoče, navedba/izračun EC_{50} (+ UVA) in EC_{50} (– UVA),

— primerjava dveh krivulj koncentracija-reakcija, pridobljenih v prisotnosti in odsotnosti obsevanja UVA/vidne svetlobe, in sicer bodisi z izračunom faktorja fotoiritacije (PIF) ali z izračunom srednjega fotoučinka (MPE),

— razvrstitev fototoksičnega potenciala,

— merila za sprejemljivost preskusa (a) — hkratna negativna kontrola:

  — absolutna viabilnost (optična gostota ekstrakta NR) obsevanih in neobsevanih celic,

  — historični podatki o negativnih kontrolah, srednja in standardna deviacija.

— merila za sprejemljivost preskusa (b) — hkratna pozitivna kontrola:

  — EC_{50} (+ UVA) in EC_{50} (– UVA) in PIF kemikalije pozitivne kontrole,

  — historični podatki o kemikaliji pozitivne kontrole: EC_{50} (+ UVA) in EC_{50} (– UVA) in PIF, srednja in standardna deviacija.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **LITERATURA**

(1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, 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 November 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, P. (1998), EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity ‚validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, 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, Pariz, 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 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project ‚*In Vitro* Photoirritation'.

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

Preskus fototoksičnosti 3T3 NRU in vitro

