32000L0033

DIRECTIVA 2000/33/CE A COMISIEI

din 25 aprilie 2000

de efectuare a celei de-a douăzeci și șaptea adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (*)

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 67/548/CEE a Consiliului din 27 iunie 1967 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase [1], astfel cum a fost modificată ultima dată prin Directiva 1999/33/CE a Parlamentului European și a Consiliului [2] și, în special, articolul 28 al acesteia,

întrucât:

(1) Anexa V la Directiva 67/548/CEE stabilește metodele pentru determinarea proprietăților fizico-chimice, a toxicității și a ecotoxicității substanțelor și preparatelor. Este necesară adaptarea anexei menționate la progresul tehnic.

(2) Conform articolului 7 alineatul (2) din Directiva 86/609/CEE a Consiliului din 24 noiembrie 1986 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative ale statelor membre referitoare la protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și alte scopuri științifice [3], nu se realizează un experiment care impune utilizarea animalelor, dacă se dispune în mod practic și rezonabil de o altă metodă, satisfăcătoare din punct de vedere științific, pentru obținerea rezultatului căutat.

(3) Comisia intenționează să introducă în anexa V la Directiva 67/548/CEE anumite metode de încercare alternative, care să nu necesite utilizarea animalelor, pentru a le face disponibile pentru testarea produselor chimice în conformitate cu articolul 3 alineatul (1) din Directiva 67/548/CEE.

(4) Măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului pentru adaptarea la progresul tehnic a directivelor privind eliminarea barierelor tehnice din calea comerțului cu substanțe și preparate periculoase,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Textele anexelor I și II la prezenta directivă se adaugă la anexa V partea B la Directiva 67/548/CEE.

Articolul 2

(1) Statele membre adoptă și pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 1 octombrie 2001. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste dispoziții, ele cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

(2) Statele membre comunică Comisiei textul principalelor dispoziții de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă și un tabel de corespondență între prezenta directivă și dispozițiile naționale adoptate.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 25 aprilie 2000.

Pentru Comisie

Margot WALLSTRÖM

Membru al Comisiei

(*) Adoptată înaintea celei de a 26-a adaptări.

(1) JO 196, 16.8.1967, p. 1.

(2) JO L 199, 30.7.1999, p. 57.

(3) JO L 358, 18.12.1986, p. 1.

ANEXA I

„B.40. COROZIUNEA PIELII

1. **METODA**

1.1. **Introducere**

Centrul european pentru validarea metodelor alternative (ECVAM, Centrul comun de cercetări al Comisiei Europene) a recunoscut validitatea științifică a două teste de corozivitate *in vitro*, testul de rezistență electrică transcutanată (RET) pe piele de șobolan și un test care utilizează un model de piele umană (1) (2) (3). Studiul de validare întreprins de ECVAM a demonstrat că ambele teste au permis realizarea unei distincții fiabile între substanțele corozive și necorozive pentru piele. În plus, protocolul testului întemeiat pe utilizarea unui model de piele umană a permis realizarea unei distincții corecte între diferitele grade de corozivitate (substanțe puternic corozive pentru piele, deja cunoscute, R35, și alte substanțe corozive pentru piele, R34) (2). Sunt descrise procedurile pentru ambele teste; selectarea testului utilizat depinde de cerințele specifice și de preferințele utilizatorului.

A se vedea și Introducerea generală, partea B.

1.2. **Definiții**

Coroziunea pielii: producerea unei leziuni tisulare ireversibile a pielii, în urma aplicării materialului de testat.

1.3. **Substanțe de referință**

Nu se specifică, dar a se vedea punctele 1.5.3.4 și 1.7.2.3.

1.4. **Principiul metodei de încercare – testul RET pe piele de șobolan**

Materialul de testat se aplică timp de până la 24 ore pe suprafața epidermei unor rondele de piele prelevate din pieile jupuite de la șobolani tineri, eutanasiați. Materialele corozive sunt identificate în funcție de capacitatea acestora de a produce o pierdere a integrității stratului cornos normal al pielii și a funcției de barieră, care se măsoară prin reducerea valorii RET inerente sub o valoare prag (5 κΩ) (4) (5). Materialele iritante și neiritante nu reduc valoarea RET sub valoarea prag. Pentru agenții tensioactivi sau substanțele organice neutre [pentru definiția acestora a se vedea referința bibliografică (6)], în modul de lucru, se poate introduce o etapă de fixare a unui colorant, în vederea reducerii numărului de rezultate fals pozitive, obținute în special la testarea acestor tipuri de produse chimice (2) (7).

1.5. **Descrierea metodei de încercare – testul RET pe piele de șobolan**

1.5.1. *Animalele*

Sunt necesari șobolani tineri (20-23 zile) (sușă Wistar sau una comparabilă) pentru pregătirea rondelelor de piele. Părul dorsal și cel de pe flancuri se îndepărtează cu grijă, cu un foarfece de tuns animale mici. Animalele sunt apoi curățate atent prin ștergere cu o cârpă umedă, imersând pielea tunsă în soluție de antibiotice (ce conține, de exemplu, streptomicină, penicilină, cloramfenicol și amfotericină în concentrații eficiente pentru a inhiba dezvoltarea bacteriilor). Spălarea animalelor cu antibiotice se repetă în a treia și a patra zi de la prima spălare și animalele se utilizează în termen de trei zile (pentru pregătirea pielii, vârsta animalelor nu trebuie să fie mai mare de 31 de zile).

1.5.2. *Pregătirea rondelelor de piele*

Animalele sunt eutanasiate. Apoi se îndepărtează pielea dorsală a fiecărui animal și se scoate cu grijă excesul de grăsime de pe piele. Pielea jupuită se așează peste extremitatea unui tub din politetrafluoroetilenă (PTFE), având grijă ca suprafața epidermei să fie în contact cu tubul. Pielea este fixată bine pe extremitatea tubului prin strângere cu un inel de cauciuc și se decupează țesutul în exces. Dimensiunile tubului și ale inelului din cauciuc sunt prezentate în figura 1. Apoi inelul din cauciuc este strâns etanș cu vaselină pe extremitatea tubului din PTFE. Tubul este menținut cu ajutorul unei cleme elastice în interiorul unei camere receptoare ce conține soluție de sulfat de magneziu (154 mM) (figura 2).

1.5.3. *Modul de lucru*

1.5.3.1. Aplicarea materialul de testat

Substanțele de testat în stare lichidă (150 µl) se aplică pe suprafața epidermei din interiorul tubului (figura 2). Când sunt testate materiale solide, se aplică o cantitate suficientă din acesta pe o rondea pentru a asigura acoperirea în întregime a suprafeței epidermei. Se adaugă apoi apă deionizată (150 µl) pe suprafața solidului și se agită tubul ușor. Substanța de testat ar trebui să vină cât se poate de mult în contact cu pielea. Pentru unele substanțe solide, acest lucru se poate realiza prin încălzire până la 30 °C pentru a topi substanța de testat, sau prin măcinarea acesteia, pentru a obține granule sau pulbere.

Pentru fiecare substanță de testat se utilizează trei rondele de piele. Substanțele de testat se aplică timp de 24 de ore (a se vedea și 1.5.3.4.) Substanța de testat este îndepărtată prin spălare cu un jet de apă de la robinet cu o temperatură de până la 30 °C, până nu a mai rămas substanță de îndepărtat. Pentru a ușura scoaterea substanței de testat care s-a solidificat în tub se utilizează un jet de apă caldă la aproximativ 30 °C.

1.5.3.2. Măsurători de RET

RET se măsoară cu ajutorul unei unei punți de măsură în curent alternativ de voltaj mic (de exemplu AIM 401 sau 6401, sau echivalent). Înainte de măsurarea rezistenței electrice, se reduce tensiunea superficială a pielii prin adăugarea unui volum suficient de etanol 70 % care să acopere epiderma. După câteva secunde, se scurge etanolul prin răsturnarea tubului și țesutul este apoi hidratat prin adăugarea a 3 ml de soluție de sulfat de magneziu (154 mM). Electrozii punții de măsură sunt amplasați pe ambele fețe ale rondelei de piele pentru a realiza măsurarea rezistenței în kΩ/rondea de piele (figura 2). Dimensiunile electrozilor și lungimea electrodului situat sub clemele-crocodil sunt prezentate în figura 1. În timp ce se efectuează măsurarea rezistenței, clema electrodului interior (gros) se sprijină pe capătul superior al tubului din PTFE, astfel încât o parte importantă din lungimea electrodului să fie imersată în soluția de sulfat de magneziu. Electrodul exterior (subțire) este poziționat în interiorul camerei receptoare, astfel încât să se sprijine pe fundul camerei. Distanța dintre partea inferioară a clemei elastice și fundul tubului din PTFE se menține constantă (figura 1), deoarece această distanță afectează valoarea rezistenței obținute.

Trebuie menționat că atunci când valoarea rezistenței măsurate este mai mare de 20 kΩ, aceasta se poate datora stratului de substanță de testat de pe suprafața epidermei rondelei de piele. Se poate încerca îndepărtarea acestui strat, de exemplu prin închiderea etanșă a tubului din PTFE, cu un deget îmbrăcat în mănușă, și agitarea tubului timp de aproximativ 10 secunde; soluția de sulfat de magneziu se scurge și se repetă măsurarea rezistenței cu sulfat de magneziu proaspăt.

Valorile medii ale RET se acceptă, cu condiția ca valorile martorilor pozitiv și negativ testați în paralel să se situeze între limite acceptabile pentru metodă. Substanțele martor și limitele rezistențelor acceptabile aferente, propuse pentru metodologia și aparatura descrise, sunt prezentate în continuare:

Martor	Substanța	Rezistența (kΩ)
Pozitiv	Acid clorhidric 10 M (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Apă distilată	10-25

1.5.3.3. Modul de lucru modificat pentru agenții tensioactivi și substanțele organice neutre

Dacă valorile RET ale unor substanțe care sunt fie agenți tensioactivi, fie substanțe organice neutre sunt mai mici sau egale cu 5 kΩ, se poate realiza o determinare a penetrării colorantului în țesut. Prin acest procedeu se stabilește dacă rezultatele sunt fals pozitive (2).

1.5.3.3.1. Aplicarea și îndepărtarea colorantului Sulforhodamine B

După tratamentul inițial cu substanța de testat, se aplică 150 µl dintr-o soluție 10 % (greut./vol.) de colorant Sulforhodamine B diluat în apă distilată pe suprafața epidermică a fiecărei rondele de piele, timp de 2 ore. Apoi, rondelele de piele sunt spălate cu jet de apă de la robinet la temperatura camerei timp de aproximativ 10 secunde pentru eliminarea colorantului în exces/nefixat. Se scoate cu grijă fiecare rondea de piele de pe tubul de PTFE și se introduce într-un flacon (de exemplu un flacon scintilator din sticlă, de 20 ml) ce conține apă deionizată (8 ml). Flacoanele se agită ușor timp de 5 minute pentru eliminarea urmelor de colorant în exces/nefixat. Această spălare se repetă, după care rondelele de piele se scot și se introduc în flacoane care conțin 5 ml soluție 30 % (greut./vol.) de dodecilsulfat de sodiu (SDS) în apă distilată și se incubează peste noapte la 60 °C. După incubare, rondelele de piele se scot din flacoane și soluția rămasă este centrifugată timp de 8 minute la 21 °C (forța relativă de centrifugare ~ 175). Apoi, o probă de 1 ml de supernatant se diluează în raport de 1: 5 (vol./vol.) (adică 1 ml + 4 ml) cu soluție 30 % (greutate/volum) de SDS în apă distilată. Se măsoară densitatea optică (DO) a soluției la aproximativ 565 nm.

1.5.3.3.2. Calcularea conținutului de colorant

Conținutul de colorant Sulforhodamine B din fiecare rondea se calculează din valorile DO (coeficientul de extincție molară a colorantului Sulforhodamine B la 565 nm = $8,7 \times 10^4$; greutatea moleculară = 580). Se calculează conținutul de colorant Sulforhodamine B pentru fiecare rondea de piele și se calculează conținutul mediu de colorant pentru toate testele repetate. Se acceptă valorile medii ale colorantului fixat, cu condiția ca valorile martorilor testați în paralel să se situeze între limite acceptabile pentru metoda respectivă. Limitele acceptabile propuse ale conținutului de colorant pentru substanțele martor pentru metodologia și aparatura descrisă sunt următoarele:

Martorul	Substanța	Conținutul de colorant (μg/rondea)
Pozitiv	Acid clorhidric 10 M (36 %)	40-100
Negativ	Apă distilată	15-35

1.5.3.4. Informații suplimentare

Substanțele de testat se mai pot aplica pe rondelele de piele pentru perioade scurte de timp (de exemplu 2 ore) pentru identificarea materialelor puternic corozive. Cu toate acestea, pentru studiul de validare, s-a constatat că testul RET supraestimează potențialul coroziv al câtorva produse chimice testate după aplicarea acestora pe rondelele de piele timp de 2 ore (2), deși permite identificarea corectă a substanțelor corozive și necorozive după o aplicare de 24 de ore.

Proprietățile și dimensiunile aparaturii de laborator utilizate și modul de lucru pot să influențeze valorile RET obținute. Pragul de coroziune de 5 kΩ a fost obținut din datele obținute cu aparatura specifică și modul de lucru descrise în prezenta metodă. Dacă se modifică semnificativ condițiile de testare, se aplică un prag și valori ale probelor martor diferite. Prin urmare, se recomandă calibrarea metodologiei și a pragului de rezistență prin realizarea testului cu o serie de substanțe etalon selectate dintre substanțele chimice utilizate în studiul de validare (3).

1.6. **Principiul metodei de testare - testul pe model de piele umană**

Materialul de testat se aplică pe suprafața unui model tridimensional de piele umană, ce conține o epidermă restructurată cu un strat cornos funcțional, și se menține până la 4 ore. Materialele corozive se identifică prin capacitatea lor de a reduce viabilitatea celulară {determinată, de exemplu, prin testul de reducere a MTT [bromură de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil) tetrazoliu]} sub valorile prag definite, la timpi de expunere determinați. Principiul testului se întemeiază pe ipoteza că substanțele chimice corozive pot să penetreze stratul cornos al pielii (prin difuzie sau eroziune) și sunt suficient de citotoxice pentru a provoca moartea celulelor din straturile celulare de dedesubt.

1.7. **Descrierea metodei de testare – testul cu model de piele umană**

1.7.1. *Modelele de piele umană*

Modelele de piele umană pot să provină din surse diferite, dar trebuie să îndeplinească anumite criterii. Modelul trebuie să fie constituit dintr-un strat cornos funcțional și un strat de celule vii sub acesta. Stratul cornos trebuie să aibă o funcție de barieră specifică. Acest lucru se poate demonstra prin rezistența modelului la citotoxicitate în urma aplicării substanțelor cunoscute ca fiind citotoxice pentru celule, dar care, în mod normal, nu trec prin stratul cornos. Trebuie să se demonstreze că modelul dă rezultate reproductibile în condiții experimentale stabilite.

Viabilitatea celulelor vii din model trebuie să fie suficient de mare pentru a face distincție între substanțele martor pozitiv și negativ. Viabilitatea celulară (de exemplu, măsurată prin cantitatea de MTT redus, adică o valoare a DO) în urma expunerii la substanța martor negativ trebuie să se situeze între limite acceptabile pentru modelul în cauză. În mod similar, valorile viabilității celulare în cazul substanței martor pozitiv (în raport cu cele pentru martorul negativ) trebuie să se situeze între limite determinate. Ceea ce este foarte important, trebuie să se dovedească faptul că modelul predictiv utilizat respectă normele internaționale de validare (2).

1.7.2. *Modul de lucru*

1.7.2.1. Aplicarea materialului de testat

Pentru substanțele lichide, substanța de testat trebuie să se aplice într-o cantitate suficientă pentru a acoperi suprafața pielii (minimum 25 μl/cm^2). Pentru substanțele solide, substanța de testat trebuie să se aplice într-o cantitate suficientă pentru a acoperi suprafața pielii și, apoi, ar trebui să fie umezită pentru a asigura un contact bun cu pielea; dacă este cazul, substanțele solide ar trebui să fie măcinate pentru a obține o pulbere înainte de aplicare. Metoda de aplicare trebuie să fie adecvată pentru o gamă variată de substanțe chimice (2). La sfârșitul perioadei de expunere, materialul de testat trebuie să fie îndepărtat cu grijă de pe suprafața pielii, cu soluție salină.

1.7.2.2. Măsurători de viabilitate celulară

Se poate utiliza orice metodă cantitativă, validată pentru măsurarea viabilității celulare. Testul cel mai frecvent utilizat este cel de reducere a MTT, care s-a dovedit a da rezultate precise și reproductibile în diferite laboratoare (2). Rondeaua de piele se introduce într-o soluție de MTT de 0,3 mg/ml la temperatura de 20-28 °C timp de 3 ore. Produsul formazan sub formă de precipitat albastru se supune apoi extracției (extracție cu solvent) și se determină concentrația formazanului prin măsurarea DO la o lungime de undă situată între 545 și 595 nm.

1.7.2.3. Informații suplimentare

Modelul de piele utilizat, precum și protocolul exact privind timpul de expunere și procedurile de spălare etc. au un impact important asupra rezultatelor de viabilitate celulară. Se recomandă etalonarea metodologiei și modelului predictiv prin testarea unei serii de substanțe etalon de referință, selectate dintre substanțele chimice utilizate în studiul de validare de la ECVAM (3). Este esențial să se demonstreze că metoda utilizată este reproductibilă în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare, pentru o gamă variată de substanțe chimice, în conformitate cu normele internaționale. Metoda ar trebui să îndeplinească cel puțin criteriile de validitate științifică definite anterior (2), iar rezultatele validării trebuie să fie publicate într-o revistă științifică cu referenți anonimi (*peer-reviewed*).

2. **DATELE**

2.1. **Prezentarea rezultatelor**

2.1.1. *Testul RET pe pielea de șobolan*

Valorile rezistenței (κΩ) pentru substanța de testat, martorii pozitiv și negativ și orice substanță chimică de referință ar trebui să se prezinte în raport sub formă de tabel, care să includă și datele de la experimentele concomitente/repetate, valorile medii și clasificarea rezultată.

2.1.2. *Testul cu model de piele umană*

Valorile DO și datele de viabilitate celulară calculate în procente pentru materialul de testat, martorii pozitiv și negativ și substanțele chimice de referință ar trebui să se prezinte în raport sub fomă de tabel, care să includă și datele de la experimentele concomitente/repetate, valorile medii și clasificarea rezultată.

2.2. **Evaluarea și interpretarea rezultatelor**

2.2.1. *Testul RET pe pielea de șobolan*

Dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța de testat este mai mare de 5 κΩ, atunci aceasta nu este corozivă. Dacă valoarea RET este mai mică sau egală cu 5 κΩ și substanța de testat nu este un agent tensioactiv sau o substanță organică neutră, atunci substanța respectivă este corozivă.

Pentru agenții tensioactivi sau substanțele organice neutre la care rezultă valori ale RET mai mici sau egale cu 5 κΩ, se poate realiza testul de penetrare a colorantului. Atunci când conținutul mediu de colorant din rondeaua de piele este mai mare sau egal cu conținutul mediu de colorant din rondea pentru martorul pozitiv cu HCl 36 % testat în paralel, substanța de testat este real pozitivă și este, prin urmare, corozivă. Atunci când conținutul mediu de colorant din rondeaua de piele este mai mic decât conținutul mediu de colorant din rondea pentru martorul pozitiv cu HCl 36 % testat în paralel, substanța de testat este fals pozitivă și, prin urmare, nu este corozivă.

2.2.2. *Testul cu model de piele umană*

Valoarea DO pentru martorul negativ reprezintă o viabilitate celulară de 100 %; deci, valorile DO pentru fiecare probă analizată se pot utiliza la calcularea procentajului de viabilitate în raport cu martorul negativ. Valoarea prag, exprimată în procente, a viabilității celulare, care face distincția dintre materialele de testat corozive și necorozive (sau distincția dintre diferite clase corozive) trebuie să fie definită în mod clar în modelul predictiv înainte de validarea metodei, iar studiul ulterior de validare trebuie să demonstreze că valoarea prag este corespunzătoare (2).

3. **RAPORTAREA**

Raportul testului

Raportul testului trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța de testat

— datele de identificare, natura fizică și, dacă este relevant, proprietățile fizico-chimice. Informații similare ar trebui să se ofere pentru substanțele de referință, dacă s-au utilizat.

Condițiile de testare:

— detalii privind modul de lucru,

— descrierea și justificarea oricăror modificări.

Rezultatele:

— prezentarea sub formă de tabele a valorilor rezistenței (testul RET) sau a valorilor viabilității celulare în procente (testul cu model de piele umană) pentru materialul de testat, martorii pozitiv și negativ și orice substanță chimică etalon de referință, inclusiv datele pentru experimentele concomitente/repetate și valorile medii,

— descrierea oricăror altor efecte observate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 471-482.

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

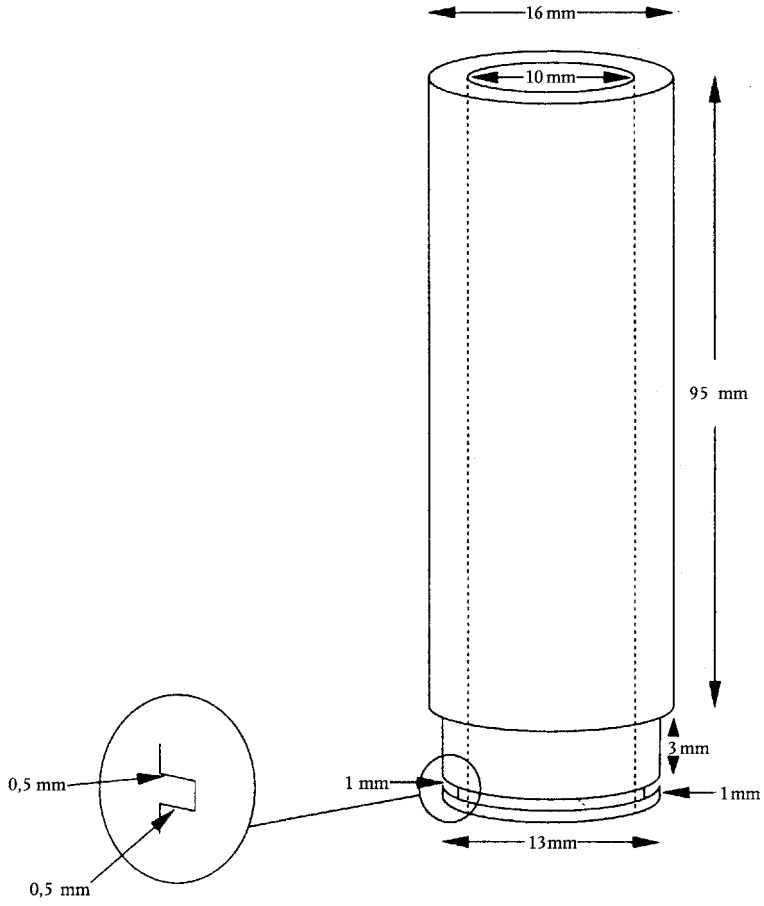
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, pp. 191-194.

(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, pp. 709-720.

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

Figura 1

Dimensiunile tubului din PTFE



Dimensiunile electrozilor

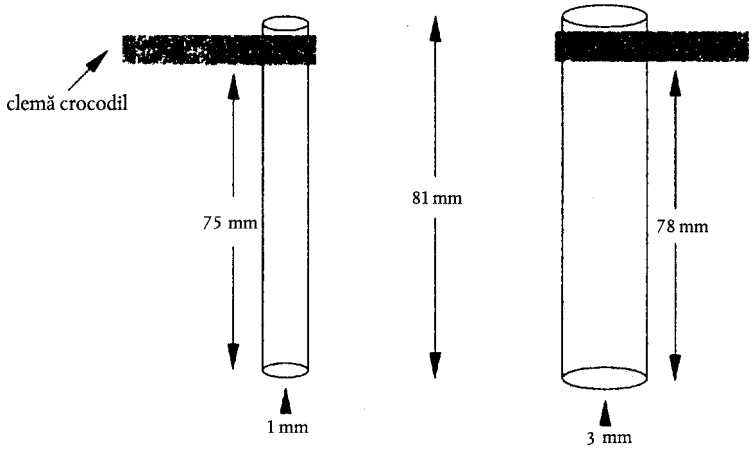
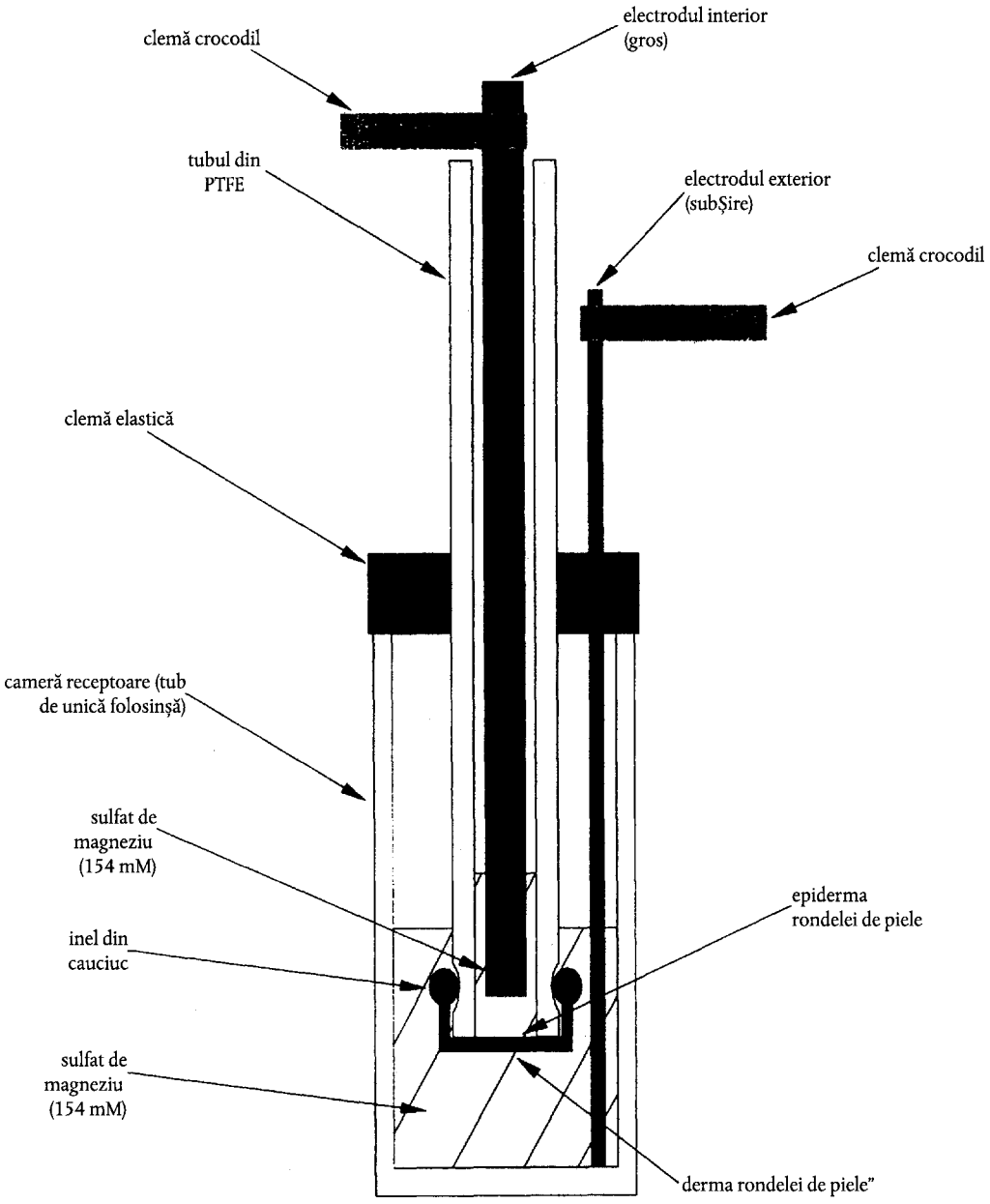


Figura 2

Aparatura pentru testul RET pe pielea de şobolan



ANEXA II

„B.41. FOTOTOXICITATEA - TESTUL DE FOTOTOXICITATE 3T3 NRU *IN VITRO*

1. **METODA**

1.1. **Introducere**

Fototoxicitatea se definește ca o reacție toxică care se declanșează după o primă expunere a pielii la anumite produse chimice, urmată de o expunere la lumină, sau care este indusă în mod similar prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unui produs chimic.

Informațiile obținute din testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* permit determinarea potențialului fototoxic al unei substanțe de testat, adică posibilele pericole (sau absența acestora) pe care ar putea să le prezinte o substanță de testat în caz de expunere la lumină UV sau vizibilă.

Deoarece finalitatea toxicologică a testului *in vitro* constă în determinarea fototoxicității induse prin acțiunea combinată a unui produs chimic și a luminii, prin prezentul test este posibilă determinarea compușilor care sunt fototoxici *in vivo* după o aplicare sistemică și distribuție în piele, precum și a compușilor care au o acțiune fotoiritantă după aplicarea locală pe piele.

Testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* a fost elaborat și validat într-un proiect comun UE/COLIPA din 1992-1997 (1) (2) (3), pentru stabilirea unei metode *in vitro* valide care să înlocuiască diferitele teste *in vivo* utilizate. În 1996, un grup de lucru al OCDE a recomandat un procedeu de testare secvențială *in vitro* pentru evaluarea fototoxicității (4).

Rezultatele obținute din testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* au fost comparate cu efectele de fototoxicitate/fotoiritare acută *in vivo* la animale și oameni și s-a dovedit că testul oferă o posibilitate excelentă de anticipare a efectelor respective. Testul nu este destinat pentru anticiparea altor efecte adverse care pot să apară în urma acțiunii combinate a produsului chimic și a luminii, de exemplu fotogenotoxicitatea, fotoalergia și fotocarcinogenitatea, deși multe produse chimice care prezintă proprietățile specifice menționate reacționează pozitiv la testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*. În plus, testul nu este destinat să permită o evaluare a gradului de fototoxicitate.

În apendice se propune un procedeu secvențial pentru determinarea fototoxicității produselor chimice.

1.2. **Definiții**

*Iradianța:*intensitatea luminii ultraviolete (UV) sau vizibile incidente pe o suprafață, măsurată în W/m^2 sau mW/cm^2.

Doza de lumină: cantitatea (= intensitatea × timp) de lumină ultravioletă (UV) sau vizibilă incidentă pe o suprafață, exprimată în jouli (= W × s) pe unitatea de suprafață, de exemplu J/m^2 sau J/cm^2.

Benzi de lungimi de undă a luminii UV: specificațiile recomandate de CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) sunt: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) și UVC (100-280 nm). Se utilizează și alte specificații: limita dintre UVB și UVA este plasată adesea la 320 nm și UVA se poate diviza în UV-A1 și UV-A2, limita dintre acestea fiind situată la aproximativ 340 nm.

Viabilitatea celulară: parametru ce reprezintă măsura activității totale a populației de celule (de exemplu fixarea colorantului vital roșu neutru în lizozomii celulari) care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor.

Viabilitatea celulară relativă: viabilitatea celulară exprimată în funcție de probele martor negative (solvent) prelevate pe toată durata realizării testului (fie + UV, fie – UV), dar care nu au fost tratate cu un produs chimic.

Model predictiv: un algoritm utilizat pentru transformarea rezultatelor unui test de toxicitate într-o estimare a potențialului toxic. În prezenta linie directoare, se pot utiliza PIF și MPE pentru transformarea rezultatelor testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* într-o anticipare a potențialului fototoxic.

PIF (photo irritation factor – factor de fotoiritare): factor obținut prin compararea a două concentrații citotoxice la fel de eficiente (EC_{50}) ale produsului chimic de testat în absența (– UV) și în prezența (+ UV) unei iradieri necitotoxice cu lumină UV/vizibilă.

MPE (mean photo effect – fotoefect mediu): o măsură nouă, rezultată din analiza matematică a traseului complet a două curbe concentrație-răspuns obținute fără (– UV) și cu (+ UV) iradiere necitotoxică cu lumină UVA/vizibilă.

Fototoxicitate: reacție toxică acută care apare după o primă expunere a pielii la anumite produse chimice și expunere ulterioară la lumină sau care este indusă în mod similar prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unui produs chimic.

Fotoiritare: termen ce indică o subcategorie a termenului «fototoxicitate», care se utilizează pentru a descrie doar acele reacții fototoxice care se manifestă la nivelul pielii după expunerea (locală sau orală) la produse chimice. Aceste reacții citotoxice conduc întotdeauna la deteriorarea nespecifică a celulelor (reacții de tipul arsurilor solare).

Fotoalergie: o reactivitate imunologică dobândită, care nu apare la prima expunere la un produs chimic și la lumină și necesită o perioadă de inducție de una sau două săptămâni înainte de a fi posibil să se pună în evidență reactivitatea cutanată.

Fotogenotoxicitate: o reacție genotoxică observată la un parametru genetic, care apare după expunerea celulelor la o doză negenotoxică de lumină UV/vizibilă și la un produs chimic negenotoxic.

Fotocarcinogenitate: carcinogenitate indusă prin expunere repetată la lumină și la un produs chimic. Termenul «fotococarcinogenitate» se utilizează atunci când efectul tumorigen indus de UV este accentuat de expunerea la un produs chimic.

1.3. **Substanțe de referință**

În afară de substanței chimice clorpromazină utilizate ca martor pozitiv, care ar trebui să fie testată în paralel ca substanță de referință în fiecare test, pentru reînnoirea testului de fototoxicitate 3T3 NRU, se recomandă utilizarea ca substanțe de referință a unei subgrupe de produse chimice utilizate în experimentele interlaboratoare la prezentul test (1) (3) (13).

1.4. **Considerații inițiale**

S-au semnalat efecte fototoxice pentru multe tipuri de produse chimice (5) (6) (7) (8). Singura trăsătură comună este capacitatea acestor substanțe de a absorbi energia luminoasă din domeniul luminii solare. Conform primii legi din fotochimie (legea lui Grotthaus-Draper), reacția fotochimică necesită absorbția unui număr suficient de quante de lumină. Astfel, înainte de a avea în vedere realizarea unui test biologic în conformitate cu prezenta linie directoare, se recomandă determinarea unui spectru de absorbție UV/vizibil a produsului chimic analizat (de exemplu conform liniei directoare 101 a OCDE pentru teste). Dacă un coeficient de extincție/absorbție molară este mai mic de 10 litru × mol^{-1} × cm^{-1}, produsul chimic respectiv nu posedă potențial fotoreactiv și nu este necesar să fie supus la testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* sau la orice alt test biologic pentru efecte fotochimice adverse (apendicele).

1.5. **Principiul metodei de testare**

Sunt identificate patru mecanisme prin care lumina absorbită de un cromofor (chimic) poate antrena o reacție fototoxică (7). Toate aceste mecanisme conduc la o degradare celulară. Prin urmare, testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* se întemeiază pe o comparare a citotoxicității unui produs chimic atunci când este testat cu expunere sau fără expunere la o doză necitotoxică de lumină UVA/vizibilă. În prezentul test, citotoxicitatea se exprimă printr-o diminuare, dependentă de concentrație, a colorantului vital roșu neutru (NR) fixat (9) după 24 de ore de la tratarea cu produsul chimic testat și iradierea acestuia.

Celulele Balb/c 3T3 sunt păstrate în cultură timp de 24 de ore pentru formarea monostraturilor. Pentru fiecare produs chimic de testat, câte două plăci cu 96 de cavități se supun la preincubare cu opt concentrații diferite ale produsului chimic timp de 1 oră. Apoi, una dintre cele două plăci este expusă la o doză de lumină UVA/vizibilă necitotoxică, de 5 J/cm^2 UVA (experimentul + UV), iar cealaltă placă se păstrează la întuneric (experimentul –UV). În ambele plăci, mediul de tratare este apoi înlocuit cu mediul de cultură și după alte 24 de ore de incubare se determină viabilitatea celulară prin fixarea colorantului roșu neutru (NRU) timp de 3 ore. Viabilitatea celulară relativă, exprimată în procente din probele martor negative netratate, se calculează pentru fiecare dintre cele opt concentrații de testare. Pentru estimarea potențialului fototoxic, se compară răspunsurile la concentrații, obținute în prezența (+ UV) și absența (– UV) iradierii, de obicei la nivelul EC_{50}, adică la concentrația inhibitoare cu 50 % a viabilității celulare în raport cu probele martor netratate.

1.6. **Criterii de calitate**

Sensibilitatea la UVA a celulelor, date anterioare: ar trebui ca sensibilitatea celulelor la UVA să fie verificată periodic. Celulele se însămânțează la densitatea utilizată în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, a doua zi se supun iradierii cu doze UVA de 1-9 J/cm^2 și se determină viabilitatea celulară o zi mai târziu printr-un test NRU. Dacă, după o iradiere cu 5 J/cm^2 UVA, viabilitatea celulară nu este mai mică de 80 % din viabilitatea probelor martor ținute la întuneric, celulele satisfac criteriile de calitate. La doza maximă de UVA, de 9 J/cm^2, viabilitatea ar trebui să nu fie mai mică de 50 % din cea a probelor martor ținute la întuneric. Această verificare ar trebui să se repete aproximativ la fiecare a 10-a reînsămânțare a celulelor.

Sensibilitatea la UVA a celulelor de probe martor negative, testul curent: dacă probele martor negative [celule în soluție salină echilibrată Earl (EBSS)] cu sau fără 1 % dimetilsulfoxid (DMSO) sau 1 % etanol (EtOH) în experimentul + UVA prezintă o viabilitate care nu este mai mică de 80 % din cea a celulelor neiradiate aflate în același solvent, într-un experiment la întuneric (– UVA) realizat în paralel, testul îndeplinește criteriile de calitate.

Viabilitatea probelor martor negative: densitatea optică absolută ($DO_{540\ NRU}$) măsurată în extractul NR al probelor martor negative indică dacă cele 1×10^4 celule însămânțate în fiecare cavitate se dezvoltă la dublarea normală a timpului în cele două zile cât durează testul. Dacă valoarea medie a $DO_{540\ NRU}$ pentru probele martor netratatate este ≥ 0,2, testul îndeplinește criteriile de acceptare.

Proba martor pozitivă: un produs chimic fototoxic cunoscut se supune testării în paralel cu fiecare test de fototoxicitate 3T3 NRU. Clorpromazina (CPZ) s-a utilizat ca probă martor pozitivă în studiul de validare UE/COLIPA și, prin urmare, este cea recomandată. Pentru CPZ, testată conform protocolului standard în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, s-au stabilit următoarele criterii de acceptare a testului: CPZ iradiată (+ UVA): EC_{50} = 0,1-2,0 µg/ml, CPZ neiradiată (– UVA): EC_{50} = 7,0-90,0 µg/ml. Factorul de fotoiritare (PIF), adică variația EC_{50} ar trebui să fie de cel puțin 6.

În locul CPZ, se pot utiliza ca probe martor pozitive, testate în paralel, alte produse chimice fototoxice cunoscute, ce corespund clasei de produse chimice sau caracteristicilor de solubilitate ale produselor chimice de testat. În acest caz, în funcție de datele anterioare, se recomandă stabilirea specifică a limitelor pentru valorile EC_{50} și a PIF sau MPE (fotoefectul mediu) drept criterii de acceptare pentru test.

1.7. **Descrierea metodei de testare**

1.7.1. *Preparatele*

1.7.1.1. Celulele

În studiul de validare s-a utilizat o linie permanentă de celule fibroblaste de șoarece -- Balb/c 3T3, clona 31 – provenind fie de la ATCC (American Type Culture Collection), fie de la ECACC (European Collection of Cell Cultures) și, prin urmare, este cea recomandată. Dacă se adaptează condițiile de cultură la nevoile specifice ale celulelor, se pot utiliza cu succes alte celule sau linii celulare pentru același protocol al testului, cu condiția demonstrării echivalenței.

Celulele ar trebui să fie controlate cu regularitate pentru a verifica absența contaminării acestora cu micoplasmă și ar trebui să fie utilizate numai dacă rezultatele acestui control sunt satisfăcătoare.

Deoarece sensibilitatea la UVA a celulelor poate să crească cu numărul de reînsămânțări, ar trebui să se utilizeze celulele Balb/c 3T3 cu cel mai mic număr de reînsămânțări posibile, de preferință mai mic de 100. Este important ca sensibilitatea la UVA a celulelor Balb/c 3T3 să fie controlată cu regularitate în conformitate cu procedura pentru controlul calității descrisă în prezenta linie directoare.

1.7.1.2. Mediile și condițiile de cultură

Se recomandă utilizarea unor medii de cultură și condiții de incubare corespunzătoare la reînsămânțarea sistematică a celulelor și în timpul procedurii de testare. Pentru celulele Balb/c 3T3, mediul de cultură este DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) îmbogățit cu 10 % ser de viței nou-născut, 4 mM de glutamină, penicilină și streptomicină; incubarea în atmosferă umidificată la 37 °C/7,5 % CO_2. Este deosebit de important ca aceste condiții de cultură celulară să asigure o durată a ciclului celular în limitele normale pentru celulele sau linia celulară utilizată.

1.7.1.3. Pregătirea culturilor

Celulele din cultura de rezervă congelată se însămânțează în mediul de cultură la o densitate corespunzătoare și se reînsămânțează cel puțin o dată înaintea zilei în care se utilizează în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*.

Pentru testul de fototoxicitate, celulele sunt însămânțate în mediul de cultură la o anumită densitate, astfel încât culturile să nu ajungă la confluență înainte de încheierea testului, adică atunci când se determină viabilitatea celulară după 48 de ore de la însămânțarea celulelor. Pentru celulele Balb/c 3T3 cultivate pe plăci cu 96 de cavități, densitatea celulară recomandată este de 1×10^4 celule per cavitate.

Pentru fiecare produs chimic testat, însămânțarea celulelor este identică pe cele două plăci separate, cu câte 96 de cavități, care se utilizează apoi concomitent pe toată durata testului în condiții de cultură identice, cu excepția intervalului de timp în care o placă este iradiată (+ UVA/vizibilă) și cealaltă este păstrată la întuneric (– UVA/vizibilă).

1.7.1.4. Activarea metabolică

În timp ce utilizarea sistemelor de activare metabolică este o cerință generală pentru toate testele *in vitro* utilizate pentru estimarea potențialului genotoxic și cancerigen, în cazul fototoxicologiei, nu se cunoaște până în prezent nici un produs chimic care să necesite o transformare metabolică pentru a acționa ca o fototoxină *in vivo* sau *in vitro*. În consecință, nici nu se consideră ca fiind necesar, nici nu se justifică din punct de vedere științific ca prezentul test să se realizeze cu un sistem de activare metabolică.

1.7.1.5. Produsul chimic de testat/prepararea

Produsele chimice de testat trebuie să fie proaspăt preparate chiar înaintea utilizării, cu excepția cazului în care datele de stabilitate dovedesc o conservare care poate fi acceptată. Atunci când este posibilă o fotodegradare rapidă, poate fi necesară prepararea în lumină roșie.

Produsele chimice de testat ar trebui să fie dizolvate în soluții saline tamponate, de exemplu soluție salină echilibrată Earl (EBSS) sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), care, pentru a evita interferența în timpul iradierii, nu trebuie să conțină componente proteinice și indicatori de pH coloraţi care absorb lumina.

Produsele chimice de testat cu solubilitate limitată în apă ar trebui să fie dizolvate în solvenți corespunzători la concentrații de 100 de ori mai mari decât cele dorite în final și soluțiile obținute să fie apoi diluate 1:100 cu soluție salină tamponată. Dacă se utilizează un solvent, acesta trebuie să fie prezent în volum constant de 1 % (volum/volum) în toate culturile, adică în probele martor negative, precum și în toate concentrațiile produsului chimic de testat.

Solvenții recomandați sunt dimetilsulfoxidul (DMSO) și etanolul (EtOH). Pot să fie corespunzători și alți solvenţi cu citotoxicitate redusă (de exemplu acetona), dar se recomandă o evaluare atentă a proprietăților specifice ale acestora, de exemplu reacția cu produsul chimic de testat, atenuarea efectului fototoxic, proprietățile de fixare a radicalilor.

Pentru facilitarea solubilizării, se pot utiliza, cumulativ sau alternativ, agitatorul Vortex, sonicarea și încălzirea până la 37 °C.

1.7.1.6. Iradierea UV/prepararea

Sursa de lumină: alegerea unei surse de lumină corespunzătoare și a unei filtrări corespunzătoare reprezintă factorul cel mai important pentru realizarea testului de fototoxicitate. Domeniile UVA și de lumină vizibilă sunt asociate adesea cu fotosensibilizarea (7) (10), în timp ce domeniul UVB prezintă o mai mică importanță din acest punct de vedere, deoarece este puternic citotoxic în mod direct, fototoxicitatea acestuia crescând de o mie de ori de la 313 nm la 280 nm (11). Criteriile pentru alegerea unei surse corespunzătoare de lumină ar trebui să includă cerința esențială ca sursa de lumină să emită lungimile de undă absorbite de produsul chimic de testat și ca doza de lumină (care se poate obține într-un timp rezonabil) să fie suficientă pentru detectarea substanțelor fotosensibilizante cunoscute. În plus, lungimile de undă și dozele utilizate nu ar trebui să dăuneze în mod nejustificat sistemului, în special în ceea ce privește emisia de căldură (domeniul infraroșu).

Simularea luminii solare cu ajutorul simulatorilor solari se consideră a fi sursa optimă de lumină. În simulatoarele solare se utilizează atât arcurile cu xenon, cât și arcurile cu mercur (dopat) sau arcurile cu halogenuri metalice. Acestea din urmă prezintă avantajul că emit mai puțină căldură și sunt mai ieftine, dar reproducerea luminii solare nu este perfectă. Deoarece toate simulatoarele solare emit cantități importante de UVB, aceastea ar trebui să fie prevăzute cu filtre corespunzătoare pentru atenuarea lungimilor de undă UVB puternic citotoxice.

Pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, ar trebui să se utilizeze un spectru de iradianță practic lipsit de UVB (UVA:UVB ˜ 1:20). A fost publicat un exemplu de distribuție a iradianței spectrale la un simulator solar cu filtru, utilizat în studiul de validare a testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* (3).

Dozimetria: intensitatea luminii (iradianța) ar trebui să fie controlată cu regularitate înaintea fiecărui test de fototoxicitate, cu ajutorul unui radiometru UV cu bandă lată corespunzător. Radiometrul UV trebuie să fie etalonat în funcție de sursă. Performanța radiometrului UV ar trebui să fie controlată și pentru aceasta se recomandă un al doilea radiometru UV de referință, de același tip și etalonat în același mod. Ar fi ideal ca, la intervale mai mari, să se utilizeze un spectroradiometru pentru măsurarea iradianței spectrale a sursei de lumină filtrată și controlul etalonării radiometrului UV cu bandă largă, dar aceste instrumente necesită operații de înaltă performanță realizate de un personal calificat corespunzător.

În studiul de validare, s-a stabilit că o doză de 5 J/cm^2 (UVA) nu este citotoxică pentru celulele Balb/c 3T3, dar este suficient de puternică pentru a excita chiar și produsele chimice puțin fototoxice. Pentru a obține 5 J/cm^2 într-un timp de 50 de minute, iradianța trebuie să fie reglată la 1,666 mW/cm^2. Dacă se utilizează o altă linie de celule sau o sursă diferită de lumină, s-ar putea să fie necesară o ușoară reglare a dozei de UVA, prin respectarea criteriului conform căruia doza reespectivă nu trebuie să fie nocivă pentru celule, dar să fie suficientă pentru detectarea fototoxinelor standard. Timpul de expunere la lumină se calculează cu următoarea relație:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Doza de radiații (J/cm}^2) \times 1\,000}{\text{Iradianță (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$$

1.7.2. *Condițiile de testare*

Concentrația maximă a produsului chimic de testat nu trebuie să fie mai mare de 100 µg/ml, deoarece toate produsele chimice fototoxice au fost detectate la concentrații mai mici, în timp ce la concentrații mai mari, crește incidența rezultatelor fals pozitive (supraestimărilor) (13). PH-ul la concentrațiile cele mai mari ale produsului chimic de testat ar trebui să fie satisfăcător (limitele pH-ului: 6,5-7,8).

Limitele concentrațiilor unui produs chimic testat în prezența (+ UVA) și în absența (– UVA) luminii ar trebui să fie determinate în mod specific prin încercări prealabile. Limitele și intervalele unei serii de concentrații se reglează, astfel încât datele experimentale să confirme în mod satisfăcător curbele concentrație-răspuns. Ar trebui să se utilizeze o progresie geometrică a concentrațiilor (cu un factor de diluție constant).

1.7.3. *Modul de lucru* [1]

1.7.3.1. Prima zi

Se prepară o suspensie celulară de 1×10^5 celule/ml în mediul de cultură și se scurg 100 µl din mediul de cultură doar în cavitățile periferice ale unei plăci de microtitrare a culturii de țesut, cu 96 de cavități (probe oarbe). În celelalte cavități, se toarnă 100 µl dintr-o suspensie celulară de 1×10^5 celule/ml (= 1×10^4 celule/cavitate). Pentru fiecare compus chimic testat, se pregătesc două plăci: una pentru determinarea citotoxicității (– UVA) și cealaltă pentru determinarea fotocitotoxicității (+ UVA).

Se incubează celulele timp de 24 de ore (7,5 % CO_2, 37 °C) până când acestea formează un monostrat semi-confluent. Timpul de incubare menționat permite recuperarea și aderența celulelor, precum și dezvoltarea exponențială.

1.7.3.2. A doua zi

După incubare, se decantează mediul de cultură de celule și se spală de două ori cu 150 µl de EBSS/PBS pentru fiecare cavitate. Se adaugă 100 µl de EBSS/PBS ce conțin concentrația corespunzătoare a produsului chimic de testat sau doar solvent (martorul negativ). Se aplică 8 concentrații diferite de produs chimic de testat. Se incubează celulele cu produsul chimic de testat la întuneric timp de 60 de minute (7,5 % CO_2, 37 °C).

Pentru a realiza partea (+ UVA) a testului, se iradiază celulele la temperatura camerei timp de 50 de minute, prin capacul plăcii cu 96 de cavități, cu 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Se ventilează cu un ventilator pentru a preveni condensarea apei de sub capac. Se păstrează dubluri ale plăcilor (– UVA) la temperatura camerei într-o cutie întunecată timp de 50 de minute (= timpul de expunere la UVA).

Soluția se decantează și se spală de două ori cu 150 µl EBSS//PBS. Se înlocuiește EBSS/PBS cu mediul de cultură și se incubează (7,5 % CO_2, 37 °C) peste noapte (18-22 de ore).

1.7.3.3. A treia zi

Evaluarea microscopică

Se examinează celulele la un microscop cu contrast de fază. Se înregistrează modificările morfologice ale celulelor datorită efectelor citotoxice ale produsului chimic testat. Acest control se recomandă pentru excluderea erorilor, dar observațiile nu se utilizează la evaluarea citotoxicității sau fototoxicității.

Testul de fixare a roșului neutru

Se spală celulele cu 150 µl de EBSS/PBS preîncălzită. Se elimină soluția de spălare prin lovire ușoară. Se adaugă 100 µl de mediu NR și se incubează la 37 °C în atmosferă umedă de 7,5 % CO_2, timp de 3 ore.

După incubare, se înlătură mediul NR și se spală celulele cu 150 µl de EBSS/PBS. Se decantează și se absoarbe complet EBSS/PBS. (Facultativ: se centrifughează placa răsturnată.)

Se adaugă exact 150 µl soluție (etanol/acid acetic proaspăt preparată) de desorbție a NR.

Se agită rapid placa de microtitrare pe un agitator pentru placa de microtitrare timp de 10 minute, până la extracția NR din celule și formarea unei soluții omogene.

Se măsoară densitatea optică a extractului de NR la 540 nm într-un spectrofotometru, utilizând probe oarbe pentru referință. Datele se salvează într-un format de fișier corespunzător (de exemplu, ASCII) pentru o analiză ulterioară.

2. **DATELE**

2.1. **Calitatea şi cantitatea datelor**

Datele ar trebui să permită o interpretare semnificativă a curbei concentrație-răspuns, obținută cu și fără iradiere cu lumină UVA/vizibilă. Dacă se constată o citotoxicitate, atât limitele concentrației, cât și intervalele concentrațiilor individuale ar trebui să fie stabilite, astfel încât să fie posibilă o concordanță a curbei cu datele experimentale. Datorită faptului că, în experimentul realizat la întuneric (– UVA), un produs chimic de testare ar putea să nu fie citotoxic până la concentrația limită determinată de 100 µg/ml, dar foarte citotoxic atunci când este iradiat (+ UVA), s-ar putea să fie necesară o variație cu câteva ordine de mărime a gamei de concentrații ce urmează să fie testate în ambele părți ale experimentului, pentru îndeplinirea cerințelor de calitate a datelor specifice. Dacă nu se constată citotoxicitate în ambele părți ale experimentului (– UVA și + UVA), este suficient să se realizeze testul cu un interval mare între fiecare doză până la concentrația maximă.

Nu se cere verificarea unui rezultat clar pozitiv prin repetarea experimentului. În plus, rezultatele clar negative nu trebuie verificate, cu condiția ca produsul chimic respectiv să fi fost testat în concentrații suficient de mari. În aceste cazuri, este suficient un singur experiment principal, susținut de una sau mai multe experimente preliminare pentru determinarea gamei de concentrații.

Testele cu rezultate la limită, aproape de pragul critic al modelului predictiv, ar trebui să fie repetate pentru verificare.

Dacă se consideră că este necesară repetarea testului, atunci s-ar putea ca modificarea condițiilor experimentale să fie importantă pentru obținerea unor rezultate clare. Prepararea soluțiilor de produs chimic de testat reprezintă un parametru important în prezentul test. Prin urmare, s-a putea ca modificarea acestor condiții (cosolvent, măcinare fină, sonicare) să fie de cea mai mare importanță în repetarea testului. O altă posibilitate ar fi variația timpului de incubare, preiradiere. Un timp mai scurt poate să fie relevant pentru produsele chimice instabile în apă.

2.2. **Prezentarea datelor**

Dacă este posibil, se determină concentrația unui produs chimic de testat care reflectă o inhibare cu 50 % a fixării roșului neutru de către celule (EC_{50}). Acest lucru se poate realiza prin aplicarea unei metode de regresie neliniară corespunzătoare (de preferință o funcție Hill sau o regresie logistică) pentru prelucrarea datelor de concentrație-răspuns sau prin utilizarea altor metode de ajustare (14). Înaintea utilizării EC_{50} pentru alte calcule, ar trebui să se controleze în mod corespunzător calitatea ajustării. O altă posibilitate ar fi utilizarea metodelor de ajustare grafică pentru calcularea EC_{50}. În acest caz, se recomandă utilizarea hârtiei semi-logaritmice (axa x: log, axa y: probit), deoarece în multe cazuri, funcția concentrație-răspuns devine aproape lineară după transformarea respectivă.

2.3. **Evaluarea rezultatelor (modelele predictive)**

2.3.1. *Modelul predictiv, versiunea 1: factorul de fotoiritare (PIF)*

Dacă, atât în prezența (+ UVA), cât și în absența (– UVA) luminii, se obțin curbe concentrație-răspuns complete, se calculează un factor de fotoiritare (PIF) cu ajutorul formulei următoare:

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

O valoare PIF < 5 indică absența potențialului fototoxic, în timp ce PIF ≥ 5 indică un potențial fototoxic.

Dacă un produs chimic este citotoxic doar în prezența luminii (+ UVA) și nu este citotoxic în condiții (– UVA), PIF nu se poate calcula, deși acest rezultat indică un potențial fototoxic. În aceste cazuri, se poate calcula o valoare «> PIF», dacă testul de citotoxicitate (– UV) se realizează până la concentrația experimentală maximă (C_{max}) și valoarea obținută se utilizează la calcularea «> PIF»:

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

Dacă este posibilă obținerea doar a unei valori «> PIF», atunci orice valoare > 1 indică un potențial fototoxic.

Dacă nu se pot calcula nici EC_{50} (– UV), nici EC_{50} (+ UV), datorită faptului că un produs chimic nu prezintă citotoxicitate până la concentrația experimentală maximă, acest lucru indică lipsa potențialului fototoxic. În aceste cazuri, se utilizează o valoare «PIF = *1» formal pentru caracterizarea rezultatului:

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

Dacă se poate obține doar o valoare «PIF = *1», aceasta indică lipsa potențialului fototoxic.

În cazurile (b) și (c), concentrațiile atinse în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* ar trebui să fie luate atent în considerație la estimarea potențialului fototoxic.

2.3.2. *Modelul predictiv, versiunea 2: fotoefectul mediu (MPE)*

Ca soluție alternativă, se poate aplica o nouă versiune a modelului pentru estimarea potențialului fototoxic, care a fost elaborată plecând de la datele studiului de validare UE/COLIPA (15) și experimentată în condiții oarbe într-un studiu ulterior privind fototoxicitatea *in vitro* a produselor chimice utilizate ca filtre UV (13). Modelul menționat permite depășirea limitelor modelului PIF pentru cazurile în care nu este posibilă obținerea unei valori a EC_{50}. Modelul utilizează «fotoefectul mediu» (MPE), care este o măsură bazată pe compararea curbelor concentrație-răspuns complete. Pentru aplicarea modelului MPE, la Universitatea Humboldt (Berlin) a fost elaborat un sistem special de programe de calculator, care se poate obține gratuit.

2.4. **Interpretarea rezultatelor**

Un rezultat pozitiv la testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* (PIF ≥ 5 sau MPE ≥ 0,1) indică faptul că substanța testată are potențial fototoxic. Dacă acest tip de rezultat se obține la concentrații mai mici de 10 μg/ml, este posibil ca produsul chimic testat să acționeze și ca fototoxină în diferite condiții de expunere *in vivo*. Dacă se obține un rezultat pozitiv doar la concentrația experimentală maximă de 100 μg/ml, s-ar putea să fie necesare alte investigații pentru evaluarea pericolului sau a puterii fototoxice. Acestea ar putea să includă studii privind penetrarea, absorbția și posibila acumulare a produsului chimic în piele sau supunerea acestuia la alt tip de test pentru confirmarea rezultatelor, de exemplu utilizarea unui model de piele umană *in vitro*.

Un rezultat negativ la testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* (PIF < 5 sau MPE < 0,1) indică faptul că substanța testată nu este fototoxică pentru cultura de celule de mamifere în condițiile utilizate. În cazurile în care este posibil ca produsul chimic să fie testat până la concentrația maximă de 100 μg/ml, un rezultat negativ indică faptul că produsul chimic nu are potențial fototoxic și că o fototoxicitate *in vivo* se poate considera ca fiind improbabilă. În cazurile în care s-au obținut răspunsuri concentrație-toxicitate (EC_{50} + UV și EC_{50} − UV) identice la concentrații mici, interpretarea datelor ar fi aceeași. În caz contrar, dacă nu s-a evidențiat nici o toxicitate (+ UV și − UV) și dacă solubilitatea în apă a limitat concentrațiile la valori mai mici de 100 μg/ml, atunci compatibilitatea produsului de testat cu tipul de test poate să fie discutabilă și ar trebui să se aibă în vedere un test de confirmare (de exemplu, utilizarea unui model de piele umană *in vitro* sau în *ex vivo* sau un test *in vivo*).

3. **RAPORTAREA**

Raportul testului

Raportul testului trebuie să includă următoarele informații:

Produsul chimic de testat:

— datele de identificare și nr. CAS, dacă se cunoaște;

— natura fizică și puritatea;

— proprietățile fizico-chimice relevante pentru realizarea studiului;

— stabilitatea și fotostabilitatea, dacă se cunosc.

Solventul:

— justificarea alegerii solventului;

— solubilitatea produsului chimic de testat în solventul ales;

— procentul de solvent prezent în mediul de tratare (EBSS sau PBS).

Celulele:

— tipul și sursa celulelor;

— absența micoplasmei;

— numărul de reînsămânțări ale celulelor, dacă se cunosc;

— sensibilitatea la UVA a celulelor, determinată cu aparatură de iradiere, utilizate în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*.

Condițiile de testare (a) – incubarea înainte și după tratament:

— tipul și compoziția mediului de cultură;

— condițiile de incubare (concentrația CO_2, temperatura, umiditatea);

— timpul de incubare (pretratare, post tratare).

Condițiile de testare (b) – tratamentul cu produsul chimic:

— justificarea concentrațiilor alese pentru produsul chimic de testat utilizat atât în prezența, cât și în absența iradierii cu limină UV/vizibilă;

— în cazul unei solubilități limitate a produsului chimic de testat și în absența citotoxicității, justificarea concentrației maxime utilizate;

— tipul și compoziția mediului de tratare (soluție salină tamponată);

— durata tratamentului chimic.

Condițiile de testare (c) – iradierea:

— justificarea alegerii sursei de lumină utilizate;

— caracteristicile iradianței spectrale a sursei de lumină;

— caracteristicile de transmisie/absorbție ale filtrului sau filtrelor utilizate;

— caracteristicile radiometrului și detalii privind etalonarea acestuia;

— distanța dintre sursa de lumină și sistemul experimental;

— iradianța UVA la distanța menționată, exprimată în mW/cm^2;

— timpul de expunere la lumină UV/vizibilă;

— doza UVA (iradianța × timp), exprimată în J/cm^2;

— temperatura utilizată la culturile de celule în timpul iradierii, precum și la culturile de celule păstrate în paralel la întuneric.

Condițiile de testare (d) – testul NRU:

— compoziția mediului NR;

— durata de incubare în NR;

— condițiile de incubare (concentrația CO_2, temperatura, umiditatea);

— condițiile de extracție a NR (agentul de extracție, timpul);

— lungimea de undă utilizată pentru citirea spectrofotometrică a densității optice a NR;

— a doua lungime de undă (de referință), dacă s-a utilizat;

— compoziția eșantionului utilizat la realizarea probei oarbe a spectrofotometrului, dacă s-a utilizat.

Rezultatele:

— viabilitatea celulară obținută la fiecare concentrație a produsului chimic de testat, exprimată în procente de viabilitate medie a martorilor;

— curbele concentrație-răspuns (concentrația produsului chimic de testat în funcție de viabilitatea celulară relativă), obținute în experimente + UVA și – UVA realizate în paralel;

— analiza datelor din curbele concentrație-răspuns: dacă este posibil, calcularea/determinarea valorilor pentru EC_{50} (+ UVA) și EC_{50} (– UVA);

— compararea celor două curbe concentrație-răspuns, obținute în prezența și în absența iradierii cu lumină UVA/vizibilă, fie prin calcularea factorului de fotoiritare (PIF), fie prin calcularea fotoefectului mediu (MPE);

— clasificarea potențialului fototoxic;

— criteriile de acceptare a testului (a) – martorul negativ paralel:

  — viabilitatea absolută (densitatea optică a extractului de NR) a celulelor iradiate și neiradiate;

  — date istorice cu privire la martorul negativ, deviația medie și deviația standard;

— criteriile de acceptare a testului (a) – martorul pozitiv paralel:

  — valorile EC_{50} (+ UVA) și EC_{50} (– UVA) și PIF pentru produsul chimic utilizat ca martor pozitiv;

  — date istorice cu privire la produsul chimic utilizat ca martor pozitiv: valorile EC_{50} (+ UVA) și EC_{50} (– UVA) și PIF, deviația medie și deviația standard.

Discutarea rezultatelor

Concluziile

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, p. 793-796.

(2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, pp. 7-8.

(3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA «In vitro phototoxicity» validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.

(6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.

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

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

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

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.

(11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pp. 1825-1829.

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

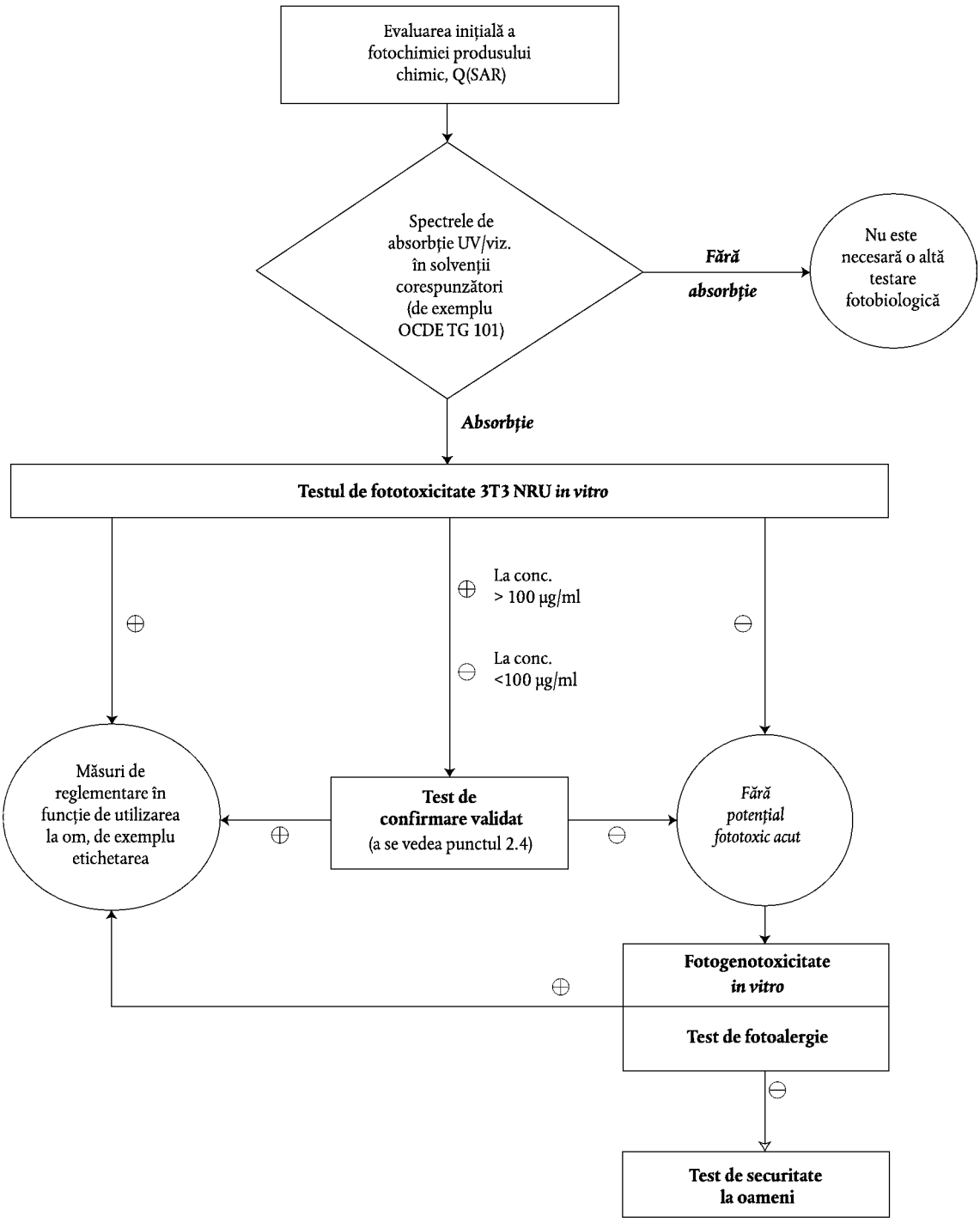
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity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

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

(15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, pp. 445-462.

Apendice

Rolul testului de fototoxicitate 3T3 NRU într-un procedeu secvențial de testare a fototoxicității produselor chimice



(1) Detalii suplimentare se pot găsi în referința (12) din bibliografie."