

ΟΔΗΓΙΑ 2000/33/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 25ης Απριλίου 2000

σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή έβδομη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικινδύνων ουσιών (*)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Έχοντας υπόψη:

Άρθρο 1

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

Τα κείμενα στα παραρτήματα I και II της παρούσας οδηγίας προστίθενται στο μέρος Β του παραρτήματος V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ.

την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουνίου 1967, περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικινδύνων ουσιών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 1999/33/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽²⁾, και ιδίως το άρθρο 28,

Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι απαραίτητες προκειμένου να συμμορφωθούν προς την παρούσα οδηγία έως την 1η Οκτωβρίου 2001 το αργότερο. Ενημερώνουν την Επιτροπή σχετικά.

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε οι διατάξεις που θεσπίζουν σχετικά να περιέχουν ή να συνοδεύονται από παραπομπή στην παρούσα οδηγία κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Τα κράτη μέλη καθορίζουν την μορφή της ως άνω αναφοράς.

(1) Επιβάλλεται να προσαρμοστεί στην τεχνική πρόοδο το παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ για τον καθορισμό των μεθόδων προσδιορισμού των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας των ουσιών και των σκευασμάτων.

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν στην Επιτροπή τις κύριες διατάξεις της εθνικής νομοθεσίας που θεσπίζουν στον τομέα της παρούσας οδηγίας παρέχοντας παράλληλα πίνακα συχετισμού μεταξύ των διατάξεων της οδηγίας και των αντιστοίχως θεσπιζόμενων εθνικών διατάξεων.

(2) Το άρθρο 7 παράγραφος 2 της οδηγίας 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Νοεμβρίου 1986, για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς⁽³⁾, προβλέπει ότι δεν εκτελούνται πειράματα με πειραματόζωα εφόσον το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα δύναται να επιτευχθεί με άλλη επιστημονικά αποδεκτή μέθοδο που είναι εύλογα και πρακτικά διαθέσιμη.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

(3) Έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές πειραματικές μέθοδοι που δεν περιλαμβάνουν τη χρήση ζώων για τον έλεγχο των χημικών. Αυτές οι μέθοδοι θα πρέπει να εισαχθούν στο παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

(4) Τα μέτρα που προβλέπει η παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο των οδηγιών που σχετίζονται με την εξάλειψη των τεχνικών φραγμών στο εμπόριο επικινδύνων ουσιών και παρασκευασμάτων,

Βρυξέλλες, 25 Απριλίου 2000.

Για την Επιτροπή
Margot WALLSTRÖM
Μέλος της Επιτροπής

(*) Εκδόθηκε πριν την εικοστή έκτη προσαρμογή.

⁽¹⁾ ΕΕ 196 της 16.8.1967, σ. 1.

⁽²⁾ ΕΕ L 199 της 30.7.1999, σ. 57.

⁽³⁾ ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

«B.40. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ΕΚΕΕΜ, Κοινό Κέντρο Ερευνών, Ευρωπαϊκή Επιτροπή) έχει εγκρίνει ως επιστημονικά έγκυρες δύο in vitro δοκιμές δερματικής διαβρωτικότητας, τη δοκιμασία διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER — transcutaneous electrical resistance) δέρματος επίμυος και δοκιμή που χρησιμοποιεί ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος (1) (2) (3). Η μελέτη επικύρωσης του ΕΚΕΕΜ κατέδειξε ότι και οι δύο δοκιμές είναι σε θέση να διακρίνουν με αξιόπιστο τρόπο γνωστές διαβρωτικές από μη διαβρωτικές ουσίες του δέρματος. Πέραν τούτου, το πρωτόκολλο της δοκιμής με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος, επέτρεψε ορθή διάκριση μεταξύ των διαφόρων βαθμών διαβρωτικών επιδράσεων (γνωστά ισχυρά διαβρωτικά του δέρματος, R35, και άλλα διαβρωτικά του δέρματος R34) (2). Η περιγραφή των δύο μεθόδων και η διαδικασία της δοκιμής παρέχονται κατωτέρω. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση τις ειδικές απαιτήσεις και τις προτιμήσεις του χρήστη.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Διάβρωση του δέρματος: είναι η πρόκληση μη αντιστρεπτής βλάβης στο δερματικό ιστό μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Ουδεμία, αλλά βλέπε σημεία 1.5.3.4 και 1.7.2.3.

1.4. Αρχή της μεθόδου — Δοκιμασία διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) δέρματος επίμυος

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο στις επιδερμικές επιφάνειες δίσκων δέρματος που έχουν ληφθεί από τις δορές νεαρών επιμύων οι οποίοι έχουν θανατωθεί με μη βάνουσο τρόπο. Τα διαβρωτικά υλικά προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της ακεραιότητας της κερατίνης στιβάδας και της φρακτικής λειτουργίας, η οποία μετράται ως μείωση της εγγενούς διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα ενός κατώτατου ορίου (5 kΩ) (4) (5). Ερεθιστικά και μη ερεθιστικά υλικά δεν προκαλούν μείωση της TER σε επίπεδα χαμηλότερα του κατώτατου ορίου. Στη διαδικασία της δοκιμής μπορεί να ενσωματωθεί ένα στάδιο δέσμωσης χρωστικής για τις τασιενεργές ουσίες και τις ουδέτερες οργανικές ενώσεις (για τους ορισμούς βλέπε υποσημείωση 6) ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ψευδοθετικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με χημικές ουσίες αυτού του τύπου συγκεκριμένα (2) (7).

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής — δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

1.5.1. Πειραματόζωα

Για την προετοιμασία των δίσκων δέρματος απαιτούνται νεαροί (20-23 ημερών) επίμυες (στέλεχος Wistar ή παρόμοιο). Αφαιρείται επιμελώς το τρίχωμα από την περιοχή της ράχης και των πλευρών με μικρή ξυριστική μηχανή για ζώα. Τα πειραματόζωα εκπλύνονται και σφουγγίζονται επιμελώς ενώ η περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (που περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομικίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη ή αμφοτερικίνη, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης). Τα πειραματόζωα εκπλύνονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα με την πρώτη έκπλυση και χρησιμοποιούνται εντός τριών ημερών (η ηλικία των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 31 ημέρες για την προετοιμασία της δοράς).

1.5.2. Προετοιμασία των δίσκων δέρματος

Τα πειραματόζωα θανατώνονται με μη βάνουσο τρόπο. Αφαιρείται το δέρμα από τη ράχη κάθε ζώου και απαλλάσσεται από την περίσσεια λίπους με προσεκτική απομάκρυνσή του από το δέρμα. Η δορά τοποθετείται επάνω από το άκρο σωλήνα πολυτετραφθωροαιθυλενίου (PTFE) με τρόπο ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με το σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου Ο ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ η περίσσεια ιστών αποκόπτεται. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου παρέχονται στο σχήμα 1. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου Ο με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με τη βοήθεια βαζελίνης Ο σωλήνας στηρίζεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα ενός υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θεικού μαγνησίου (154 mM) (σχήμα 2).

1.5.3. Διαδικασία δοκιμής

1.5.3.1. Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες (150 μl) εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα (σχήμα 2). Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα στερεού υλικού στο δίσκο ώστε να καλύπτεται το σύνολο της επιφάνειας της επιδερμίδας. Στη συνέχεια, 150 μl απιονισμένου νερού προστίθενται στο στερεό υλικό και οι σωλήνες αναδεύονται ήπια. Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να είναι σε μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα. Για ορισμένα στερεά αυτό μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση στους 30 °C κατ' ανώτατο όριο και τήξη της ελεγχόμενης ουσίας ή με άλεσμα ώστε να ληφθεί κοκκοποιημένο υλικό ή σκόνη.

Για κάθε ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι ελεγχόμενες ουσίες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες (βλέπε επίσης 1.5.3.4). Στη συνέχεια εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας έως 30 °C έως ότου απομακρυνθούν πλήρως. Η απομάκρυνση ελεγχόμενων ουσιών που έχουν στερεοποιηθεί στο εσωτερικό του σωλήνα είναι δυνατόν να διευκολυνθεί με εκτόξευση θερμού νερού θερμοκρασίας 30 °C περίπου.

1.5.3.2. Μετρήσεις TER

Η TER μετράται με τη βοήθεια γέφυρας δεδομένων (databridge) που λειτουργεί με εναλλασσόμενο ρεύμα και χαμηλή τάση (π.χ. AIM 401 ή 6401 ή αντίστοιχη). Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελατώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70 % στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα λεπτά αργότερα, ο σωλήνας αντιστρέφεται για να απομακρυνθεί η αιθανόλη και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3 ml διαλύματος θεικού μαγνησίου (154 mM). Τα ηλεκτρόδια της γέφυρας δεδομένων τοποθετούνται σε μια από τις δύο πλευρές του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (σχήμα 2). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του ηλεκτροδίου που βρίσκεται κάτω από τους σφιγκτήρες τύπου κροδοδείλου παρέχονται στο σχήμα 1. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού (χονδρού) ηλεκτροδίου τοποθετείται στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης ώστε να εξασφαλίζεται η εμφύσηση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα θεικού μαγνησίου. Το εξωτερικό (λεπτό) ηλεκτρόδιο τοποθετείται εντός του υποδοχέα με τρόπο ώστε να ακουμπάει στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ βάσης του ελιπηρωτού σφιγκτήρα και της βάσης του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (σχήμα 1) δεδομένου ότι επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή της αντίστασης.

Σημειώνεται ότι αν η μετρούμενη τιμή της αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό μπορεί να οφείλεται στην ελεγχόμενη ουσία που επικαλύπτει την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί απομάκρυνση της ουσίας αυτής με ανάδευση του σωλήνα PTFE επί 10 δευτερόλεπτα περίπου αφού καλυφθεί το στόμιο του με τον προστατευόμενο με γάντι αντίχειρα. Το διάλυμα θεικού μαγνησίου αποχύνεται και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της αντίστασης με νέο διάλυμα θεικού μαγνησίου.

Οι μέσες μετρούμενες τιμές TER γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονες τους θετικές και αρνητικές τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές ημών. Οι υποδεικνυόμενες ουσίες μάρτυρες και οι αντίστοιχες αποδεκτές περιοχές ημών ηλεκτρικής αντίστασης για τη περιγραφόμενη μεθοδολογία και συσκευή έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ (36%) 10 M	0,5-1,0
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	10-25

1.5.3.3. Τροποποιημένη διαδικασία για τασιενεργές ουσίες ουδέτερες οργανικές ενώσεις

Εάν οι τιμές TER ελεγχόμενων ουσιών που εμπίπτουν στην κατηγορία των τασιενεργών ουσιών ή των ουδέτερων οργανικών ενώσεων είναι μικρότερες από ή ίσες με 5 kΩ, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της διείσδυσης χρωστικής στους ιστούς. Με τη διαδικασία αυτή θα προσδιοριστεί κατά πόσο τα αποτελέσματα είναι ψευδοθετικά (2).

1.5.3.3.1. Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωματικής ουσίας σουλφοροδαμίνης Β

Μετά την αρχική κατεργασία με την ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για δύο ώρες, 150 ml διαλύματος σουλφοροδαμίνης Β σε απεσταγμένο νερό 10 % (w/v). Στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας δωματίου επί 10 δευτερόλεπτα περίπου ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Εκαστος των δίσκων δέρματος αφαιρείται από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται με φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια αναδεύονται ήπια επί 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν επιπλέον περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση με τρεχούμενο νερό και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ml διαλύματος δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) σε απεσταγμένο νερό 30 % (w/v). Τα φιαλίδια αφήνονται προς επώαση στους 60 °C επί μια νύχτα. Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγόκεντρος δύναμη ~ 175). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 (ω/ω) [δηλ. 1 ml+4 ml] με διάλυμα 30 % (w/v) SDS σε απεσταγμένο νερό. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος μετράται στα 565 nm περίπου.

1.5.3.3.2. Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική

Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές οπτικής πυκνότητας (συντελεστής μοριακής απόσβεσης της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = $8,7 \times 10^4$ μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα εκάστου δίσκου δέρματος σε σουλφοροδαμίνη Β και κατόπιν υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τις επαναλήψεις. Οι μέσες τιμές δέσμησης χρωστικής γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονες τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές τιμών. Οι υποδεικνυόμενες αποδεκτές περιοχές τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και για τη συσκευασία που περιγράφονται έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Περιοχή τιμών περεκτικότητων σε χρωστική/ (μg/δίσκο)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ (36%) 10 M	40-100
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	15-35

1.5.3.4. Πρόσθετες πληροφορίες

Οι ελεγχόμενες ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται στους δίσκους δέρματος για βραχύτερα χρονικά διαστήματα (π.χ. 2 ώρες) προκειμένου να εντοπίζονται υλικά που προκαλούν ισχυρή διάβρωση. Η μελέτη επικύρωσης, ωστόσο, κατέδειξε ότι η δοκιμασία TER οδήγησε σε υπερεκτίμηση του διαβρωτικού δυναμικού διαφόρων ελεγχόμενων χημικών ουσιών μετά τη διατήρησή τους σε επαφή με τους δίσκους δέρματος επί δύο ώρες (2), ενώ με την εικοσιτετράωρη διαδικασία επέτρεψε τον ορθό προσδιορισμό των διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ουσιών.

Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία μπορούν να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το κατώτατο όριο διάβρωσης των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο. Σε περίπτωση σημαντικής μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του κατώτατου ορίου αντίστασης μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία θα επιλεγούν μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (3).

1.6. Αρχή της μεθόδου δοκιμής — Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται τοπικά επί 4 ώρες κατ' ανώτατο όριο, στο τρισδιάστατο ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος το οποίο περιλαμβάνει αναπλασθείσα επιδερμίδα με λειτουργική κερατίνη στοιβάδα. Τα διαβρωτικά υλικά ταυτοποιούνται με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (όπως προσδιορίζεται π.χ. με τη δοκιμασία αναγωγής του MTT) σε επίπεδα χαμηλότερα των καθορισθέντων κατωτάτων ορίων σε συγκεκριμένες περιόδους έκθεσης. Η αρχή της δοκιμασίας στηρίζεται στο σκεπτικό ότι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι εκείνες που μπορούν να διεισδύσουν στην κερατίνη στοιβάδα (με διάχυση ή διάβρωση) και είναι ακούντως κυτταροτοξικές ώστε να προκαλούν το θάνατο των κυττάρων στις υποκείμενες κυτταρικές στοιβάδες.

1.7. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής — Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

1.7.1. Ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος

Τα ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος είναι δυνατόν να προέρχονται από διάφορες πηγές, αλλά πρέπει να ικανοποιούν ορισμένα κριτήρια. Το ομοίωμα πρέπει να έχει μια λειτουργική κερατίνη στοιβάδα με υπόστρωμα ζώντων κυττάρων. Η φρακτική λειτουργία της κερατίνης στοιβάδας πρέπει να είναι επαρκής. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί καταδεικνύοντας την αντοχή του ομοιώματος στην κυτταροτοξικότητα μετά την εφαρμογή ουσιών οι οποίες είναι γνωστές ως κυτταροτοξικές αλλά δεν διαπερνούν την κερατίνη στοιβάδα. Πρέπει επίσης να καταδεικνύεται ότι με το ομοίωμα αυτό λαμβάνονται αναπαραγωγίμα αποτελέσματα υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Η βιωσιμότητα των ζώντων κυττάρων του ομοιώματος πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να γίνεται σαφής διάκριση μεταξύ των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Η κυτταρική βιωσιμότητα (όπως προκύπτει, επί παραδείγματι, από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT, δηλαδή σε τιμή οπτικής πυκνότητας) μετά την έκθεση σε αρνητικό μάρτυρα πρέπει να εμπίπτει στα αποδεκτά όρια για το συγκεκριμένο ομοίωμα. Ομοίως, οι τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας που λαμβάνονται με θετικό μάρτυρα (έναντι των αντίστοιχων που λαμβάνονται με αρνητικό μάρτυρα) πρέπει να βρίσκονται εντός καθορισμένων ορίων. Το χρησιμοποιούμενο προγνωστικό μοντέλο πρέπει να ανταποκρίνεται απαραίτητως στα διεθνή πρότυπα επικύρωσης (2).

1.7.2. Διαδικασία δοκιμής

1.7.2.1. Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Προκειμένου για υγρά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος (τουλάχιστον 25 μl/cm²). Προκειμένου για στερεά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει το δέρμα και στη συνέχεια η στερεά ουσία υγραίνεται για να εξασφαλιστεί καλή επαφή με το δέρμα. Εφόσον απαιτείται, τα στερεά κοινοποιούνται πριν από την χρησιμοποίησή τους. Η μέθοδος εφαρμογής πρέπει να είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών (2). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης το ελεγχόμενο υλικό εκπλύνεται επιμελώς από την επιφάνεια του δέρματος με αλατούχο διάλυμα.

1.7.2.2. Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

Για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί οιαδήποτε επικυρωμένη ποσοτική μέθοδος. Η πλέον χρησιμοποιούμενη δοκιμασία είναι η αναγωγή MTT η οποία παρέχει ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα σε διάφορα εργαστήρια (2). Ο δίσκος δέρματος εμβαπτίζεται σε διάλυμα MTT συγκεντρώσεως 0,3 mg/ml στους 20-28 °C επί 3 ώρες. Το προκύπτον κυανούν ίζημα φορμαυαν εκχυλίζεται (εκχύλιση με διαλύτη) και η συγκέντρωση της φορμαυαν υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 545 και 595 nm.

1.7.2.3. Πρόσθετες πληροφορίες

Το είδος του χρησιμοποιηθέντος ομοιώματος δέρματος και το ακριβές πρωτόκολλο του χρόνου έκθεσης και των διαδικασιών έκπλυσης κ.λπ. επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα αποτελέσματα. Συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του προγνωστικού μοντέλου μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία επιλέγονται μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΕΚΕΕΜ (3). Η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος είναι απαραίτητο να έχει αποδειχθεί αναπαραγώγιμη εντός και μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα. Η μέθοδος πρέπει να ανταποκρίνεται τουλάχιστον στα κριτήρια επιστημονικής επικύρωσης που καθορίζονται προηγουμένως (2) και τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσης να δημοσιεύονται σε έγκυρο επιστημονικό περιοδικό του οποίου τα άρθρα εγκρίνονται από ομότιμους αξιολογητές.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

2.1.1. Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Οι τιμές ηλεκτρικής αντίστασης σε $k\Omega$ του ελεγχόμενου υλικού, των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και τυχόν προτύπων χημικών ουσιών αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου θα περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.1.2. Δοκιμασία με ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας και τα υπολογισθέντα δεδομένα εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

2.2.1. Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Όταν η μέση τιμή TER που λαμβάνεται για την ελεγχόμενη ουσία υπερβαίνει τα $5 k\Omega$ τότε η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται διαβρωτική. Εάν η τιμή TER είναι μικρότερη ή ίση των $5 k\Omega$, η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται διαβρωτική εφόσον δεν πρόκειται για τασιενεργό ουσία ή ουδέτερη οργανική ένωση.

Για τασιενεργές ουσίες ή ουδέτερες οργανικές ενώσεις για τις οποίες λαμβάνονται τιμές TER μικρότερες ή ίσες των $5 k\Omega$, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διείσδυσης χρωστικής. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική υπερβαίνει ή ισούται με την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλωρίο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι πραγματικά θετικό και η ουσία εφρείται επομένως διαβρωτική. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλωρίο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι ψευδοθετικό και η ουσία δεν είναι επομένως διαβρωτική.

2.2.2. Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Η τιμή οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα αντιπροσωπεύει κυτταρική βιωσιμότητα 100%. Ως εκ τούτου οι λαμβανόμενες για το ελεγχόμενο δείγμα τιμές οπτικής πυκνότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η διαχωριστική τιμή εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας βάσει της οποίας γίνεται διάκριση μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ελεγχόμενων υλικών (ή μεταξύ των διαφόρων βαθμών διάβρωσης) πρέπει να καθορίζεται σαφώς στο προγνωστικό μοντέλο πριν από την επικύρωση της μεθόδου, και η πραγματοποιούμενη στη συνέχεια μελέτη επικύρωσης πρέπει να καταδεικνύει την καταλληλότητα της διαχωριστικής αυτής τιμής (2).

3. ΕΚΘΕΣΕΙΣ

'Έκθεση της δοκιμής

Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— ταυτοποίηση, φυσική κατάσταση και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες. Ανάλογες πληροφορίες πρέπει να παρέχονται για τις τυχόν χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας δοκιμής που ακολουθήθηκε,

— περιγραφή και αιτιολόγηση τυχόν τροποποιήσεων.

Αποτελέσματα:

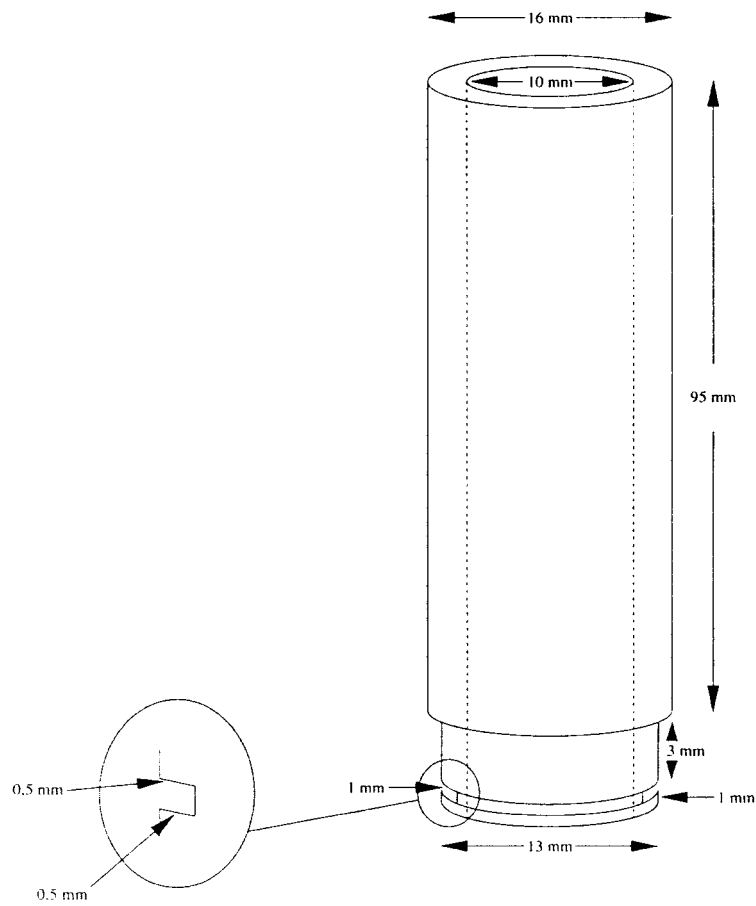
- παρουσίαση σε πίνακα των τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (δοκιμασία TER) ή των τιμών εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας (δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπου δέρματος) που ελήφθησαν για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων που προέκυψαν από τη επαναληπτικά πειράματα και των μέσων τιμών,
- περιγραφή τυχόν άλλων επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων**Συμπεράσματα****4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

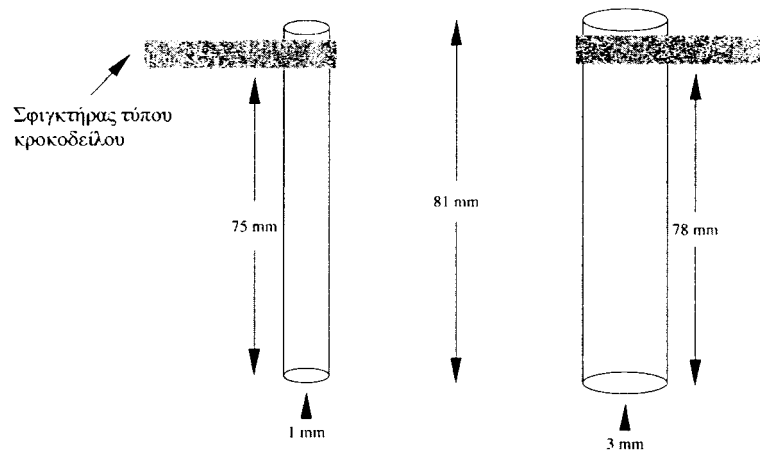
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, σσ. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtuter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 219-255.

Σχήμα 1

Διαστάσεις του σωλήνα PTFE

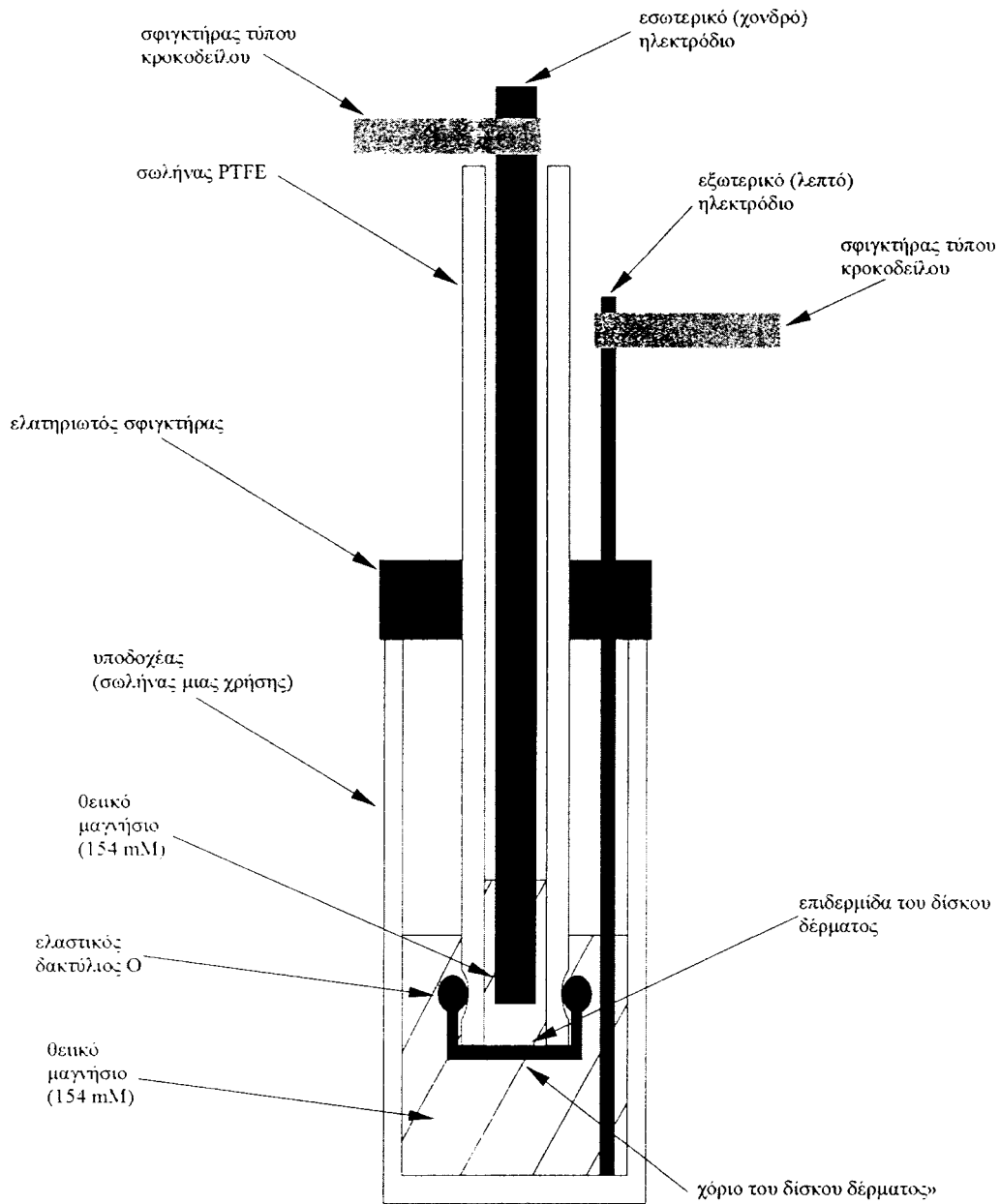


Διαστάσεις των ηλεκτροδίων



Σχήμα 2

Συσκευή για τη δοκιμασία TER δέρματος επίμονος



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

«B.41. ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — IN VITRO 3T3 NRU ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1 ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Ως φωτοτοξικότητα ορίζεται η τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή που επάγεται ομοίως από ακτινοβολία του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Τα στοιχεία που λαμβάνονται από την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό της φωτοτοξικής δυνατότητας μιας υπό δοκιμή ουσίας, δηλαδή της ύπαρξης ή απουσίας πιθανών κινδύνων που μπορεί να εμφανιστούν από μια υπό δοκιμή ουσία σε συνδυασμό με έκθεση στο υπεριώδες και το ορατό φως.

Δεδομένου ότι το τοξικολογικό τελικό αποτέλεσμα της in vitro δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της φωτοκυτταροτοξικότητας, που προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και φωτός, ενώσεις που είναι φωτοτοξικές in vivo έπειτα από συστηματική εφαρμογή και κατανομή στο δέρμα, καθώς επίσης και ενώσεις που δρουν ως φωτοερεθιστικά έπειτα από τοπική εφαρμογή στο δέρμα, μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη δοκιμή.

Η in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε κοινό πρόγραμμα ΕΕ/COLIPA από το 1992-1997 (123) που απέβλεπε στην καθιέρωση μιας έγκυρης in vitro εναλλακτικής λύσης αντί των διαφόρων in vivo χρησιμοποιούμενων δοκιμών. Το 1996 σε συνάντηση εργασίας του ΟΟΣΑ προτάθηκε μια in vitro προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου για την εκτίμηση της φωτοτοξικότητας (4).

Τα αποτελέσματα της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας συγκρίθηκαν με τις in vivo οξείες φωτοτοξικές/φωτοερεθιστικές επιδράσεις σε ζώα και ανθρώπους, και η δοκιμή αποδείχθηκε ότι παρείχε εξαιρετικές προβλέψεις ως προς τις επιδράσεις αυτές. Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την πρόβλεψη άλλων δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να προκύψουν από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και του φωτός, π.χ. φωτογονιδιοτοξικότητας, φωτοαλλεργίας και φωτοκαρκινογένεσης, αν και πολλές ουσίες που παρουσιάζουν τα ειδικά αυτά χαρακτηριστικά αντιδρούν θετικά στην in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας. Επιπλέον, η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί κατά τρόπο που να μπορεί να γίνεται εκτίμηση της φωτοτοξικής ισχύος.

Στο προσάρτημα δίνεται μια προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου της φωτοτοξικότητας χημικών ουσιών.

1.2 Ορισμοί

Ένταση ακτινοβολίας: η ένταση του προσπίπτοντος σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατού φωτός, μετρούμενη σε W/m^2 ή mW/cm^2 .

Δόση φωτός: η ποσότητα (= ένταση × χρόνος) υπεριώδους (UV) ή ορατής ακτινοβολίας προσπίπτουσας σε επιφάνεια, εκφραζόμενη σε Joules (= $W \times s$) ανά μονάδα επιφάνειας, π.χ. J/m^2 ή J/cm^2 .

Ζώνες UV φωτός: οι χαρακτηρισμοί που προτείνονται από την CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) είναι: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Χρησιμοποιούνται επίσης και ορισμένοι άλλοι χαρακτηρισμοί: το διαχωριστικό σημείο μεταξύ UVB και UVA τοποθετείται συνήθως στα 320 nm, ενώ η UVA μπορεί να χωρίζεται σε UV-A1 και UV-A2 με την υποδιαίρεση στα 340 nm περίπου.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος που μετράει τη συνολική δραστηριότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. πρόσληψη της ζωτικής χρωστικής Neutral Red σε κυτταρικά λυσοσώματα) η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό αποτέλεσμα και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό της δοκιμής, συσχετίζεται με το συνολικό αριθμό ή/και ζωτικότητα των κυττάρων.

Σχετική κυτταρική βιωσιμότητα: η κυτταρική βιωσιμότητα εκφραζόμενη σε σχέση με αρνητικούς (διαλύτες) μάρτυρες που έχουν περάσει από όλη τη διαδικασία δοκιμής (είτε +UV είτε -UV), αλλά δεν έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με υπό δοκιμή ουσία.

Μοντέλο πρόβλεψης: αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων μιας δοκιμής τοξικότητας σε πρόβλεψη της τοξικής δυνατότητας. Στα πλαίσια των κατευθυντηρίων γραμμών της παρούσας δοκιμής, για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας σε πρόβλεψη των φωτοτοξικών δυνατοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι PIF και MPE.

PIF (photo irritation factor — συντελεστής φωτοερεθισμού): συντελεστής που λαμβάνεται συγκρίνοντας δύο εξίσου αποτελεσματικές κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (EC_{50}) της υπό δοκιμή ουσίας απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολίας με UVA/ορατό φως.

MPE (mean photo effect — μέση φωτοεπίδραση): νέο μέτρο που προέρχεται από μαθηματική ανάλυση του πλήρους σχήματος δύο καμπύλων συγκέντρωσης απόκρισης απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολίας με UVA/ορατό φως.

Φωτοτοξικότητα: οξεία τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως, ή η οποία επάγεται ομοίως από ακτινοβολήση του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Φωτοερεθισμός: υποδιαίρεση του όρου “φωτοτοξικότητα”, που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόνον τις φωτοτοξικές εκείνες αντιδράσεις που προκαλούνται στο δέρμα έπειτα από έκθεση σε χημικές ουσίες (τοπικά ή από το στόμα). Οι φωτοτοξικές αυτές αντιδράσεις έχουν πάντοτε ως αποτέλεσμα τη μη εξειδικευμένη καταστροφή κυττάρων (αντιδράσεις όπως τα ηλιακά εγκαύματα).

Φωτοαλλεργία: επίκτητη ανοσολογική αντίδραση, που δεν εμφανίζεται στην πρώτη επαφή με χημική ουσία και φως, και χρειάζεται επαγωγικό χρονικό διάστημα μιας ή δύο εβδομάδων πριν να εμφανιστεί δερματική αντίδραση.

Φωτογονιδιοτοξικότητα: παρατηρούμενη γονιδιοτοξική απόκριση με γενετικό τελικό αποτέλεσμα, που εμφανίζεται μετά την έκθεση κυττάρων σε μη γονιδιοτοξική δόση UV/ορατού φωτός και μη γονιδιοτοξική χημική ουσία.

Φωτοκαρκινογένεση: καρκινογένεση προκαλούμενη από επανειλημμένη χρήση φωτός και χημικής ουσίας. Εφόσον τυχόν από UV προκαλούμενη ογκογένεση ενισχύεται από χημική ουσία, τότε χρησιμοποιείται ο όρος “φωτοσυγκαρκινογένεση”.

1.3 Ουσίες αναφοράς

Εκτός από τον θετικό χημικό μάρτυρα χλωροπρομαζίνη, που θα πρέπει να δοκιμάζεται ταυτόχρονα σε κάθε δοκιμή, σε περιπτώσεις πρώτης εφαρμογής της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως ουσίες αναφοράς και ορισμένες από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε διεργαστηριακές δοκιμές με την παρούσα δοκιμή (1) (3) (13).

1.4 Αρχικές θεωρήσεις

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που έχουν αναφερθεί ως φωτοτοξικές (5) (6) (7) (8). Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στη περιοχή του ηλιακού φωτός. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο της φωτοχημείας (Grotthaus-Draper's Law) η φωτοαντίδραση απαιτεί επαρκή απορρόφηση κβάντων φωτός. Έτσι, πριν από το βιολογικό έλεγχο σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να προσδιορίζεται το φάσμα απορρόφησης UV/ορατού της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. σύμφωνα με την OECD Test Guideline 101). Εάν ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης/απορρόφησης είναι μικρότερος από 10 λίτρα × mol⁻¹ × cm⁻¹ η χημική ουσία δεν έχει φωτοαντιδραστικές δυνατότητες και δεν χρειάζεται να ελεγχθεί με την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας ή οποιαδήποτε άλλη βιολογική δοκιμή για δυσμενείς φωτοχημικές επιδράσεις (Προσάρτημα).

1.5 Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Έχουν εντοπιστεί τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους η απορρόφηση φωτός από μια χρωμοφόρο χημική ένωση μπορεί να οδηγήσει σε φωτοτοξική απόκριση (7). Όλοι απολήγουν σε καταστροφή των κυττάρων. Συνεπώς, η in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας βασίζεται σε σύγκριση της κυτταροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας όταν υποβάλλεται σε δοκιμή με και χωρίς έκθεση σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορατού φωτός. Η κυτταροτοξικότητα σε αυτή τη δοκιμή εκφράζεται με τη μορφή εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση μείωσης της πρόσληψης της ζωτικής χρωστικής neutral red (NR) (9), 24 ώρες μετά την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία και ακτινοβολήση.

Κύτταρα Balb/c 3T3 διατηρούνται σε καλλιέργεια για 24 ώρες για το σχηματισμό μονοστιβάδων. Στη συνέχεια, δύο τρυβλία με 96 κοιλότητες ανά δοκιμαζόμενη ουσία προεπωάζονται με οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας για 1 h. Στη συνέχεια, ένα από τα δύο τρυβλία εκτίθεται σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορατού φωτός 5 J/cm² UVA (πείραμα +UV), ενώ το άλλο τρυβλίο διατηρείται στο σκοτάδι (πείραμα -UV). Και στα δύο τρυβλία, το μέσον αγωγής αντικαθίσταται κατόπιν από μέσον καλλιέργειας και έπειτα από 24 ακόμη ώρες επώασης, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα neutral red uptake (NRU) για 3 h. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα, εκφραζόμενη ως ποσοστό μη υποβληθέντων σε αγωγή αρνητικών μαρτύρων, υπολογίζεται για κάθε μία από τις οκτώ συγκεντρώσεις δοκιμής. Για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, οι κατά συγκέντρωση αποκρίσεις που λαμβάνονται με (+UV) και χωρίς (-UV) ακτινοβολήση συγκρίνονται, συνήθως στα επίπεδα EC₅₀, δηλαδή στη συγκέντρωση που αναστέλλει την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50% σε σύγκριση με τους μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες.

1.6 Ποιοτικά κριτήρια

Κυτταρική ευαισθησία σε UVA, ιστορικά στοιχεία: Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται ως προς την ευαισθησία τους σε UVA. Κύτταρα διασπείρονται υπό πυκνότητα που χρησιμοποιείται και στην in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, την επόμενη ημέρα ακτινοβολούνται με δόσεις UVA από 1-9 J/cm², και η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται μια ημέρα αργότερα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή NRU. Τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια ποιότητας, εάν η βιωσιμότητά τους μετά την ακτινοβολήση με 5 J/cm² UVA δεν είναι μικρότερη από το 8% της βιωσιμότητας των διατηρηθέντων στο σκοτάδι μαρτύρων. Στη μέγιστη δόση UVA των 9 J/cm² η βιωσιμότητα δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 50% εκείνης των διατηρηθέντων στο σκοτάδι μαρτύρων. Ο έλεγχος αυτός θα πρέπει να επαναλαμβάνεται έπειτα από κάθε 10 περίπου διελεύσεις των κυττάρων.

Ευαισθησία στο UVA των αρνητικών κυτταρικών μαρτύρων τρέχουσα δοκιμή: Η δοκιμή πληροί τα ποιοτικά κριτήρια εάν οι αρνητικοί μάρτυρες (κύτταρα σε Earl's balanced salt solution (EBSS) με ή χωρίς 1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή 1% αιθανόλη (EtOH)) στο +UVA πείραμα εμφανίζουν βιωσιμότητα όχι μικρότερη από το 8% εκείνης μη ακτινοβολημένων κυττάρων στον ίδιο διαλύτη του συμπαρομαρτούντος πειράματος στο σκοτάδι (-UVA).

Βιωσιμότητα αρνητικών μαρτύρων: Η απόλυτη οπτική πυκνότητα ($OD_{540\text{ NRU}}$) μετρούμενη στο εκχύλισμα NP των αρνητικών μαρτύρων δείχνει αν τα 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα αναπτύχθηκαν με κανονικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διάρκεια των δύο ημερών της δοκιμής. Μια δοκιμή πληροί τα κριτήρια αποδοχής εάν η μέση $OD_{540\text{ NRU}}$ των μη υποβληθέντων σε αγωγή μαρτύρων είναι $\geq 0,2$.

Θετικός μάρτυρας: Σε κάθε *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας πρέπει να εξετάζεται συγχρόνως και μια γνωστή φωτοτοξική χημική ουσία. Στη μελέτη επικύρωσης των ΕΕ/COLIPA ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε χλωροπρομαζίνη (CPZ) η οποία και επομένως προτείνεται. Στην περίπτωση CPZ που εξετάζεται με το τυπικό πρωτόκολλο στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, ορίστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής-δοκιμής: CPZ ακτινοβολημένη (+UVA): $EC_{50} = 0,1$ έως $2,0$ $\mu\text{g/ml}$, CPZ μη ακτινοβολημένη (-UVA): $EC_{50} = 7,0$ έως $90,0$ $\mu\text{g/ml}$. Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF), δηλαδή η μεταβολή της EC_{50} θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 6.

Ως συμπαραομαρτώντες θετικοί μάρτυρες, αντί της (CPZ), μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες γνωστές φωτοτοξικές χημικές ουσίες, κατάλληλες για τη χημική τάξη ή τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας της αξιολογούμενης υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, με βάση ιστορικά δεδομένα, θα πρέπει να οριστούν κατάλληλα οι περιοχές των τιμών EC_{50} και ο PIF ή η MRE (mean photo elfeet) ως κριτήρια αποδοχής για τη δοκιμή.

1.7 Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.7.1 Παρασκευάσματα

1.7.1.1 Κύτταρα

Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε μόνιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού —Balb/c 3T3, κλώνος 31— είτε από την ATCC είτε από την ECACC, η οποία επομένως και προτείνεται. Στο ίδιο πρωτόκολλο δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου επιτυχώς και άλλα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές, εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσαρμοσμένες στις ειδικές ανάγκες των κυττάρων, πρέπει όμως να καταδεικνύεται η ισοδυναμία.

Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται μήπως είναι μολυσμένα από μικρόπλασμα και να χρησιμοποιούνται μόνον εφόσον τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού είναι ικανοποιητικά.

Επειδή η ευαισθησία των κυττάρων σε UVA μπορεί να αυξάνεται με τον αριθμό των διελεύσεων, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κύτταρα Balb/c 3T3 με τον χαμηλότερο δυνατόν αριθμό διελεύσεων, κατά προτίμηση κάτω των 100. Έχει ιδιαίτερη σημασία, η ευαισθησία σε UVA των κυττάρων Balb/c 3T3 να ελέγχεται τακτικά σύμφωνα με τη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στις παρούσες κατευθυντήριες γραμμές.

1.7.1.2 Μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη συνθήκη διέλευση κυττάρων και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επώασης. Για κύτταρα Balb/c 3T3 τα μέσα αυτά είναι DMEM με προσθήκη 10% ορού νεογέννητου μοσχαριού, 4 mM γλουταμίνη, πениκιλλίνη και στρεπτομυκίνη, και επώαση με υγρασία στους $37^\circ\text{C}/7,5\%$ CO_2 . Είναι ιδιαίτερα σημαντικό, οι συνθήκες της κυτταρικής καλλιέργειας να διασφαλίζουν χρόνο κυτταρικού κύκλου στα κανονικά ιστορικά πλαίσια των χρησιμοποιούμενων κυττάρων ή κυτταρικών σειρών.

1.7.1.3 Ετοιμασία των καλλιεργιών

Κύτταρα από κατεψυγμένες αρχικές καλλιέργειες εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας στην κατάλληλη πυκνότητα και χωρίζονται σε υποκαλλιέργειες τουλάχιστον μια φορά πριν να χρησιμοποιηθούν στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας.

Για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής μέχρι το τέλος της δοκιμής, δηλαδή όταν η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται 48 ώρες μετά τη διασπορά των κυττάρων. Στην περίπτωση κυττάρων Balb/c 3T3 καλλιεργούμενων σε τρυβλία 96 κοιλότητων, η συνιστώμενη κυτταρική πυκνότητα είναι 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα.

Για κάθε δοκιμαζόμενη χημική ουσία, τα κύτταρα εμβολιάζονται με τον ίδιο τρόπο σε δύο χωριστά τρυβλία των 96 κοιλότητων, τα οποία περνούν στη συνέχεια ταυτόχρονα από όλη τη διαδικασία δοκιμής υπό ταυτόσημες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός από τη χρονική περίοδο όπου ένα από τα τρυβλία ακτινοβολείται (+UVA/ορατό) και το άλλο διατηρείται στο σκοτάδι (-UVA/ορατό).

1.7.1.4 Μεταβολική ενεργοποίηση

Αν και η χρήση μεταβολικών συστημάτων αποτελεί γενική απαίτηση για όλες τις *in vitro* δοκιμές για την πρόβλεψη γονιδιοτοξικών και καρκινογόνων δυνατοτήτων, μέχρι σήμερα, στην περίπτωση της φωτοτοξικολογίας, δεν υπάρχει καμία γνωστή χημική ουσία για την οποία να χρειάζεται μεταβολικός μετασηματισμός προκειμένου η ουσία να δράσει ως φωτοτοξίνη *in vivo* ή *in vitro*. Έτσι, ούτε θεωρείται αναγκαίο ούτε δικαιολογείται επιστημονικά η εκτέλεση της παρούσας δοκιμής με κάποιο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

1.7.1.5 Υπό δοκιμή ουσία/παρασκευα

Οι υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένες λίγο πριν από τη χρήση τους, εκτός κι αν τα υφιστάμενα στοιχεία σταθερότητας επιτρέπουν την αποθήκευση. Στην περίπτωση που υπάρχει πιθανότητα ταχείας φωτοαποικοδόμησης, μπορεί να απαιτείται παρασκευή με ερυθρό φως.

Οι υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε ρυθμιστικά αλατούχα διαλύματα, π.χ. Earl's balanced salt solution, (EBSS) ή phosphate buffered saline (PBS), τα οποία, για λόγους αποφυγής παρεμβατικών φαινομένων κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης, πρέπει να είναι απηλλαγμένα πρωτεϊνικών συστατικών και χρωστικών δεικτών pH που απορροφούν το φως.

Ουσίες με περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες στο εκατονταπλάσιο της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης και κατόπιν να αραιώνονται 1:100 με το ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλύτης, αυτός πρέπει να υπάρχει σε σταθερό όγκο 1% (v/v) σε όλες τις καλλιέργειες, δηλαδή τόσο στους αρνητικούς μάρτυρες όσο και σε όλες τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Ως διαλύτες συνιστώνται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθανόλη (EtOH). Κατάλληλοι μπορεί να είναι και άλλοι διαλύτες με χαμηλή κυτταροτοξικότητα (π.χ. ακετόνη), πρέπει όμως να ελέγχονται προσεκτικά μήπως τυχόν εμφανίζουν κάποιες ειδικές ιδιότητες, π.χ. αντιδρούν με την υπό δοκιμή ουσία, παγώνουν την φωτοτοξική επίδραση, ενώνονται με ρίζες, κ.λπ.

Προς υποβοήθηση της υποβοήθησης της διαλυτοποίησης να χρησιμοποιηθεί, εφόσον απαιτείται, ανάμειξη με vortex ή/και επίδραση υπερήχων ή/και θέρμανση στους 37°C.

1.7.1.6 Αντινοβολία UV προετοιμασία

Φωτεινή πηγή: ο κρισιμότερος παράγοντας στη δοκιμή φωτοτοξικότητας είναι η επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής και κατάλληλου φίλτρου. Η ζώνη UVA και οι ορατές περιοχές σχετίζονται συνήθως με φαινόμενα φωτοευαισθητοποίησης (7) (10), ενώ η UVB σχετίζεται λιγότερο και είναι απευθείας λίαν κυτταροτοξική, η δε κυτταροτοξικότητα της αυξάνεται μέχρι το χιλιαπλάσιο στην περιοχή από 313 έως 280 nm (11). Στα κριτήρια για την επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής θα πρέπει να περιλαμβάνεται ως βασική απαίτηση, τα κύματα που εκπέμπονται από τη φωτεινή πηγή να έχουν μήκος κύματος απορροφούμενο από την υπό δοκιμή ουσία ενώ η φωτεινή δόση (που πρέπει να επιτυγχάνεται μέσα σε λογικό χρονικό διάστημα) θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση γνωστών φωτοευαισθητοποιητικών ουσιών. Περαιτέρω, τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος και οι δόσεις δεν θα πρέπει να έχουν ανεπίτρεπτες επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης και της εκπομπής θερμότητας (περιοχή υπερύθρου).

Ως άριστη φωτεινή πηγή θεωρείται η προσομοίωση του ηλιακού φωτός με ηλιακούς προσομοιωτές. Στους ηλιακούς προσομοιωτές χρησιμοποιούνται τόνον τόξα Xenon όσο και (επιχρισμένα) τόξα υδραργύρουμεταλλοαλογονιδίων. Τα τελευταία έχουν το πλεονέκτημα ότι εκπέμπουν λιγότερη θερμότητα και είναι φθηνότερα, δεν ταιριάζουν όμως απόλυτα με το ηλιακό φως. Επειδή όλοι οι ηλιακοί προσομοιωτές εκπέμπουν σημαντικές ποσότητες UVB, θα πρέπει να φιλτράρονται κατάλληλα ώστε να εξασθενεί η υψηλής κυτταροτοξικότητας ακτινοβολία UVB.

Για την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιείται φάσμα ακτινοβολίας απηλλαγμένο πρακτικά από UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Έχει δημοσιευτεί παράδειγμα της κατανομής της φασματικής ακτινοβολίας του φιλτραρισμένου ηλιακού προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επίσης της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας (3).

Δοσομετρία: Η ένταση του φωτός (ένταση ακτινοβολίας) θα πρέπει να ελέγχεται κανονικά πριν από κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας, χρησιμοποιώντας κατάλληλο ευρύζωνο υπερδιόμετρο. Το UV-μέτρο πρέπει να διακρίβνεται ως προς την πηγή. Η λειτουργία του UV-μέτρου θα πρέπει να ελέγχεται, και για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ενός δευτέρου UV-μέτρου αναφοράς του ίδιου τύπου και με ταυτόσημη διακρίβωση. Θεωρητικά, κατά μεγάλα διαστήματα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φασματοακτινόμετρο για να μετρείται η φασματική ακτινοβολία της φιλτραρισμένης φωτεινής πηγής και να ελέγχεται η βαθμονόμηση του ευρύζωνου UV-μέτρου, τα όργανα αυτά όμως απαιτούν χειρισμό μόνον από κατάλληλα εκπαιδευμένα άτομα.

Στη μελέτη επικύρωσης προσδιορίστηκε ότι δόση 5 J/cm² (UVA) δεν παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα Balb/c 3T3, είναι όμως επαρκής για τη διέγερση έστω και ασθενών φωτοτοξικών χημικών ουσιών. Για την επίτευξη 5 J/cm² εντός χρονικού διαστήματος 50 min, η ένταση της ακτινοβολίας πρέπει να προσαρμόζεται στα 1,666 mW/cm². Εφόσον χρησιμοποιηθεί άλλη κυτταρική σειρά ή διαφορετική φωτεινή πηγή, η δόση UVA μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί ελαφρώς, με βάση τα κριτήρια της μη δυσμενούς επίδρασης στα κύτταρα και της επάρκειας για την ανίχνευση συνήθων φωτοτοξινών. Ο χρόνος της φωτεινής έκθεσης υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{δόση ακτινοβολίας (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{ένταση ακτινοβολίας (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Συνθήκες δοκιμής

Η μέγιστη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 100 µg/ml, αφού όλες οι φωτοτοξικές ουσίες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξάνει η πιθανότητα εμφάνισης εσφαλμένων θετικών αποτελεσμάτων (υπερβολικών προβλέψεων) (13). Το pH της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να είναι ικανοποιητικό (περιοχή pH: 6,5-7,8).

Οι περιοχές συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας που υποβάλλεται σε δοκιμή παρουσία (+UVA) και απουσία (-UVA) φωτός θα πρέπει να προσδιορίζονται κατάλληλα με προηγούμενα πειράματα για εύρεση της περιοχής. Το εύρος και το διάστημα μιας σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να προσαρμόζονται έτσι ώστε οι καμπύλες συγκεντρώσης-απόκρισης να υποστηρίζονται από επαρκή πειραματικά δεδομένα. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά συγκεντρώσεων (με σταθερό συντελεστή αραιώσης).

1.7.3 Διαδικασία δοκιμή⁽¹⁾

1.7.3.1 Πρώτη ημέρα

Παρασκευάζεται εναιώρημα κυττάρων με 1×10^5 κύτταρα/μλ σε μέσον καλλιέργειας και προστίθενται 100 μλ μέσου καλλιέργειας στις περιφερειακές μόνον κοιλότητες ενός μικροπιλοδοτικού τρυβλίου με 96 κοιλότητες (= λευκά). Στις εναπομένουσες κοιλότητες, προστίθενται 100 μλ κυτταρικού εναιωρήματος με 1×10^5 κύτταρα/μλ (= 1×10^4 κύτταρα/κοιλότητα). Για κάθε δοκιμαζόμενη ουσία, ετοιμάζονται δύο τρυβλία: ένα για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (-UVA), και το άλλο για τον προσδιορισμό της φωτοκυτταροτοξικότητας (+UVA).

Τα κύτταρα επώάζονται για 24 h (7,5 % CO₂, 37°C) έως ότου σχηματίζουν μονοστιβάδα σε επίπεδα ημισυρροής. Η περίοδος αυτή επώασης επιτρέπει την επαναφορά σε κανονική κατάσταση και πρόσφυση των κυττάρων και την εκθετική τους αύξηση.

1.7.3.2 Δεύτερη ημέρα

Μετά την επώαση, το μέσον καλλιέργειας απομακρύνεται από τα κύτταρα και ακολουθεί διπλή έκπλυση με 150 μλ EBSS/PBS ανά κοιλότητα. Προστίθενται 100 μλ EBSS/PBS με την κατάλληλη συγκέντρωση ουσίας ή απλώς διαλύτη (αρνητικός μάρτυρας). Χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Τα κύτταρα επώάζονται με την υπό δοκιμή ουσία στο σκοτάδι για 60 λεπτά (7,5 % CO₂, 37°C).

Για την εκτέλεση του (+UVA) τμήματος της δοκιμής, τα κύτταρα ακτινοβολούνται μέσα από το καπάκι του τρυβλίου με 96 κοιλότητες με 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Για την αποφυγή συμπίκνωσης υδατμών κάτω από το καπάκι χρησιμοποιείται ένας ανεμιστήρας. Διπλά τρυβλία (-UVA) διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε ένα σκοτεινό κουτί για 50 min (= χρόνος έκθεσης UVA).

Το υπό δοκιμή διάλυμα μεταγίγεται και ακολουθεί έκπλυση δύο φορές με 150 μλ EBSS/PBS. Το EBSS/PBS αντικαθίσταται με μέσον καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση (7,5 % CO₂, 37°C) όλη τη νύκτα (18-22 h).

1.7.3.3 Τρίτη ημέρα

Μικροσκοπική αξιολόγηση

Τα κύτταρα εξετάζονται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Καταγράφονται οι μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων που οφείλονται στην κυτταροτοξική επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας. Ο έλεγχος αυτός συνίσταται για την αποφυγή πειραματικών λαθών, τα στοιχεία όμως αυτά δεν χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας ή της φωτοτοξικότητας.

Δοκιμή neutral red uptake

Τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μλ προθερμασμένο EBSS/PBS. Το διάλυμα εκπλύσεως απομακρύνεται με ήπια άντληση. Προστίθενται 100 μλ μέσου NR και ακολουθεί επώαση στους 37°C, σε ένυγη ατμόσφαιρα με 7,5 % CO₂ για 3 h.

Μετά την επώαση, το μέσον NR απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μλ EBSS/PBS. Ακολουθεί ολοκληρωτική μετάγχιση και στύπωση του EBSS/PBS. (Προαιρετικώς: ανάστροφη φυγοκέντρηση)

Προστίθενται ακριβώς 150 μλ διάλυμα εκρόφησης NR (προσφάτως παρασκευασθέν διάλυμα αιθανόλης/οξικού οξέος)

Το μικροπιλοδοτικό τρυβλίο ανακινείται με ταχύτητα με τη βοήθεια αναταράκτη (σέικερ) μικροπιλοδοτικών τρυβλίων επί 10 min, μέχρις ότου εκχυλιστεί το NR από τα κύτταρα και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετρείται η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος NR στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας τα λευκά ως σημεία αναφοράς. Τα δεδομένα σώζονται σε κατάλληλη μορφή (π.χ. ASCII) για μεταγενέστερη ανάλυση.

⁽¹⁾ Πρόσθετες λεπτομέρειες μπορούν να βρεθούν στην παραπομπή 12.

2 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 Ποιότητα και ποσότητα δεδομένων

Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να γίνει ουσιαστική ανάλυση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης παρουσία και απουσία UVA/ορατής ακτινοβολίας. Εφόσον διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα, τόσο το εύρος των συγκεντρώσεων όσο και το μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων διάστημα θα πρέπει να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μπορεί να χαραχθεί καμπύλη σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα. Λόγω του ότι μια υπό δοκιμή ουσία μπορεί να μην είναι κυτταροτοξική μέχρι την καθορισμένη οριακή συγκέντρωση των 100 µg/ml στο σκοτεινό πείραμα (-UVA), αλλά λιαν τοξική όταν ακτινοβολείται (+UVA), τα προς έλεγχο εύρη των συγκεντρώσεων και στα δύο μέρη του πειράματος μπορεί να χρειάζεται να διαφέρουν κατά τάξεις μεγέθους ώστε να πληρούται η απαίτηση της κατάλληλης ποιότητας των δεδομένων. Εφόσον δεν διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα και στα δύο μέρη του πειράματος (-UVA και +UVA), αρκεί έλεγχος με μεγάλη απόσταση μεταξύ μεμονωμένων δόσεων μέχρι την υψηλότερη συγκέντρωση.

Δεν χρειάζεται οποιαδήποτε επαλήθευση με επαναληπτικό πείραμα στην περίπτωση σαφούς θετικού αποτελέσματος. Επιπλέον, δεν χρειάζεται να επαληθεύονται ούτε τα σαφή αρνητικά αποτελέσματα, υπό την προϋπόθεση ότι η υπό δοκιμή ουσία εξετάστηκε σε επαρκώς υψηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, αρκεί ένα κύριο πείραμα, επικουρούμενο από ένα ή περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα ανεύρεσης εύρους συγκεντρώσεων.

Δοκιμές με οριακά αποτελέσματα κοντά στη γραμμή τομής του μοντέλου πρόβλεψης θα πρέπει να επαναλαμβάνονται για επαλήθευση.

Εφόσον θεωρηθεί αναγκαία η επανάληψη της δοκιμής τότε, για τη λήψη σαφούς αποτελέσματος, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο η διακύμανση των πειραματικών συνθηκών. Μια βασική μεταβλητή στη δοκιμή αυτή είναι η παρασκευή των διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας. Συνεπώς, η διακύμανση αυτών των συνθηκών (συνδιαλύτης, λειοτριβήση, εφαρμογή υπερήχων) μπορεί να έχει ουσιαστική σημασία στην επανάληψη της δοκιμής. Εναλλακτικώς, μπορεί να εξεταστεί και η διακύμανση του προ της ακτινοβολήσεως χρόνου επώασης. Η βράχυνση του χρόνου μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση υδατοαοσθίων χημικών ουσιών.

2.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Όπου είναι δυνατόν, προσδιορίζεται η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας που παρουσιάζει 50 % αναστολή της κυτταρικής NRU (EC₅₀). Αυτό μπορεί να γίνει εφαρμόζοντας οποιαδήποτε κατάλληλη διαδικασία μη γραμμικής αναγωγής (κατά προτίμηση Hill ή λογιστική αναγωγή) στα δεδομένα συγκέντρωσης-απόκρισης, ή χρησιμοποιώντας άλλες διαδικασίες προσαρμογής (14). Πριν χρησιμοποιηθεί κάποια τιμή EC₅₀ για περαιτέρω υπολογισμούς, θα πρέπει να ελέγχεται κατάλληλα η ποιότητα της προσαρμογής. Εναλλακτικώς, για τον υπολογισμό της EC₅₀ μπορούν να χρησιμοποιηθούν γραφικές μέθοδοι προσαρμογής. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται η χρήση χάρτου πιθανοτήτων (x-κλίμακα: log, y-κλίμακα: probit), καθώς σε πολλές περιπτώσεις η συνάρτηση συγκέντρωσης-απόκρισης καθίσταται σχεδόν γραμμική μετά το μετασχηματισμό αυτό.

2.3 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (μοντέλα πρόβλεψης)

2.3.1 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοσης 1: συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF)

Εάν τόσο παρουσία (+UVA) όσο και απουσία (-UVA) φωτός, λαμβάνονται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης απόκρισης, ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

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

Τιμή PIF < 5, σημαίνει μη φωτοτοξική δυνατότητα, τιμή PIF ≥ 5 σημαίνει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν μια χημική ουσία είναι κυτταροτοξική μόνο υπό συνθήκες +UVA και μη κυτταροτοξική όταν δοκιμάζεται υπό συνθήκες -UVA ο PIF δεν μπορεί να υπολογιστεί, αν και αυτό είναι ένα αποτέλεσμα που δείχνει φωτοτοξική δυνατότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να υπολογιστεί μια τιμή "PIF" εάν η δοκιμή κυτταροτοξικότητας (-) εκτελεστεί μέχρι την ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής (C_{max}) οπότε αυτή η τιμή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της "PIF":

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

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνον τιμή "<PIF", τότε κάθε τιμή > 1 προλέγει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν δεν μπορούν να υπολογιστούν ούτε η EC₅₀ (-UV) ούτε η EC₅₀ (+UV) λόγω του ότι η χημική ουσία δεν δείχνει καμία κυτταροτοξικότητα μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής, αυτό δείχνει την μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας. Στις περιπτώσεις αυτές, για τον χαρακτηρισμό του αποτελέσματος χρησιμοποιείται ένα τυπικό "PIF = * 1":

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

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνο η τιμή "PIF = * 1" αυτό σημαίνει τη μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας.

Στις περιπτώσεις (β) και (γ), θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη οι συγκεντρώσεις που λαμβάνονται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας προκειμένου να προβλεφθεί η φωτοτοξική δυνατότητα

2.3.2 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοσης 2: μέση φωτοεπίδραση (MPE)

Εναλλακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί και μια νέα έκδοση του μοντέλου για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα της μελέτης επικύρωσης των ΕΕ/COLIPA (15) και δοκιμάσκει υπό τυφλές συνθήκες σε μεταγενέστερη μελέτη για την *in vitro* φωτοτοξικότητα χημικών φίλτρων UV (13). Το μοντέλο αυτό υπερπηδά τον περιορισμό του μοντέλου PIF στις περιπτώσεις που δεν μπορεί να ληφθεί τιμή EC₅₀. Το μοντέλο χρησιμοποιεί τη "μέση φωτοεπίδραση" (MPE), μέτρο το οποίο βασίζεται σε σύγκριση των πλήρων καμπυλών συγκέντρωσης απόκρισης. Για την εφαρμογή του μοντέλου MPE, αναπτύχθηκε στο Humboldt University (Berlin, D) ένα ειδικό λογισμικό που μπορεί να παραληφθεί δωρεάν.

2.4 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Θετικό αποτέλεσμα στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF ≥ 5 ή MPE $\geq 0,1$) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία έχει φωτοτοξική δυνατότητα. Εάν το αποτέλεσμα αυτό λαμβάνεται σε συγκεντρώσεις κάτω των 10 µg/ml, η υπό δοκιμή ουσία είναι επίσης πιθανόν να δρα και ως φωτοτοξίνη και υπό ποικίλες συνθήκες έκθεσης *in vivo*. Εάν ληφθεί θετικό αποτέλεσμα μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής των 100 µg/ml, για την εκτίμηση των κινδύνων ή της φωτοτοξικής ισχύος μπορεί να απαιτείται να ληφθούν υπόψη και άλλα στοιχεία. Σε αυτά μπορεί να περιλαμβάνονται στοιχεία για τη διείσδυση, την απορρόφηση και πιθανή συσσώρευση της ουσίας στο δέρμα, ή έλεγχος της ουσίας σε επιβεβαιωτική εναλλακτική δοκιμή, π.χ. χρησιμοποιώντας μοντέλο ανθρώπινου δέρματος *in vitro*.

Αρνητικό αποτέλεσμα από την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF < 5 ή MPE < 0,1) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι φωτοτοξική στα καλλιιεργημένα κύτταρα θηλαστικών υπό τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες. Στις περιπτώσεις όπου η ουσία μπόρεσε να δοκιμασθεί μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση των 100 µg/ml, τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι η ουσία δεν έχει φωτοτοξική δυνατότητα, η δε φωτοτοξικότητα *in vivo* μπορεί να θεωρηθεί ως απίθανη. Στις περιπτώσεις όπου ελήφθησαν ταυτόσημες αποκρίσεις συγκέντρωσης-τοξικότητας (EC₅₀ + UV και EC₅₀ - UV) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι η ίδια. Αντιθέτως, αν δεν καταδείχθηκε τοξικότητα (+UV και -UV) αλλά λόγω μειωμένης υδατοδιαλυτότητας της ουσίας οι συγκεντρώσεις περιορίστηκαν σε τιμές χαμηλότερες των 100 µg/ml, τότε μπορεί να τεθεί εν αμφιβολία η συμβατότητα της υπό δοκιμή ουσίας με τη δοκιμή και θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής επιβεβαιωτικής δοκιμασίας (π.χ. χρησιμοποιώντας μοντέλο δέρματος *in vitro*, ή μοντέλο δέρματος *ex vivo* δοκιμή *in vivo*).

3 ΑΝΑΦΟΡΑ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία:

- στοιχεία ταυτοποίησης και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστά,
- φυσική μορφή και καθαρότητα,
- φυσικοχημικές ιδιότητες σχετικές με τη διεξαγωγή της μελέτης,
- σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, εάν είναι γνωστές.

Διαλύτης:

- αιτιοκόνηση της επιλογής του διαλύτη,
- διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας στον διαλύτη,
- ποσοστό διαλύτη ευρισκόμενο στο μέσο κατεργασίας (EBSS ή PBS).

Κύτταρα:

- τύπος και πηγή κυττάρων
- απουσία μυκοπλάσματος,
- αριθμός κυτταρικών διελεύσεων, αν είναι γνωστές,
- ευαισθησία των κυττάρων σε UVA, προσδιοριζόμενη με τον εξοπλισμό ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας.

Συνθήκες δοκιμής (α)/επώαση πριν και μετά την κατεργασία:

- τύπος και σύσταση του μέσου καλλιέργειας,
- συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία, υγρασία),
- διάρκεια της επώασης (προκατεργασία, μετακατεργασία).

Συνθήκες δοκιμής (β)/κατεργασία με την χημική ουσία:

- σκεπτικό της επιλογής των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας που χρησιμοποιούνται με και χωρίς ακτινοβόληση UV/ορατού,
- σε περίπτωση περιορισμένης διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας και απουσίας κυτταροτοξικότητας, σκεπτικό της χρησιμοποιηθείσας υψηλότερης συγκέντρωσης,
- τύπος και σύσταση του μέσου κατεργασίας (ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα),
- διάρκεια της χημικής κατεργασίας.

Συνθήκες δοκιμής (γ)/ακτινοβόληση:

- σκεπτικό επιλογής της χρησιμοποιούμενης φωτεινής πηγής,
- χαρακτηριστικά φασματικής αντινοβολίας της φωτεινής πηγής,
- χαρακτηριστικά διαφάνειας/απορρόφησης του ή των χρησιμοποιούμενων φίλτρων,
- χαρακτηριστικά του ακτινομέτρου και λεπτομέρειες διακρίβωσής του,
- απόσταση της φωτεινής πηγής από το σύστημα δοκιμής,
- ένταση ακτινοβολίας UVA στην απόσταση αυτή, εκφραζόμενη σε mW/cm^2 ,
- διάρκεια έκθεσης σε UV/ορατό φως,
- δόση UVA (ένταση ακτινοβολίας × χρόνος), εκφραζόμενη σε J/cm^2 ,
- θερμοκρασία χρησιμοποιούμενη στις κυτταρικές καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης και στις ταυτόχρονα διατηρούμενες στο σκοτάδι κυτταρικές καλλιέργειες.

Συνθήκες δοκιμής (δ)/δοκιμή NRU:

- σύσταση του μέσου NR,
- διάρκεια επώασης NR,
- συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2 , θερμοκρασία, υγρασία),
- συνθήκες εκχύλισης NR (εχχυλιστικό, διάρκεια),
- μήκος κύματος χρησιμοποιούμενο για την φασματοφωτομετρική ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας NR,
- δεύτερο μήκος κύματος (αναφοράς), εφόσον χρησιμοποιείται,
- περιεχόμενο λευκού του φασματοφωτομέτρου, εφόσον χρησιμοποιείται.

Αποτελέσματα:

- κυτταρική βιωσιμότητα λαμβανόμενη σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας, εκφραζόμενη σε ποσοστιαία μέση βιωσιμότητα των μαρτύρων,
- καμπύλες συγκέντρωσης — απόκρισης (συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική κυτταρική βιωσιμότητα), λαμβανόμενες σε ταυτόχρονα πειράματα +UVA και -UVA,
- ανάλυση δεδομένων καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης: εφόσον είναι δυνατόν, εκτίμηση/υπολογισμός των EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA),
- σύγκριση των δύο καμπυλών συγκέντρωσης - απόκρισης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση UVA/ορατού είτε με υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) είτε με υπολογισμό της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE),
- ταξινόμηση της φωτοτοξικής δυνατότητας,
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (α)/ταυτόχρονος αρνητικός μάρτυρας:
 - απόλυτη βιωσιμότητα (οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος NR) ακτινοβολημένων και μη κυττάρων,
 - ιστορικά στοιχεία αρνητικού μάρτυρα, μέση τιμή και τυπική απόκλιση,
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (β)/ταυτόχρονος θετικός μάρτυρας:
 - EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA) και PIF θετικού μάρτυρα,
 - ιστορικά στοιχεία θετικού μάρτυρα: EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA) και PIF, μέση τιμή και τυπική απόκλιση

*Συζήτηση των αποτελεσμάτων**Συμπεράσματα*

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (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., Pfannenbecker, 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, σσ. 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, σσ. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, 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, σσ. 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, σσ. 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, σσ. XI-XXXΩ.
- (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, σσ. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, σσ. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 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, σσ. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, σσ. 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, σσ. 445-462.

Προσάρτημα

Ρόλος της 3T3 NRU ΔΦ σε μια διαδοχική προσέγγιση του ελέγχου της φωτοτοξικότητας των χημικών ουσιών

