

32000L0033

2000.6.8.

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA

L 136/90

A BIZOTTSÁG 2000/33/EK IRÁNYELVE
(2000. április 25.)

a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonhetedik hozzáigazításáról (*)

(EGT vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

1. cikk

tekintettel a legutóbb az 1999/33/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvvel ⁽¹⁾ módosított, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1967. június 27-i 67/548/EGK tanácsi irányelvre ⁽²⁾ és különösen annak 28. cikkére,

A 67/548/EGK irányelv V. mellékletének B. része ezen irányelvnek az I. és II. mellékletében közölt szövegekkel egészül ki.

mivel:

2. cikk

(1) A 67/548/EGK irányelv V. melléklete megállapítja a veszélyes anyagok és készítmények fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározásához szükséges módszereket. E mellékletet hozzá kell igazítani a műszaki fejlődéshez.

(1) A tagállamok hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek legkésőbb 2001. október 1-jéig megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

(2) A tagállamok a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 86/609/EGK tanácsi irányelv ⁽³⁾ 7. cikke (2) bekezdésének megfelelően az állatok felhasználásával járó kísérletet nem hajtanak végre, ha ésszerűen és megvalósíthatóan rendelkezésre áll más, tudományosan kielégítő módszer a kívánt eredmény elérésére.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

(3) A Bizottság szándékozik olyan alternatív vizsgálati módszerekkel kiegészíteni a 67/548/EGK irányelv V. mellékletét, amelyek nem járnak állatok felhasználásával, azért hogy ezen alternatív módszereket a kémiai anyagok vizsgálatához rendelkezésre bocsássák a 64/548/EGK irányelv 3. cikke (1) bekezdésének megfelelően.

(2) A tagállamok közlik a Bizottsággal nemzeti joguknak azokat a főbb rendelkezéseit, amelyeket az ezen irányelv által szabályozott területen fogadnak el, valamint a Bizottság számára megküldenek egy táblázatot ezen irányelv rendelkezései és az általuk kibocsátott nemzeti rendelkezések közötti megfelelésről.

3. cikk

Ez az irányelv az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

(4) Ezen irányelv rendelkezései összhangban vannak a veszélyes anyagok és készítmények kereskedelme technikai akadályainak felszámolásáról szóló irányelveknek a műszaki fejlődéshez történő hozzáigazításával foglalkozó bizottság véleményével,

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2000. április 25-én.

a Bizottság részéről

Margot WALLSTRÖM

a Bizottság tagja

(*) A 26. átdolgozás előtt került elfogadásra.

⁽¹⁾ HL L 199., 1999. 7.30., 57. o.

⁽²⁾ HL 196., 1967. 8.16., 1. o.

⁽³⁾ HL 358., 1986.12.18., 1. o.

I. MELLÉKLET

„B.40. BŐRKORRÓZIÓ

1. **MÓDSZER**1.1. **Bevezetés**

Az Európai Bizottság Egyesült Kutató Központja (1) (2) (3), az Alternatív Módszerek Validálására alakult Európai Központ (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) a bőrkorrózió vizsgálatára két *in vitro* módszert, transzcután elektromos rezisztencia (transcutaneous electrical resistance, TER) vizsgálatot patkány bőrről és egy emberi bőr modellanyagként alkalmazó vizsgálatot hagyott jóvá tudományosan igazoltan. Az ECVAM hitelességét vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy mindkét vizsgálat megbízhatóan különbséget tudott tenni az ismert bőrkorróziót kiváltó és a nem korrozív anyagok között. Továbbá az emberi bőrmodellen alapuló vizsgálati jelentés alapján megfelelően megkülönböztethetők a korrozív hatások mértékei (ismert, kifejezett bőrkorrózió anyagok, R35, és más, bőrkorróziót okozó anyagok, R34) (2). Adott mindkét vizsgálat leírása és eljárási folyamata; annak eldöntése, hogy melyik vizsgálatot kell alkalmazni az adott követelményektől, és attól függ, hogy melyiket részesíti előnyben a felhasználó.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. **Fogalom meghatározások**

Bőrkorrózió: A vizsgálati anyag alkalmazását követően a bőr szöveteinek irreverzibilis károsodását okozó hatás.

1.3. **Referenciaanyagok**

Nincs meghatározva, de lásd az 1.5.3.4. és 1.7.2.3. pontot.

1.4. **A vizsgálati módszer elve – TER próba a patkánybőrön**

A vizsgált anyagot a humánus megölt fiatal patkányok bőrből vett bőrkorongok epidermális felületén legfeljebb 24 óra időtartamban alkalmazzák. Azokat az anyagokat nevezik korrozívnak, amelyek a stratum korneum integritásának és barrier funkciójának elvesztését okozzák, ez egy bizonyos határérték alatt (5 kΩ) az inherens TER módszerrel mérhető (4) (5). Az irritatív és a nem irritatív anyagok nem csökkentik a TER-t a határérték alá. Felületaktív és semleges szerves anyagok esetén a vizsgálati eljárásba beépíthető egy festékmegkötést biztosító lépés [a fogalom meghatározást lásd a (6) szakirodalomban] a kifejezetten az ilyen vegyi anyagokkal kapcsolatban kapott hamis pozitív eredmények számának csökkentése érdekében (2) (7).

1.5. **A vizsgálati módszer leírása – TER próba a patkánybőrön**1.5.1. *Kísérleti állatok*

Fiatal (20-23 napos) patkányok (Wistar vagy ehhez hasonló törzs) szükségesek a bőrkorongok elkészítéséhez. Kisméretű állatokhoz használt ollóval gondosan eltávolítják a hátán és törzsön a szőrt. Az állatokat ezt követően óvatosan törölgetve megmossák, miközben a vizsgálatra kerülő felületet belemerítik az antibiotikumot tartalmazó oldatba (amely például sztreptomocint, penicillint, klóramfenikolt és amfotericint, baktériumok növekedését gátló koncentrációban). Az első mosást követő harmadik vagy negyedik napon újra megmossák az állatokat antibiotikummal, és 3 napon belül felhasználják azokat (az állatoknak nem szabad 31 naponál idősebbeknek lenniük a bőr előkészítésénél).

1.5.2. *A bőrkorongok elkészítése*

Az állatokat kíméletes módszerrel megölik. Ezután eltávolítják az állat hátán a bőrét és lefejtik a felesleges zsírt, óvatosan elválasztva a bőrtől. A bőrt egy politetrafluoretilén (PTFE) cső vége fölé helyezik, biztosítva, hogy az epidermális felület érintkezzen a csővel. Egy gumi »O« – gyűrűt helyeznek el a csőre, hogy a bőrt szorosan a helyén tartsa, és levágják a felesleges bőrszövetet. A cső és az »O« – gyűrű méretei az 1. ábrán láthatók. Ezután vazelinlinal gondosan tömítik a gumi »O« – gyűrűt a PTFE cső végéhez. A csövet egy rugós csipesz tartja a magnézium-szulfát oldatot (154 mM) tartalmazó befogadó kamra belsejében (2. ábra).

1.5.3. *Vizsgálati eljárás*1.5.3.1. *A vizsgált anyag alkalmazása*

Folyékony vizsgált anyagokat (150 µl) az epidermális felületre helyeznek a csőben (2. ábra). Szilárd anyagok vizsgálatakor megfelelő mennyiségű szilárd anyagot kell a bőrdarabra helyezni annak érdekében, hogy biztosítva legyen a bőrszövet teljes felületének bedefése. Ezután deionizált vizet (155 µl) öntenek a szilárd anyagra, és óvatosan felrázzák a csöveket. A vizsgálati anyagnak a lehető legjobban érintkeznie kell a bőrrel. Néhány szilárd anyagnál ez a 30 °C-ra való melegítés révén az olvadással, vagy az anyag őrlésével, porításával érhető el.

Három bőrkorongot használnak minden egyes vizsgált anyaghoz. A vizsgált anyagokat 24 órán át alkalmazzzák (lásd még az 1.5.3.4. pontot is). A vizsgált anyagot legfeljebb 30 °C hőmérsékletű, csapvíz sugárral mosva eltávolítják, amíg további anyag már nem távolítható el. A csőben megszilárdult vizsgált anyag eltávolítását megkönnyítheti a körülbelül 30 °C hőmérsékletű meleg vízszugárral való mosás.

1.5.3.2. TER mérések

A TER-t kisfeszültségű, váltakozó áramú mérőeszköz (például AIM 401 vagy 6401 vagy ezzel egyenértékű) segítségével mérik. Az elektromos ellenállás mérése előtt csökkentik a bőr felületi feszültségét a bőrszövet befedéséhez elegendő mennyiségű 70 %-os etilalkohollal. Néhány perc után eltávolítják az etilalkoholt a cső megfordításával, és ezután hidratálják a szövetet 3 ml magnézium-szulfát oldat (154 mM) hozzáadásával. Ezt követően elhelyezik az ellenállást mérő eszköz elektródáit a bőrkorong mindkét oldalán az ellenállás (kΩ/bőrdarab) mérésének elvégzésére (2. ábra). Az elektróda méretei és a krokodilcsipeszek alatti elektródaszakasz hosszúsága az 1. ábrán láthatók. A belső (vastag) elektródacsipesz a PTFE cső tetején található az ellenállás-mérés során, annak érdekében, hogy állandó hosszúságú elektródaszakasz legyen a magnézium-szulfát oldatban. A külső (vékony) elektródát úgy helyezik el a befogó kamra belsejében, hogy az a kamra aljág érjen. A rugós csipesz alja és a PTFE cső alja közötti távolságot állandó értéken tartják (1. ábra), mivel ez a távolság hatással van a kapott rezisztencia értékre.

Figyelni kell arra, amennyiben a mért rezisztenciaérték nagyobb, mint 20 kΩ, ezt a bőrkorong epidermális felületét beborító vizsgált anyag okozhatja. Ennek a bevonatnak az eltávolítása megkísérélhető például úgy, hogy kesztyűs hüvelykujjal befogják a PTFE csövet és körülbelül 10 másodpercen át rázogatták; a magnéziumszulfát-oldatot eltávolítják és megismétlik a rezisztenciamérést friss magnézium-szulfáttal.

Az átlagos TER eredmények elfogadásának feltétele, hogy az egyidejű pozitív és negatív kontrollértékek a módszer elfogadható tartományába essenek. Az itt leírt módszerhez és készülékhez javasolt kontrollanyagok és a hozzájuk tartozó, elfogadható ellenállás-tartományok az alábbiak:

Kontroll	Anyag	Ellenállás-tartomány (kΩ)
Pozitív	10 M sósav (36 %)	0,5-1,0
Negatív	Desztillált víz	10-25

1.5.3.3. Módosított eljárás felületaktív és semleges szerves anyagok vizsgálatára

Amennyiben a vizsgált anyagok felületaktív anyagok vagy semleges szerves anyagok és TER-értékei legfeljebb 5 kΩ, festékpentrációs vizsgálat hajtható végre a szöveteken. Az eljárással eldönthető, hogy az eredmények hamis pozitívak-e (2).

1.5.3.3.1. Szulforodamin B festék alkalmazása és eltávolítása

A vizsgált anyaggal végzett első kezelést követően desztillált vízzel készített 150 µl, 10 tömegszázalékos hígítású szulforodamin B festéket alkalmaznak minden egyes bőrkorong epidermális felületén két órán át. A bőrkorongokat ezután csapvízszugárral, legfeljebb szobahőmérsékleten mossák körülbelül 10 másodpercen át, a felesleges/meg nem tapadt festék eltávolítása érdekében. Minden egyes bőrdarabot gondosan eltávolítanak a PTFE csőről és egy, deionizált vizet (8 ml) tartalmazó ampullába (például, egy 20 ml-es üveg szcintillációs ampulla) helyezik. Az ampullákat óvatosan, 5 percen át rázogatták minden további felesleges/meg nem tapadt festék eltávolítása érdekében. Ezt az öblítési eljárást ezután megismétlik, majd eltávolítják a bőrkorongokat, és desztillált vízben lévő 5 ml 30 tömegszázalékos nátriumdodecilszulfátot (sodium dodecyl sulphate, SDS) tartalmazó ampullába helyezik, és egy éjszakán át 60 °C hőmérsékleten inkubálják. Inkubálást követően valamennyi bőrkorongot eltávolítják, és kidobják azokat, majd a megmaradó oldatot 8 percen át 21 °C hőmérsékleten centrifugálják (relatív centrifugális erő 175). A felülúszó 1 ml-ét ezután 1:5 arányban (térfogat/térfogat) (azaz 1 ml + 4 ml) hígítják, desztillált vízzel készített 30 tömegszázalékos SDS-sel. Megméri az oldat optikai sűrűségét (optical density, OD) körülbelül 565 nm-nél.

1.5.3.3.2. Festéktartalom kiszámítása

Az OD-értékekből kiszámítják a szulforodamin B festéktartalmat korongonként (szulforodamin B festék moláris extinció együtthatója 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulásúly = 580). Meghatározzák minden egyes bőrkorong szulforodamin B festéktartalmát, és ezután kiszámítják a megismételt mérésekhez szükséges átlagos festéktartalmat. Az átlagos festékmegkötési eredmények abban az esetben fogadhatók el, ha a párhuzamos kontrollértékek a módszer esetében elfogadható tartományban vannak. Az itt leírt módszer és készülék esetében a kontrollanyagokhoz a javasolt elfogadható festéktartalom-tartományok a következők:

Kontroll	Anyag	Festéktartalom-tartomány (µg/bőrdarab)
Pozitív	10 M sósav (36 %)	40-100
Negatív	Desztillált víz	15-35

1.5.3.4. További információ

A vizsgált anyagok rövidebb időtartamban (például 2 órás időtartamban) is alkalmazhatók a bőrdaraboknál az erősen korrozív anyagok azonosítására. Azonban a hitelesítési vizsgálat szerint a TER-vizsgálatról megállapították, hogy túlbecsülhető több vizsgált vegyi anyag korrozív képessége a bőrdarabokon való kétórás alkalmazást követően, (2), ugyanakkor, a 24 órás alkalmazás már lehetővé teszi a korrozív és nem korrozív anyagok pontos elkülönítését.

Az alkalmazott vizsgálati berendezés sajátosságai és méretei valamint az eljárás módja befolyásolhatja a kapott TER-értékeket. Az 5 kΩ-os korrozív határértéket ezen módszerben leírt különleges készülékkel és eljárással kapott adatokból határozták meg. Ettől eltérő határ- és kontrollértékeket akkor lehet alkalmazni, ha a vizsgálati körülményeket jelentős mértékben megváltoztatják. Ezért ajánlatos a módszert és az ellenállás határértékét a hitelesítési vizsgálatban használt kémiai anyagokból kiválasztott referenciastandard-anyagok sorozatának vizsgálatával meghatározni (3).

1.6. A vizsgálati módszer elve – humán bőrpróba

A vizsgált anyagot legfeljebb 4 órán át egy háromdimenziós emberi bőr modellre helyezik, amely funkcionális stratum corneummal rendelkező rekonstruált epidermiszből áll. A korrozív anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy az előírt expozíciós idő alatt a sejtelétképességet meghatározott határérték alá csökkentik (amelyet például MTT- csökkenésvizsgálat segítségével határoznak meg). A vizsgálat alapelve megegyezik azzal a feltételezéssel, hogy azok az anyagok korrozívak, amelyek képesek áthatolni a stratum corneumon (diffúzióval vagy erózió útján), és elegendően citotoxikusak ahhoz, hogy sejtelhalást okozzanak az alatta lévő sejtrétegekben.

1.7. A vizsgálati módszer leírása – humán bőrpróba

1.7.1. Humán bőrmodellek

A humán bőrmodellek különböző forrásokból származhatnak, de meg kell felelniük bizonyos követelményeknek. A modellnek rendelkeznie kell működő stratum corneummal, valamint egy alatta lévő élő sejtréteggel. A stratum corneum barrier funkciójának megfelelőnek kell lennie. Ez a modellnek a citotoxicitással szembeni ellenállásának bizonyításával mutatható be olyan anyagok alkalmazását követően, amelyekről ismert, hogy a sejtek számára citotoxikusak, de amelyek rendes körülmények között nem hatolnak át a stratum corneumon. A meghatározott kísérleti körülmények között a modellnek reprodukálható eredményeket kell adnia.

A modellben lévő élő sejtek életképességének megfelelően nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy jól megkülönböztethető legyen a pozitív és negatív kontrollanyag. A negatív kontrollanyagok való expozíciót követően, a sejtelétképességnek (például az MTT redukcióval, azaz egy OD-értékkel mérve) az adott modellhez tartozó elfogadható határokon belül kell maradnia. Ehhez hasonlóan, a pozitív kontrollanyagokkal kapott sejtelétképesség-értékeknek (a negatív kontrollanyagokhoz kapott értékekhez viszonyítva) a megadott határokon belül kell maradniuk. A legfontosabb, hogy az alkalmazott modell megfeleljen a nemzetközileg hitelesített szabványnak (2).

1.7.2. Vizsgálati eljárás

1.7.2.1. A vizsgált anyag alkalmazása

Folyékony anyagok esetében elegendő vizsgált anyagot kell használni ahhoz, hogy az befedje a bőrfelületet (minimum 25 µl/cm²). Szilárd anyagok esetében elegendő anyagot kell felvinni a bőr befedéséhez, és ezután azt meg kell nedvesíteni a bőrrel való megfelelő érintkezés biztosítására; adott esetben a szilárd anyagokat porrá kell őrölni alkalmazásuk előtt. Az alkalmazási módszer legyen megfelelő a legtöbb vegyi anyag-típusnál (2). Az expozíciós időszak végén a vizsgált anyagot sóoldattal gondosan le kell mosni a bőr felületéről.

1.7.2.2. A sejtek életképességének vizsgálata

Bármilyen kvantitatív, hitelesített módszer használható a sejtek életképességének vizsgálatához. A leggyakrabban az MTT-redukciót alkalmazzák, amely bizonyíthatóan pontos és reprodukálható eredményeket ad a különböző laboratóriumokban (2). A bőrkorongot 0,3 mg/ml-es, 20-28 °C hőmérsékletű MTT oldatba helyezik 3 órás időtartamra. Ezután eltávolítják a kicsapódott kék formazán terméket (oldószeres extrahálás), és az OD meghatározása útján megméri a formazán koncentrációját 545 és 595 nm hullámhossz között.

1.7.2.3. További információ

Az alkalmazott bőrmódel, az expozíciós idő és mosási eljárások, stb. nagymértékben befolyásolják a sejt életképességét. Ajánlott a módszer és az előrejelző modell kalibrálása az ECVAM hitelesítési vizsgálatban használt vegyi anyagokból kiválasztott referenciastandard-anyagok vizsgálatával (3). Döntő fontosságú, hogy az alkalmazott módszer a nemzetközi szabványoknak megfelelően laboratóriumokon belül és laboratóriumok között a vegyi anyagok széles körében reprodukálható legyen. Minimális követelményként a módszer feleljen meg a korábban meghatározott tudományos hitelességnek (2), továbbá az ilyen hitelességi vizsgálat eredményei egy tudományos folyóiratban jelenjenek meg.

2. ADATOK

2.1. Eredmények feldolgozása

2.1.1. TER-vizsgálat patkánybőrön

A vizsgált anyaghoz, pozitív és negatív kontrollokhoz és minden standard referencia vegyi anyaghoz megállapított ellenállásértékeket ($k\Omega$) táblázat formájában kell megadni, beleértve a párhuzamos/megismételt kísérleteknél kapott adatokat, átlagértékeket és a megállapított osztályozást is.

2.1.2. Vizsgálat humán bőrmódelen

A vizsgált anyaghoz, pozitív és negatív kontrollokhoz és minden standard referencia-vegyianyaghoz kapott OD-értékeket és a számított, százalékos sejtéletképesség-adatokat táblázat formájában kell megadni, beleértve a párhuzamos/megismételt kísérleteknél kapott adatokat, átlagértékeket és a megállapított osztályozást.

2.2. Eredmények értékelése és értelmezése

2.2.1. TER-vizsgálat patkánybőrön

Amennyiben a vizsgált anyag esetében a mért TER-átlagérték nagyobb, mint $5 k\Omega$, akkor az anyag nem korrozív hatású. Amennyiben a TER-érték kisebb, mint $5 k\Omega$, vagy ezzel egyenlő és a vizsgált anyag nem felületaktív, vagy semleges szerves anyag, akkor az korrozív hatású anyag.

Azon felületaktív vagy semleges szerves anyagok esetében, amelyek $5 k\Omega$ -nál kisebb vagy ezzel egyenlő TER-értékeket adnak, elvégezhető a festékpentrációs vizsgálat. Amennyiben a bőrkorong átlagos festéktartalma nagyobb vagy egyenlő az ezzel egyidejűleg 36% -os HCl pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalommal, akkor a vizsgált anyag valódi pozitív, és ebből következően korrozív. Amennyiben a bőrkorong átlagos festéktartalma kisebb az ezzel egyidejűleg 36% -os HCl pozitív kontrollnál mért átlagos bőrdarab-festéktartalomnál, a vizsgált anyag hamis pozitív, és ebből következően nem korrozív az anyag.

2.2.2. Vizsgálat emberi bőrmódelen

A negatív kontroll OD-értéke a 100% -os sejtéletképességet jelenti; ebből következően, az egyes vizsgálati mintáknál kapott OD-értékek használhatók a negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. A korrozív vizsgált anyagokat a nem korrozív vizsgált anyagoktól megkülönböztető (vagy a különböző korrozív anyag osztályokat megkülönböztető), százalékban megállapított sejtéletképesség határértéket egyértelműen meg kell határozni az előrejelző modellben a módszer hitelesítése előtt, és az azt követő hitelesítési vizsgálatnak igazolnia kell, hogy az érték megfelelő (2).

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek legalább az alábbi információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

- azonosító adatok, fizikai sajátosság, és adott esetben, a fizikai, kémiai tulajdonságok. Adott esetben hasonló információkat kell megadni a referenciaanyagokról is.

Vizsgálati körülmények:

- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei,
- minden módosítás leírása és indoklása.

Eredmények:

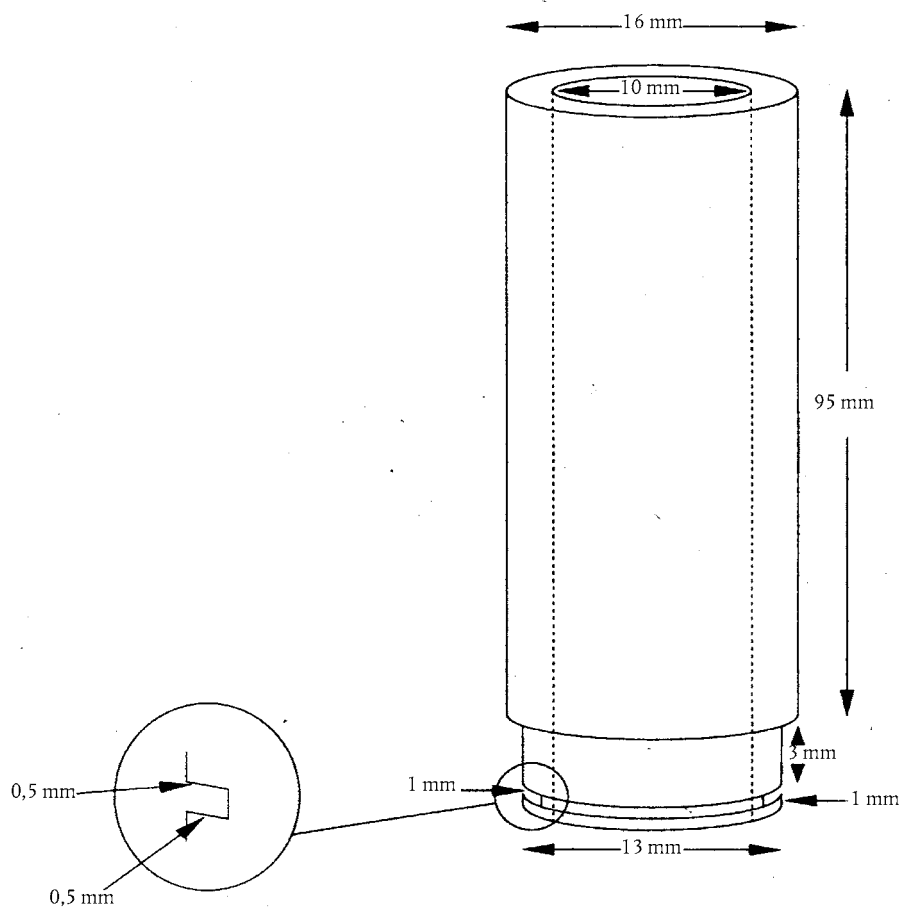
- a vizsgált anyaghoz, pozitív és negatív kontrollhoz és minden standard referencia-vegyianyaghoz kapott ellenállás-értékek (TER-vizsgálat) vagy százalékban meghatározott sejtleletképeség-értékek (vizsgálat emberi bőrm modellen), beleértve a párhuzamos/megismételt kísérletek során kapott adatokat és a átlagértékeket is, az adatok táblázatba történő összefoglalása,
- minden más megfigyelt hatás leírása.

Eredmények értékelése.**Következtetések.****4. SZAKIRODALOM**

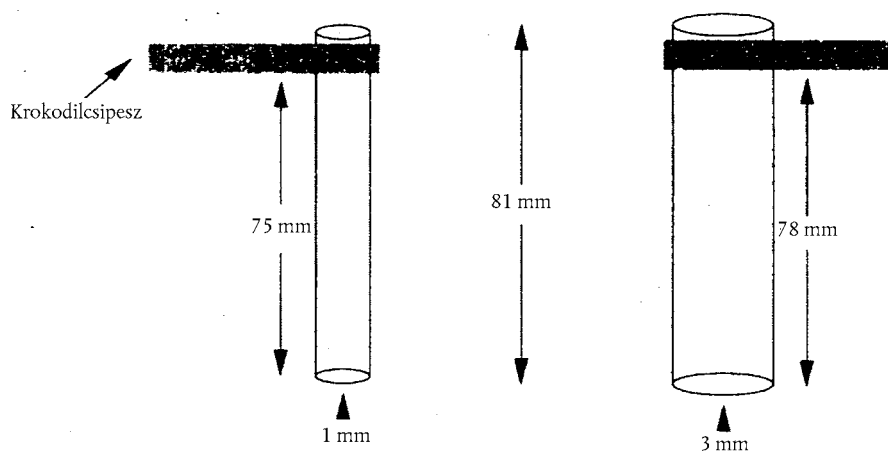
1. ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, 275-280. oldal.
2. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holz-hutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in Vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro*, 12, pp. 483-524. oldal.
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. I. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro*, 12, pp. 471-482. (Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P. és Worth, A. P. (1998).
4. Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test – modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, 507-512. oldal.
5. Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Garder, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro*, 6, 191-194. oldal.
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, 709-720. oldal.
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, 219-255. oldal.

1. ábra

PTFE cső méretei

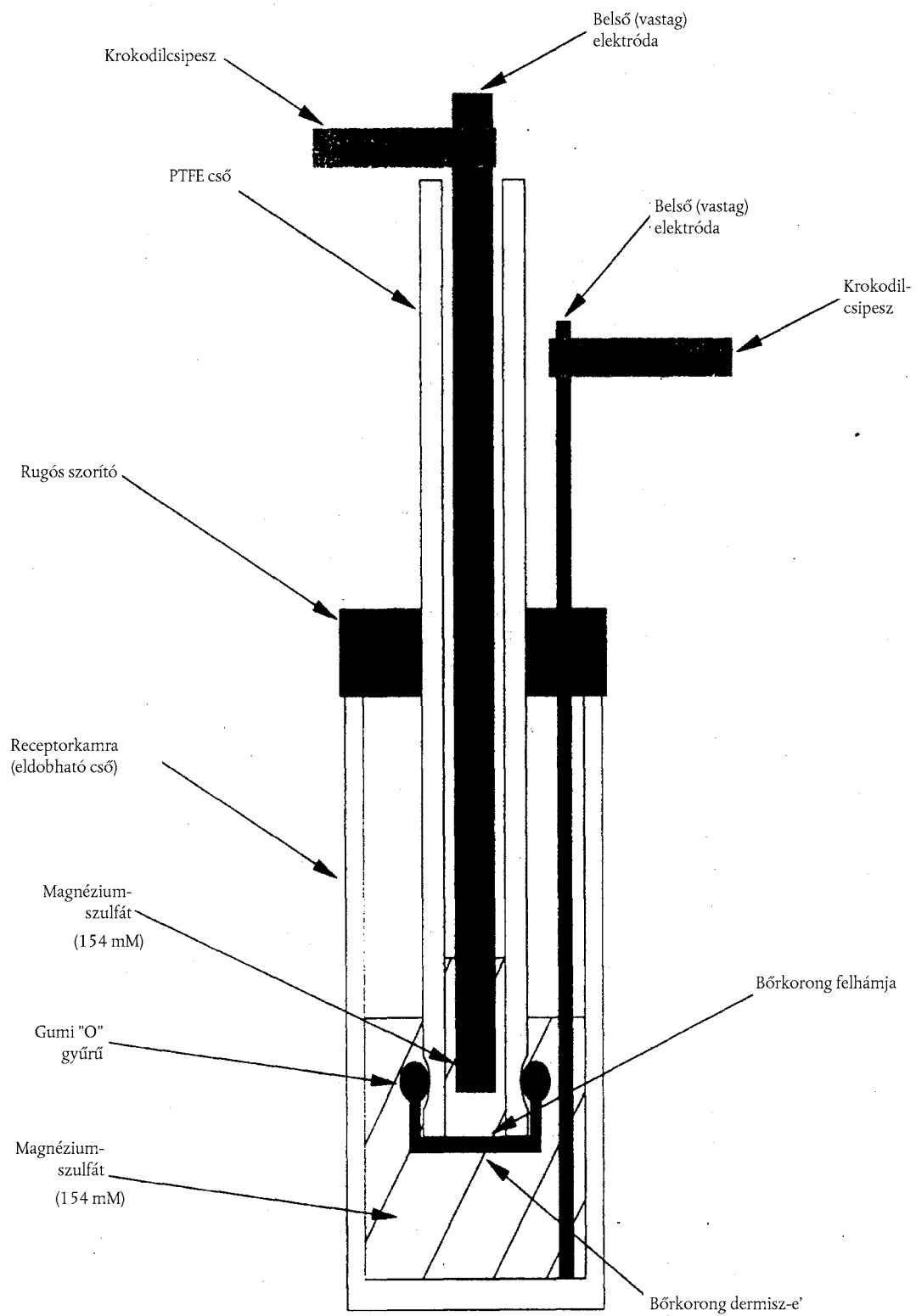


Elektróda méretek



2.ábra

A patkánybőr TER-vizsgálathoz használt berendezés



II. MELLÉKLET

„B. 41. FOTOTOXICITÁS – IN VITRO 3T3 NRU FOTOTOXICITÁS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A fototoxicitás a bőrnek először bizonyos vegyi anyagok hatásának, majd ezt követően fény hatásának való expozíciója után megállapított, vagy ehhez hasonlóan valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzásával előidézett toxikus reagálás.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatból megállapított információk valamely vizsgált anyag potenciális fototoxikusságának, azaz azoknak a lehetséges veszélyeknek a létezésének, vagy hiányának meghatározására szolgálnak, amelyek valamely vizsgált anyagból valamint az ibolyántúli és látható fény hatásának való expozíciójából származhatnak.

mivel az *in vitro* vizsgálat toxikológiai végpontja a kémiai anyag és a fény együttes hatása által előidézett fototoxicitás meghatározása, a vizsgálat azonosíthatja azokat az összetevőket, amelyek *in vivo* fototoxikusak a szisztematikus alkalmazás és a bőrrel való érintkezés után, valamint azokat az összetevőket, amelyek fotoirritánsokként hatnak a bőrön való helyi alkalmazás után.

A *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatot egy közös EU/COLIPA projekt fejlesztette ki és érvényesítette 1992-től 1997-ig (1), (2), (3) a használatban lévő különböző *in vivo* vizsgálatok valamilyen hiteles *in vitro* alternatívájának bevezetésével. 1996-ban egy OECD munkabizottság lépcsőzetes *in vitro* vizsgálatot javasolt a fototoxicitás értékeléséhez (4).

A *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatból kapott eredményeket összehasonlították az állatokon és embereken kapott *in vivo* végzett fototoxicitás/fotoirritálás hatásaival, és a vizsgálatról bebizonyosodott, hogy az kiváló előrejelzést ad ezekről a hatásokról. A vizsgálatot nem arra tervezték, hogy előre jelezzen vegyi anyag és a fény együttes hatásából származó káros hatásokat, ilyenek például a fotogenotoxicitás, fotoallergia és fotokarcinogenitás, annak ellenére, hogy számos ilyen hatással rendelkező vegyi anyag pozitívan reagál az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban. A vizsgálat nem használható a fototoxicitás erősségének meghatározására.

A vegyi anyagok fototoxikus hatásának vizsgálatának egymást követő lépéseit a függelék ismerteti.

1.2. Fogalommeghatározások

Irradiáció: valamely felületre eső ibolyántúli (ultraviolet, UV) vagy látható fény intenzitása W/m^2 – ben vagy mW/cm^2 – ben mérve.

Fénydózis: valamely felületre eső ibolyántúli (UV) vagy látható fénysugárzás mennyisége (= intenzitás × idő) Joule (= $W \times s$) per felület, például J/m^2 vagy J/cm^2 .

Ibolyántúli fény hullámsávok: a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) által javasolt megjelölések: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) és UVC (100-280 nm). Más megjelöléseket is használnak: az UVB és UVA elválasztását gyakran 320 nm-re teszik, és az UVA felosztható UV-A1-re és UV-A2-re az elválás 340 nm-re esik.

Sejtéletképesség: valamely sejtpopuláció teljes aktivitását (például a neutrálvörös vitális festék felvételét a sejt lizoszómákba) mérő paraméter, amely a mért végponttól és a használt vizsgálati tervtől függően, korrelációban van a sejtek számával és/vagy életképességével.

Relatív sejtéletképesség: a sejt életképessége a teljes vizsgálati eljáráson (vagy + UV vagy -UV) keresztül alkalmazott, de a vizsgált anyaggal nem kezelt negatív (oldószer) kontrollokkal összefüggésben kifejezve.

Előrejelzési modell: valamely toxicitási vizsgálat eredményeinek a toxicitási potenciál előrejelzésé történő átalakításához használt algoritmus. Ebben a vizsgálati iránymutatóban PIF és MPE használható az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálat eredményeinek a fototoxicitási potenciál előrejelzésé történő átalakításához.

PIF (photo irritation factor, fotoirritációs tényező): a vizsgált vegyi anyagnak nem citotoxikus UVA/látható fényrel való besugárzása hiányában (-UV) és jelenlétében (+ UV) kapott két egyenlően hatékony citotoxikus koncentrációja (EC_{50}) összehasonlításával meghatározott tényező.

MPE (mean photo effect, átlagos fényhatás): nem citotoxikus UVA/látható fényrel való besugárzás hiányában (-UV) és jelenlétében (+ UV) kapott két koncentrációválasz-görbe teljes alakjának matematikai elemzéséből levezetett újszerű mérési eredmény.

Fototoxicitás: a bőrnek először bizonyos vegyi anyagok hatásának és ezt követően fény hatásának való expozíció után megállapított vagy ehhez hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzásával előidézett akut toxikus reakciók.

Fotoirritáció: a »fototoxicitás« kifejezésnek egy alfogalma, amely csak azokra a fototoxikus reakciókra vonatkozik, amelyeket a vegyi anyagok (helyileg vagy orálisan) váltanak ki. Ezek a fototoxikus reakciók mindig nem specifikus sejtkárosodáshoz (nap okozta légésszerű reakciók) vezetnek.

Fotoallergia: szerzett immunológiai válaszkészség, amely a vegyi anyaggal és a fényvel való első kezeléskor nem jelentkezik, és a bőrreakció egy vagy két hetes indukciós időtartam után mutatható ki.

Fotogenotoxicitás: valamilyen genetikai végponttal megfigyelt genotoxikus válasz, amelyet a sejteknek nem genotoxikus ibolyántúli/látható fény dózisnak és nem genotoxikus vegyi anyagnak való expozíció után állapítanak meg.

Fotókarcinogenitás: fény és vegyi anyag ismételt alkalmazása által előidézett karcinogén hatás. A »foto-karcinogenezis« kifejezést használják, amennyiben valamely vegyi anyag növeli az ibolyántúli fény által előidézett tumorképződést.

1.3. Referenciaanyagok

Amellett, hogy klórpromazint minden meghatározáshoz pozitív kontrollként kell használni, egy újonnan kialakított vizsgálat esetén, mint amilyen a 3T3 NRU fototoxicitás próba, ajánlott, hogy olyan referenciaanyag-csoportot használjanak, amelyet a laboratórium közötti mérések összehasonlításakor használnak. (1), (3), (13).

1.4. Kezdeti megfontolások

Számos vegyi anyagról megállapították, hogy fototoxikus hatással rendelkeznek (5), (6), (7), (8). Ezek egyetlen közös jellemzőjük az a képesség, hogy a napfény hullámhosszának tartományában képesek fényenergiát abszorbeálni. A fotokémia első törvénye (Grotthaus-Draper törvény) szerint a fotoreakcióhoz megfelelő fény mennyiség abszorpciójára van szükség. Ezért ezen vizsgálati iránymutatásnak megfelelő biológiai vizsgálat elvégzése előtt meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag UV/látható fény abszorpció spektrumát (például az OECD 101 vizsgálati iránymutatásnak megfelelően). Amennyiben a moláris extinkció/abszorpció együttható kisebb, mint $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, a vegyi anyagnak nincs fotoreaktív potenciálja, és a káros fotokémiai hatások kiderítéséhez nem szükséges az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás, vagy valamilyen más biológiai vizsgálat elvégzése (függelék).

1.5. A vizsgálati módszer elve

Négy olyan mechanizmust határoztak meg, amellyel valamely (kémiai) kromofór fényabszorpciója fototoxikus választ eredményezhet (7). Ezek közül mindegyik sejtkárosodást eredményez. Ezért az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálat a nem citotoxikus UVA/látható fény dózisának való expozíció jelenlétében és hiányában vizsgált valamely vegyi anyag citotoxicitásának összehasonlításán alapul. E vizsgálatban a citotoxicitást 24 órával a vizsgált vegyi anyaggal kezelés és besugárzás után a vitális neutrálvíz (neutral red, NR) festék felvételének koncentrációfüggő csökkentéseként (9) határozzák meg.

Balb/c 3T3 sejteket tenyésztene 24 órán át egy sejtréteg kialakulásáig. Ezután vizsgált vegyi anyagokként két, 96 lyukú tenyésztőlemez preinkubálnak 1 órán át, a vegyi anyag 8 különböző koncentrációjával. Ezt követően a két lemez közül az egyiket 5 J/cm^2 UVA, nem citotoxikus UVA/látható fény dózis hatásának teszik ki (+ UV kísérlet), míg a másik lemezt sötétben tartják (-UV kísérlet). Ezután mindkét lemezen a kezelő médiumot tápoldatra cserélik ki, és 24 órás inkubálást követően meghatározzák a sejt életképességét 3 órás neutrálvíz felvétel segítségével (neutral red uptake, NRU). Mind a 8 vizsgált koncentráció esetében kiszámítják a relatív sejtéletképességet, a kezeletlen negatív kontrollok százalékként kifejezve. A fototoxicitási potenciál meghatározása érdekében összehasonlítják a besugárzás jelenlétében (+ UV) és annak hiányában (-UV) kapott koncentrációtól függő válaszokat, rendszerint az EC_{50} szinten, azaz annál a koncentrációnál, amely kezeletlen kontrollok 50 %-ánál gátolja a sejtéletképességet.

1.6. Minőségi követelmény

Sejtek érzékenysége UVA sugárzásra, történelmi adatok: a sejteket rendszeresen ellenőrizni kell UVA sugarakkal szembeni érzékenységet szempontjából. A sejteket az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban használt sejt koncentrációban a tenyésztőedényekre ráoltják, másnap besugározzák $1-9 \text{ J/cm}^2$ közötti UVA dózissal, és egy nappal később meghatározzák a sejtéletképességet az NRU vizsgálat segítségével. A sejtek abban az esetben felelnek meg a minőségi követelményeknek, ha 5 J/cm^2 UVA-val való besugárzás után az életképességük nem kisebb, mint a sötétben tartott kontrollok életképességének 80 %-a. A 9 J/cm^2 – es, legnagyobb UVA dózis alkalmazásakor az életképességnek nem szabad kisebbnek lennie a sötétben tartott kontrolloknál meghatározott életképesség 50 %-ánál. Ezt az ellenőrzést körülbelül minden 10. sejtpasszálásakor (passage) meg kell ismételni.

A negatív kontroll sejtek UVA sugárzással szembeni érzékenysége egyes vizsgálatok esetében: a vizsgálat megfelel a minőségi követelményeknek, ha a + UVA kísérletben 1 % dimetil-szulfoxid (DMSO) vagy 1 % etanol (EtOH) tartalmú vagy ezeket nem tartalmazó negatív kontrollok Earl-féle kiegyensúlyozott sóoldatban (EBSS) lévő sejtjei, a párhuzamos sötét kísérletben (-UVA) vizsgált, az ugyanolyan oldószerben lévő nem besugárzott sejtek életképességének legalább 80 %-át érik el.

Negatív kontrollok életképessége: a negatív kontrollok NR kivonatában mért abszolút optikai sűrűség (OD_{540} NRU) jelzi, hogy a tenyésztőlemez lyukaiiban elhelyezett 1×10^4 sejt a megduplázódott-e a vizsgálat 2 napja során. A vizsgálat kielégíti az elfogadhatósági követelményt, amennyiben a nem kezelt kontroll sejtek átlagos OD_{540} NRU értéke $\geq 0,2$.

Pozitív kontroll: valamely ismert fototoxikus anyagot párhuzamosan vizsgálnak minden *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatnál. Klórpromazint (CPZ) használtak pozitív kontrollként az EU/COLIPA hitelesítés során, és ezért ez a javasolt anyag. Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban a standard eljárással vizsgált CPZ-hez az alábbi követelményt határozták meg: CPZ besugárzott (+ UVA): $EC_{50} = 0,1-2,0$ $\mu\text{g/ml}$, CPZ nem besugárzott (-UVA): $EC_{50} = 7,0-90,0$ $\mu\text{g/ml}$. A fotoirritáció tényezőnek (photo irritation factor, PIF), azaz az EC_{50} eltolódásnak legalább 6-nak kell lennie.

A CPZ helyett párhuzamos pozitív kontrollként használhatók más olyan ismert fototoxikus vegyi anyagok is, amelyek megfelelnek a vizsgálat, értékelés alatti vegyi anyag kémiai osztályának vagy oldhatósági jellemzőinek. Ebben az esetben, a történelmi adatok alapján, az EC_{50} – értékek tartományát és a PIF vagy MPE (mean photo effect, átlagos fényhatás) értékeket megfelelően kell meghatározni a vizsgálat elfogadási követelményeként.

1.7. A vizsgálati módszer leírása

1.7.1. Előkészületek

1.7.1.1. Sejtek

Állandó egér fibroblast sejtstör – Balb/c 3T3, 31-es klón – ATCC-ből vagy ECACC-ből, használtak a hitelesítési vizsgálat során és ezért ez az ajánlott. Más sejtek vagy sejtstörök is használhatók sikeresen ugyanezzel a vizsgálati eljárással, amennyiben a tenyésztési körülményeket a sejtek sajátos igényeihez igazítják, de az egyenértékűséget bizonyítani kell.

Ellenőrizni kell, hogy a sejtek mikoplazmával nem szennyeződtek-e és csak akkor szabad használni, amennyiben kielégítő az eredménye.

mivel a sejtek UVA érzékenysége növekedhet a passzázatok számával, az elérhető legkisebb passzázatszámú – lehetőleg kevesebb, mint 100 – Balb/c 3T3 sejteket kell használni. Fontos a Balb/c 3T3 sejtek UVA érzékenységeinek rendszeres ellenőrzése az ebben az irányelvben leírt minőségellenőrzési eljárásnak megfelelően.

1.7.1.2. Tenyésztő oldatok és tenyésztési körülmények

Megfelelő tápoldatot és inkubálási körülményeket kell alkalmazni a rutin sejtpasszázás és a vizsgálat során. Balb/c 3T3 sejtek esetében ezek 10 %-os újszülött borjúszérummal, 4 mM glutaminnal, penicillinnel és streptomocinnal kiegészített DMEM; és 37 °C hőmérsékleten/7,5 %-os CO_2 mellett végzett nedvesített inkubálás. Különösen fontos, hogy a sejttenyésztési körülmények a használt sejtekre vagy törzsre történelmileg jellemző időtartamot biztosítsanak.

1.7.1.3. Tenyészetek elkészítése

Fagyasztott sejt kultúra állományból vett sejteket megfelelő sűrűséggel ráoltanak a tápoldatra, és másodlagos tenyészetet hoznak létre legalább egyszer, mielőtt az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban használnák őket.

A fototoxicitás vizsgálat esetében a sejteket olyan sűrűséggel oltják rá a tenyésztőfolyadékra, hogy a tenyészetek ne folyjanak egybe a vizsgálat végén, azaz akkor, amikor a sejt életképességét meghatározzák a sejtek ráoltása után 48 órával. A 96 lyukú edényekben tenyésztett Balb/c 3T3 sejtek esetében 1×10^4 sejt/lyuk a javasolt sejt sűrűség.

Minden egyes vizsgált vegyi anyag esetében a sejtek ráoltása azonosan történik a két, különálló, 96 lyukú lemezen, amelyeket ezután egyidejűleg visznek végig a teljes vizsgálati eljárás azonos tenyésztési körülmények között, azon időtartam kivételével, amely alatt az edény közül az egyiket besugározzák (+ UVA/vis), a másikat sötétben tartják (-UVA/látható fény).

1.7.1.4. Metabolikus aktiválás

mivel egészen a mai napig a metabolizáló rendszerek használata általános követelmény minden *in vitro* vizsgálatnál a genotoxikus és karcinogén hatás előrejelzéséhez, nem ismert olyan vegyi anyag, amelyhez metabolikus transzformációra lett volna szükség a kémiai anyag *in vivo* vagy *in vitro* fototoxin jellegének kimutatásához. Így tehát nem tekinthető sem szükségesnek, sem pedig tudományosan indokoltnak, hogy a vizsgálat elvégzéséhez metabolikus rendszert alkalmazzanak.

1.7.1.5. Vizsgált vegyi anyag/előkészítés

A vizsgált vegyi anyagokat közvetlenül a felhasználás előtt kell előkészíteni, kivéve ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát. Vörös fény alatti előkészítésre lehet szükség, amikor a gyors fotodegradációval kell számolni.

A vizsgált vegyi anyagokat puffertolt sóoldatokban, például Earl-féle kiegyensúlyozott sóoldatban (EBSS) vagy foszfát-pufferes sóoldatban (PBS) kell feloldani, amelyeknek a besugárzás alatti interferencia elkerülése érdekében protein komponensektől és fényelnyelő pH-indikátoroktól menteseknek kell lenniük.

A vízben rosszul oldható kémiai anyagokat megfelelő oldószerekben kell feloldani a kívánt végleges koncentráció 100-szorosának megfelelő koncentrációban, majd 1:100-ra kell hígítani a puffertolt sóoldattal. Amennyiben oldószert használnak, annak egy térfogat-százalékos koncentrációjának jelen kell lennie minden kultúrában, azaz a negatív kontrollokban, valamint a vizsgált vegyi anyag minden koncentrációjában is.

A javasolt oldószerek a Dimetil-szulfoxid (DMSO) és etanol (EtOH). Megfelelőek lehetnek más kevésbé citotikus oldószerek (például aceton), azonban sajátos tulajdonságaik megállapítása érdekében ezeket gondosan meg kell vizsgálni, ilyen például a reakciókészség a vizsgált vegyi anyaggal, a fototoxikus hatás elfojtása, gyökfogyó tulajdonságok.

Vortex keverőt és/vagy szonikálást és/vagy 37 °C-ig történő melegítés használható, amennyiben szükséges, az oldódás elősegítésére.

1.7.1.6. UV besugárzás/előkészítés

Fényforrás: megfelelő fényforrás és megfelelő szűrő kiválasztása a legfontosabb tényező a fototoxicitás vizsgálatban. Az UVA és látható fénytartományok rendszerint fotoszenzibilizációt váltanak ki (7), (10) míg az UVB kisebb jelentőségű és közvetlenül nagymértékben citotoxikus, ami 313-tól 280 nm-ig 1 000-szeresére nő. A megfelelő fényforrás kiválasztása követelményeinek magában kell foglalnia azt a lényeges követelményt, hogy a fényforrás a vizsgált anyag által abszorbeált hullámhosszúságú fényt bocsássa ki, továbbá hogy az (elfogadható időn belül elérhető) fénydózisnak elegendőnek kell lennie az ismert fotoszenzibilizáló anyagok kimutatására. Ezen kívül az alkalmazott hullámhosszúság és dózis nem lehet indokolatlanul káros a vizsgálati rendszerre, amely magában foglalja a hő kibocsátást (infravörös tartomány).

A napfény szimulálását szoláris szimulátorokkal optimális fényforrásnak tekintik. A szoláris szimulátorokban Xenon ívfényeket és (dotált) higany-fém-halogén ívfényeket használnak. Az utóbbinak megvan az az előnye, hogy kevesebb hőt bocsát ki és olcsóbb, de nem felel meg tökéletesen a napfénynek. Mivel minden napszimulátor jelentős mennyiségű UVB-t bocsát ki, ezeket megfelelő módon szűrni kell a nagymértékben citotoxikus UVB hullámhosszúságok csökkentése érdekében.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatához gyakorlatilag UVB-mentes sugárzási spektrumot kell használni (UVA:UVB ~ 1:20). Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálat hitelesítésénél használt szűrt szoláris szimulátor spektrális sugárzási eloszlására már közöltek példát (3).

Dozimetria: minden egyes fototoxicitás vizsgálat előtt rendszeresen ellenőrizni kell a fény (besugárzás) intenzitását az erre alkalmas szélessávú UV-mérő segítségével. Az UV-mérőt a fényforráshoz kell kalibrálni. Ellenőrizni kell az UV-mérő teljesítményét, és erre a célra egy azonos típusú és kalibrálású második UV-mérő használata ajánlott. Ideális esetben, nagyobb időközönként, egy spektrométert kell használni a szűrt fényforrás spektrális sugárzásának mérésére és a szélessávú UV-mérő kalibrációjának ellenőrzésére, de az ilyen műszerek szakszerű működtetéséhez megfelelően képzett személyekre van szükség.

A hitelesítési vizsgálat az 5 J/cm² (UVA) dózissal megállapította, hogy az nem citotoxikus a Balb/c 3T3 sejtek számára, és elegendően hatékony ahhoz, hogy még a gyengén fototoxikus kémiai anyagokat is aktiválja. 50 perces időtartamon belül 5 J/cm² elérése érdekében a besugárzást 1,666 mW/cm²-re kell állítani. Más sejt vagy más fényforrás használatakor előfordulhat, hogy kissé adaptálni kell az UVA dózist azzal a feltétellel, hogy az új dózis ne legyen káros a sejtekre, és elegendő legyen a standard fototoxinok észlelésére. A fény hatásának való expozíció időtartama a következő módon számítható ki:

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

1.7.2. Vizsgálati körülmények

A vizsgált kémiai anyag legnagyobb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µg/ml értéket, mivel minden fototoxikus kémiai anyagot regisztráltak ennél kisebb koncentrációk mellett, míg nagyobb koncentrációknál megnövekszik a hamis pozitívok (túlbecslések) előfordulása (13). A vizsgált anyag pH-jának kielégítőnek kell lennie a legnagyobb koncentrációban is. (pH tartomány: 6,5-7,8).

A fény jelenlétében (+ UVA) és hiányában (-UVA) vizsgált kémiai anyag koncentráció-tartományait megfelelően kell meghatározni az előzetes, tartományt megállapító kísérletekben. Valamely koncentrációsor tartományát és léptékét úgy kell beállítani, hogy a kísérleti adatok megfelelően alátámasszák a koncentráció-válasz görbéket. Mértani koncentrációsorozatot (konstans hígítási tényezővel) kell használni.

1.7.3. Vizsgálati eljárás ⁽¹⁾

1.7.3.1. Első nap

A tápoldatban 1×10^5 sejt/ml sejtuszpenziót kell elkészíteni és csak 100 μ l tápoldatot kell adagolni egy 96-lyukú mikrotiter tenyésztőlemez perifériás helyeire (= blankok). A többi lyukba 100 μ l 1×10^5 sejt/ml-es sejtuszpenziót (= 1×10^4 sejt/üreg) kell adagolni. Minden egyes vizsgált anyaghoz két lemezt kell készíteni: egyet a citotoxicitás meghatározásához (-UVA) és egyet a foto-citotoxicitás meghatározásához (+ UVA).

A sejteket 24 órán át kell inkubálni (7,5 % CO₂, 37 °C), amíg félig egybefolyó egyréteget nem alkotnak. Ez az inkubálási időtartam lehetővé teszi a sejtfelépülést és adhéziót, valamint az exponenciális szaporodást.

1.7.3.2. Második nap

Inkubálást követően el kell távolítani a tápoldatot a sejtekről, és kétszer, üregenként 150 μ l EBSS/PBS-sel kell lemosni. A vizsgált anyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó vagy csak oldószert (negatív kontroll) tartalmazó 100 μ l EBSS/PBS-t kell használni. A vizsgált vegyi anyag 8 különböző koncentrációját kell használni. A sejteket a vizsgált anyaggal sötétben, 60 percig kell inkubálni (7,5 % CO₂, 37 °C).

A vizsgálat + UVA részének elvégzéséhez a sejteket szobahőmérsékleten 50 percen át a 96 lyukú lemez fedelén keresztül 1,7 mW/cm² UVA-val (= 5 J/cm²) kell sugározni. A H₂O kondenzálódás megakadályozása érdekében ventilátorral kell szellőztetni. A párhuzamosan vizsgált lemezeket szobahőmérsékleten, egy sötét dobozban 50 percig (= UVA expozíciós idő) kell tartani.

A vizsgált oldatot el kell távolítani, és kétszer meg kell mosni 150 μ l EBSS/PBS-vel. Az EBSS-t/PBS-t tápoldatra kell kicserélni, és (7,5 % CO₂, 37 °C) egy éjszakán át kell inkubálni (18-22 óra).

1.7.3.3. Harmadik nap

Mikroszkópos értékelés

A sejteket egy fáziskontraszt-mikroszkóp alatt kell megvizsgálni. A vizsgált anyag citotoxikus hatásai miatt a sejtek morfológiájában bekövetkezett változásokat fel kell jegyezni. Ez az ellenőrzés a kísérleti hibák kizárására ajánlott, de ezek a feljegyzések nem használhatók a citotoxicitás és fototoxicitás értékeléséhez.

Neutrálrvörös felvétel

A sejteket 150 μ l előmelegített EBSS/PBS-vel kell megmosni. A mosó oldatot óvatos ütögetéssel kell eltávolítani. 100 μ l NR tápoldatot kell hozzáadni, és 37 °C hőmérsékleten inkubálni, 7,5 %-os CO₂ páras légkörben, 3 órán keresztül.

Inkubálás után az NR tápoldatot el kell távolítani, és a sejteket 150 μ l EBSS/PBS-sel kell megmosni. Az EBSS/PBS-t teljesen le kell önteni, és fel kell itatni. (Másik választható lehetőség: a megfordított lemezt centrifugálni kell).

Pontosan 150 μ l NR deszorpciós oldatot kell hozzáadni (frissen elkészített etanolt/ecetsavat).

A mikrotiter lemezt egy mikrotiter lemezrázó készülékben 10 percen át gyorsan kell rázni, amíg az NR homogén oldatot képezve ki nem válik a sejtekből.

Az NR kivonat optikai sűrűségét 540 nm-nél egy spektrofotométerrel kell megmérni, referenciaként blankokat használva. Az adatokat megfelelő fájl formátumban (például ASCII) a későbbi elemzéshez el kell menteni.

2. ADATOK

2.1. Adatok minősége és mennyisége

Az adatoknak lehetővé kell tenniük az UVA/látható fény jelenlétében illetve hiányában kapott koncentráció-válasz elemzését. Amennyiben citotoxikus hatás jelentkezik, mind a koncentrációtartományt, mind az egyes koncentrációk megállapítását úgy kell elvégezni, hogy lehetővé váljon egy görbe illesztése a kísérleti adatokhoz. Tekintettel arra, hogy a vizsgált anyag a sötét kísérletben esetleg nem lesz citotoxikus (-UVA) egészen a 100 µg/ml-ben meghatározott koncentrációhatárig, de erősen citotoxikussá válik besugárzás hatására (+ UVA), ezért a kísérlet mindkét részében a koncentráció-tartományoknak nagyságrendekkel el kellene térniük egymástól, a megfelelő adatminőség követelményének kielégítése érdekében. Amennyiben nem volt citotoxicitásra utaló jel a kísérlet egyik részében sem (-UVA és + UVA), elegendő az egyes vizsgált koncentrációk közötti nagy különbség, egészen a legnagyobb koncentrációig.

Nem követelmény, hogy az egyértelmű pozitív eredmény igazolására a kísérlet megismétlése. Továbbá a nyilvánvaló negatív eredményeket sem kell ellenőrizni, feltéve, hogy a vegyi anyagot megfelelően nagy koncentrációban vizsgálták. Ilyen esetekben elegendő egyetlen fővizsgálat, amit egy vagy több koncentráció tartománymérő előzetes kísérlet támaszt alá.

A predikációs modell határhatárértékéhez közeli eredményeket adó vizsgálatokat meg kell ismételni ellenőrzési céllal.

Amennyiben ismételt vizsgálat szükséges, fontos lehet a kísérleti körülmények megváltoztatása egyértelmű eredmény elérése érdekében. Ebben a vizsgálatban kulcskérdés a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítése. Ezért a feltételek megváltoztatása (segédoldószer, őrlés, szonikálás) lehet a leglényegesebb valamely vizsgálat megismétlésében. Más megoldásként megfontolható a sugárzás előtti inkubációs idő változtatása. Vízzel instabil vegyi anyagok esetében lényeges lehet a rövidebb idő alkalmazása.

2.2. Az eredmények feldolgozása

Amennyiben lehetséges, meghatározzák a vizsgált vegyi anyagnak, a sejtek NRU-felvételét 50 %-ban gátló, (EC₅₀) koncentrációját. Ez a koncentráció-válasz adatokhoz megfelelő nem-lineáris regressziós eljárás (lehetőleg Hill függvény vagy logisztikus regresszió) alkalmazásával vagy más illesztési eljárások használatával tehető meg (14). Az EC₅₀ – értéknek a további számításokhoz való felhasználása előtt megfelelően ellenőrizni kell az illesztés minőségét. Más lehetőségként az EC₅₀ kiszámításához grafikus illesztési módszer használható. Ebben az esetben valószínűségi diagram papír használata ajánlott (x-tengely: log, y-tengely: probit), mivel sok esetben ez után a transzformáció után a koncentráció-válasz összefüggést leíró függvény majdnem lineárisra fog transzformálódni.

2.3. Az eredmények értékelése (Predikációs modellek)

2.3.1. Predikációs modell, 1. változat: fotoirritációs-tényező (photo-irritation-factor, PIF)

A fény jelenlétében (+ UVA), illetve annak hiányában (-UVA) kapott teljes koncentráció-válasz görbék ismeretében az alábbi képlet segítségével számítható ki a fotoirritációs tényező (PIF):

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

A $PIF < 5$ azt jelzi, hogy nincs fototoxikus potenciál, míg a $PIF \geq 5$ fototoxikus potenciált jelez.

Amennyiben valamely vegyi anyag csak + UVA mellett citotoxikus és nem citotoxikus -UVA mellett, a PIF nem számítható ki, annak ellenére, hogy ez egy olyan eredmény, amely fototoxikus potenciált jelez. Ilyen esetekben kiszámítható egy »> PIF«, amennyiben elvégezték a (-UV) citotoxicitás vizsgálatot egészen a legnagyobb vizsgálati koncentrációig (C_{max}) és ezt az értéket használják az »> PIF« kiszámításához.

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

Amennyiben csak »>PIF« számítható, akkor bármilyen egynél nagyobb érték fototoxikus potenciált jelez.

Amennyiben sem a (-UV) sem a (+ UV) melletti EC₅₀ nem számítható ki, mert a vegyi anyag semmilyen citotoxicitást nem mutat egészen a legnagyobb vizsgált koncentrációig, ez azt jelzi, hogy nincs fototoxikus potenciál. Ilyen esetben egy formális »PIF = *1« – et használnak az eredmény jellemzésére:

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

Amennyiben csak »PIF = *1« számítható, ez azt jelzi, hogy nincs fototoxikus hatás.

A b) és c) esetekben az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban elért koncentrációkat gondosan kell figyelembe venni a fototoxicitási potenciál előrejelzésénél.

2.3.2. *Predikációs modell, 2. változat: átlagos fényhatás (mean-photo effect, MPE)*

Más lehetőségként a fototoxikus hatás előrejelzésére szolgáló modellnek egy újszerű változata alkalmazható, amelyet az EU/COLIPA hitelesítési vizsgálatának adatait felhasználva fejlesztettek ki, és amit »vakon« vizsgáltak, amikor egy későbbi vizsgálatban az UV-szűrők vegyi anyagainak az *in vitro* fototoxicitása tanulmányozták (13). Ez a modell meghaladja a PIF modell korlátját azokban az esetekben, ahol nem állapítható meg az EC_{50} . A modell a »átlagos fényhatást« (MPE) használja, amely a teljes koncentráció-válasz görbék összehasonlításán alapuló mérték. Az MPE modell alkalmazásához egy speciális számítógép szoftvert fejlesztettek ki a Humboldt Egyetemen (Berlin), ami ingyen beszerezhető.

2.4. **Az eredmények értelmezése**

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálat pozitív eredménye (PIF ≥ 5 vagy MPE $\geq 0,1$) azt jelzi, hogy a vizsgált anyag fototoxikus hatással rendelkezik. Amennyiben ez az eredmény 10 $\mu\text{g/ml}$ alatti koncentrációnál jelentkezik, a vizsgált vegyi anyag valószínűleg fototoxinként is viselkedik különböző *in vivo* expozíciós körülmények között. Amennyiben pozitív eredményt csak a 100 $\mu\text{g/ml}$ -es legnagyobb vizsgált koncentráció alkalmazásával kapnak, további megfontolásokra lehet szükség a veszély vagy fototoxikus hatás értékeléséhez. Ezek közé tartozhatnak a vegyi anyagnak a bőrbe való behatolásával, abszorpciójával és esetleges felhalmozódásával kapcsolatos adatok vagy a vegyi anyag vizsgálata egy ellenőrző alternatív vizsgálatban, például *in vitro* emberi bőrmodell használatával.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitási vizsgálat negatív eredménye (PIF < 5 vagy MPE $< 0,1$) azt jelzi, hogy a vizsgált anyag az alkalmazott körülmények között nem volt fototoxikus az emlős sejt kultúrákban. Azokban az esetekben, ahol a kémiai anyag a 100 $\mu\text{g/ml}$ -es legnagyobb koncentrációig volt vizsgálható a negatív eredmény azt jelzi, hogy a kémiai anyagnak nincs fototoxikus potenciálja, és *in vivo* fototoxikus. Azokban az esetekben, ahol azonos koncentráció-válasz eredményeket ($EC_{50} +UV$ és $EC_{50} -UV$) kaptak alacsonyabb koncentrációk mellett, az adatok értelmezése azonos lehet. Ezzel ellentétben, ha a vizsgálat nem bizonyított semmilyen toxicitást (+ UV és -UV), és ha a vízben oldhatóság 100 $\mu\text{g/ml}$ -nél kisebb értékre korlátozta a koncentrációkat, megkérdőjelezhető a vizsgált anyag összeférhetősége a vizsgálattal, és meg kell fontolni további – meggyőző eredményt hozó – vizsgálat alkalmazását (például egy *in vitro* bőrmodell, *ex vivo* bőrmodell vagy *in vivo* vizsgálat alkalmazásával).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

- jellemző adatok és CAS szám, amennyiben ismert,
- fizikai tulajdonságok és tisztaság,
- a vizsgálat végrehajtása szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok,
- stabilitás és fotostabilitás, amennyiben ismert.

Oldószer:

- az oldószer kiválasztásának indoklása,
- a vizsgált vegyi anyag oldhatósága ezen oldószerben,
- a kezeléshez használt tápoldat (EBSS vagy PBS) százalékos oldószer tartalma.

Sejtek:

- sejtek típusa és származása,
- mikoplazma hiánya,
- sejtpasszázsok száma, amennyiben ismert,
- sejtek UVA-érzékenysége az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatban használt sugárzó berendezéssel meghatározva.

Vizsgálati körülmények (a) – inkubálás kezelés előtt és után:

- tápoldat típusa és összetétele,
- inkubációs körülmények (CO_2 – koncentráció, hőmérséklet, páratartalom),
- inkubálás időtartama (előkezelés, utókezelés).

Vizsgálati körülmények (b) – kezelés a vegyi anyaggal:

- mind az UV/látható fény jelenlétében, mind annak hiányában használt koncentrációk kiválasztásának ésszerű magyarázata,
- a vizsgált vegyi anyag korlátozott oldhatóságának és a citotoxicitás hiánya esetében a legnagyobb vizsgált koncentráció indoklása,
- kezelő oldat (pufferelt sóoldat) típusa és összetétele,
- vegyi anyag kezelésének időtartama.

Vizsgálati körülmények (c) – besugárzás:

- a használt fényforrás kiválasztásának indoklása,
- a fényforrás spektrális sugárzási jellemzői,
- a használt szűrő(k) transzmissziós/abszorpciós jellemzője (jellemzői),
- a radióméter jellemzői és kalibráció részletei,
- a fényforrás távolsága a vizsgálati rendszertől,
- UVA besugárzás értéke ennél a távolságnál, mW/cm^2 – ben kifejezve,
- UV/látható fény hatásának való expozíció időtartama,
- UVA dózis (besugárzás \times idő), J/cm^2 – ben kifejezve,
- a besugárzás során a sejt kultúrákhoz és az ezzel egyidejűleg sötétben tartott sejt kultúrákhoz alkalmazott hőmérséklet,

Vizsgálati körülmények (d) – NRU vizsgálat:

- az NR tápoldat összetétele,
- NR inkubáció időtartama,
- inkubálási feltételek (CO_2 koncentráció, hőmérséklet, páratartalom)
- NR extrakció körülményei (extrahálószer, időtartam),
- NR optikai denzitásának spektrofotometriás leolvasásához használt hullámhosszúság,
- második hullámhosszúság (referencia), amennyiben használtak ilyen,
- spektrofotométer blank térfogata, amennyiben használtak ilyen,

Eredmények:

- a vizsgált anyag minden egyes koncentrációjánál kapott sejtelétképesség, a kontrollok átlag életképességének százalékában kifejezve,
- a párhuzamos + UVA és -UVA kísérletekben kapott koncentráció-válasz görbék (vizsgált anyag koncentrációja a relatív sejtelétképesség függvényében),
- a koncentráció – válasz görbék adatainak elemzése: amennyiben lehetséges, az EC_{50} (+ UVA) és EC_{50} (-UVA) számítógéppel/egyéb módon történő kiszámítása,
- az UVA/látható fény besugárzás mellett vagy hiányában, a fotóirritáció tényező (PIF), vagy a átlagos fényhatás (MPE) kiszámításával kapott két koncentráció – válasz görbe összehasonlítása,
- fototoxikus hatás osztályozása,
- vizsgálat elfogadhatóságának követelménye (a) – párhuzamos negatív kontroll:
 - besugárzott és nem besugárzott sejtek abszolút életképessége (NR kivonat optikai sűrűsége),
 - negatív kontroll történelmi adatai, átlagérték és standard deviancia,
- vizsgálat elfogadásának követelményei (b) – párhuzamos pozitív kontroll:
 - pozitív kontroll anyag EC_{50} (+ UVA) és EC_{50} (-UVA) és PIF értékei,
 - pozitív kontroll anyag történelmi adatai: EC_{50} (+ UVA) és EC_{50} (-UVA) és PIF, átlagérték és standard deviáció.

Az eredmények értékelése.

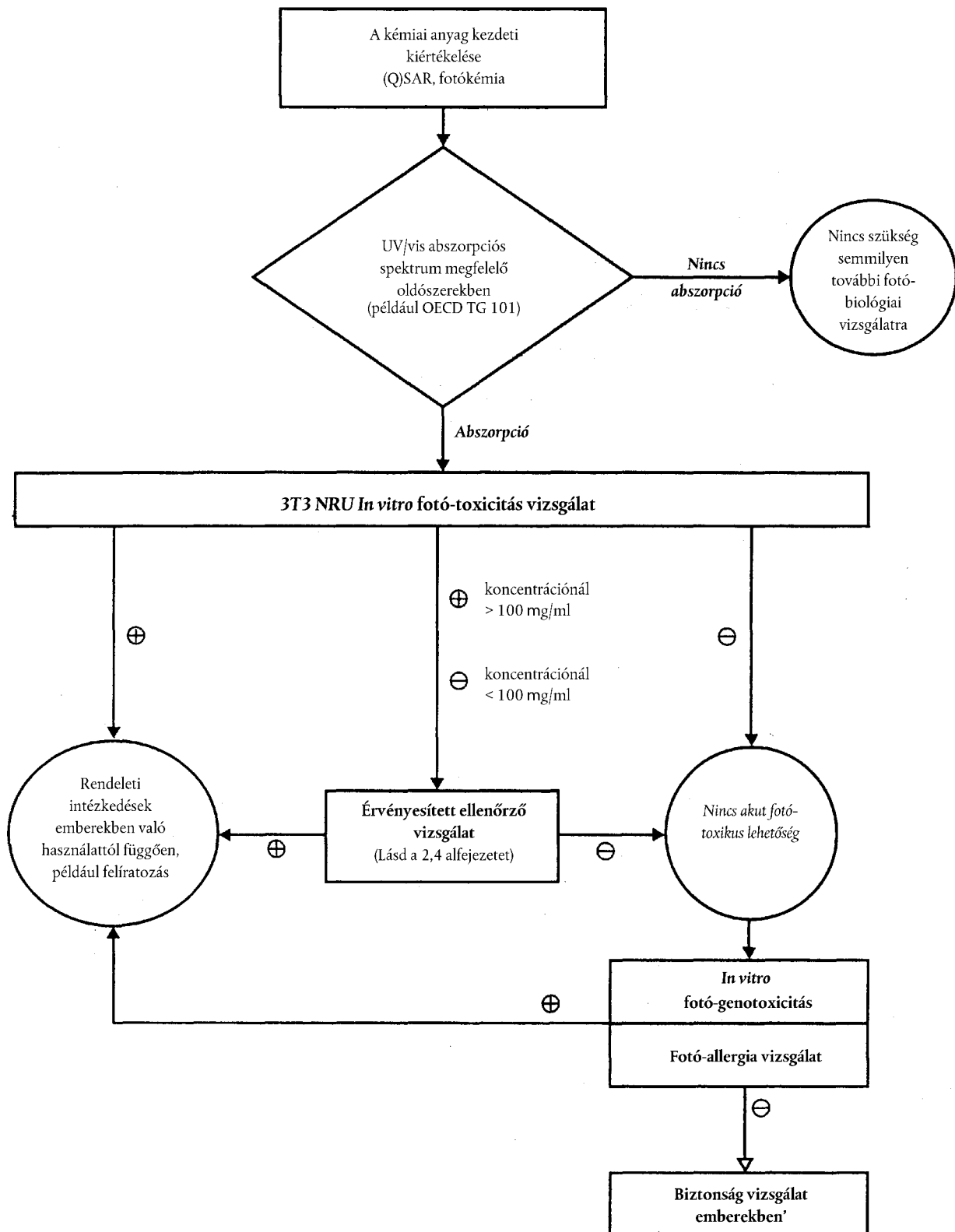
Következtetések.

4. SZAKIRODALOM

- (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, 793-796. oldal
- (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 A 26, 7- 8. oldal
- (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, 305-327. oldal
- (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, 95-102. oldal
- (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, XI-XXXV. oldal
- (7) Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Saporá, O. and Sladowski, D. (1994), *In Vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, 314-348. oldal
- (8) Spikes, J. D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2. kiadás, 79-110. oldal
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, 119-124. oldal
- (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, 5. kiadás, 515-530. oldal
- (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, 1825-1829. oldal
- (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., Papc, 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, 679-708. oldal
- (14) Holzhütter, H. G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, 127-138. oldal
- (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, 445-462. oldal

Függelék

A 3T3 NRU PT szerepe vegyi anyagok fototoxikus hatás vizsgálatához alkalmazott szekvenciális megközelítésben



(1) További részletek a 12. szakirodalomban találhatóak.