

32000L0033

2000 6 8

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 136/90

KOMISIJOS DIREKTYVA 2000/33/EB

2000 m. balandžio 25 d.

dvidešimt septintą kartą derinanti su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklšinimą etiketėmis, suderinimo (*)

(tekstas svarbus EEE)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

1 straipsnis

atsižvelgdama į 1967 m. birželio 27 d. Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklšinimą etiketėmis, suderinimo ⁽¹⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 1999/33/EB ⁽²⁾, ypač į jos 28 straipsnį,

Šios direktyvos I ir II priedų tekstai pridunami prie Direktyvos 67/458/EEB V priedo B dalies.

2 straipsnis

kadangi:

1. Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 2001 m. spalio 1 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

(1) Direktyvos 67/458/EEB V priede nustatyti medžiagų ir preparatų fizikinių cheminių savybių, toksiškumo ir ekotoksiškumo nustatymo metodai. Šį priedą būtina suderinti su technikos pažanga.

Valstybės narės, priimdamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

(2) Pagal 1986 m. lapkričio 24 d. Tarybos direktyvos 86/609/EEB dėl valstybių narių įstatymų ir kitų teisės aktų, susijusių su eksperimentiniais ar kitais mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsauga, suderinimo ⁽³⁾ 7 straipsnio 2 dalį eksperimentas, kuriam naudojami gyvūnai, neatliekamas, jei siekiamo rezultato galima pagrįstai ir praktiškai pasiekti kitu moksliniam tinkamu metodu, kuriam nereikia gyvūnų.

2. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtų nacionalinės teisės aktų pagrindinių nuostatų tekstus bei šios direktyvos ir priimtų nacionalinių nuostatų koreliacijos lentelę.

3 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja trečią dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

(3) Į Direktyvos 67/548/EEB V priedą Komisija ketina įtraukti kai kuriuos alternatyvius tyrimo metodus tam, kad būtų galima iširti chemines medžiagas nenaudojant gyvūnų, kaip numatyta Direktyvos 67/548/EEB 3 straipsnio 1 dalyje.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

(4) Šioje direktyvoje numatytos priemonės atitinka Direktyvų dėl techninių kliūčių panaikinimo pavojingų medžiagų ir preparatų prekybos srityje derinimo su technikos pažanga komiteto nuomonę,

Priimta Briuselyje, 2000 m. balandžio 25 d.

Komisijos vardu

Margot WALLSTRÖM

Komisijos narė

(*) Priimta iki 26 derinimo.

⁽¹⁾ OL 196, 1967 8 16, p. 1.⁽²⁾ OL L 199, 1999 7 30, p. 57.⁽³⁾ OL L 358, 1986 12 18, p. 1.

I PRIEDAS

„B.40. ODOS SUARDYMAS

1. METODAS

1.1. Įvadas

Europos alternatyvių tyrimo metodų patvirtinimo centras (ECVAM, Jungtinis tyrimų centras, Europos Komisija) patvirtino, kad du *in vitro* tyrimo metodai odos suirimui įvertinti — žiurkės odos transepitelinės elektrinės varžos (TEV) nustatymas ir modelinė žmogaus odos sistema yra moksliskai patikimi (1) (2) (3). Europos alternatyvių tyrimo metodų centro atliktas patikrinimas parodė, kad abiem metodais galima patikimai atskirti suardančias odą medžiagas nuo odos nesuardančių medžiagų. Be to, tyrimo aprašas, paremtas modeline žmogaus odos sistema leido teisingai nustatyti odos suardymo laipsnį (R35, arba medžiagos, visiškai suardančios odą ir R34, arba kitos odą suardančios medžiagos) (2). Pateikiami abiejų metodų aprašymai bei procedūros, šių metodų pasirinkimas priklauso nuo specifinių vartotojo poreikių ar turimų privilegijų/pageidavimų.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Sąvokos

Odos suardymas — negrįžtamas odos audinių suardymas tiriamomis cheminėmis medžiagomis.

1.3. Etaloninės medžiagos

Išsamiai neapibūdintos, bet žr. 1.5.3.4 ir 1.7.2.3.

1.4. Tyrimo metodo principas — žiurkės odos transepitelinės elektrinės varžos nustatymas

Tiriamosios medžiagos apie 24 valandas yra inkubuojamos su odos diskų, paimtų iš neskausmingai užmuštų jaunų žiurkių odos, epidermio paviršiais. Odą suardančios medžiagos nustatomos pagal jų sugebėjimą sutrikdyti raginio sluoksnio (*stratum corneum*) vientisumą bei jo atliekamą skiriamąją (barjerinę) funkciją, kurie matuojami kaip žemiau slenksstinio lygio odos transepitelinės elektrinės varžos sumažėjimas (5 kΩ) (4) (5). Odą sujaudrinančios ir nesujaudrinančios medžiagos paprastai nesumažina transepitelinės elektrinės varžos žemiau slenksstinio lygmens. Tiriant paviršiaus įtempimą didinančius cheminius junginius bei organines medžiagas, kurių pH yra neutralus, tyrime dar galima analizuoti šių medžiagų susijungimą su dažais (apibrėžimą žr. 6 nuorofoje), kad būtų gauta mažiau neteisingų teigiamų duomenų, kurie paprastai gaunami, tiriant šių cheminių tipų medžiagas (2) (7).

1.5. Tyrimo metodo — žiurkės odos transepitelinės elektrinės varžos nustatymo — aprašymas

1.5.1. Gyvūnai

Odos diskai paimami iš jaunų (20–23 dienų amžiaus) *Wistar* ar panašaus inbredinio kamieno žiurkių. Dorsaliniai ir šoniniai plaukai pašalinami žirkutėmis, skirtomis gyvūnams apkirpti. Po to gyvūnai plaujami, gerai juos ištrinant, ir panardinant į antibiotikų (pvz., streptomicino, penicilino, chloramfenikolo ar amfotericino, kurių koncentracijos pakanka bakterijų dauginimuisi sustabdyti) prisotintą tirpalą. Trečią ar ketvirtą dieną po pirmojo plovimo gyvūnai dar kartą plaujami antibiotikų tirpalu ir ne vėliau kaip per 3 dienas yra panaudojami (ruošiant odos preparatus, gyvūnai turi būti ne vyresni kaip 31 dienos amžiaus).

1.5.2. Odos diskų paruošimas

Gyvūnai neskausmingai užmušami. Tada kiekvieno gyvūno oda atskiriama bei nuo jos atsargiai nuskutami pertekliniai riebalai. Oda uždėdama ant mėgintuvėlio su politetrafluoretilenu (PTFE) galo taip, kad odos epidermis liestųsi su mėgintuvėlio paviršiumi. Ant mėgintuvėlio galo tvirtai užmaunamas „O“ pavidalo guminis žiedas, kad prilaikytų odą, o nereikalingas likutis nukerpamas. Mėgintuvėlio ir „O“ pavidalo guminio žiedo matmenys pateikti 1 paveiksle. Paskui „O“ pavidalo guminis žiedas žibaline alyva rūpestingai pritvirtinamas prie mėgintuvėlio su PTFE galo. Spyruokliniu gnybtu mėgintuvėlis įtvirtinamas receptorinėje kameroje, pripildytoje (154 mM) magnio sulfato tirpalo (2 paveikslas).

1.5.3. Tyrimo procedūra

1.5.3.1. Tiriamosios medžiagos panaudojimas

Skystos tiriamosios medžiagos (150 μl) mėgintuvėlyje užpilamos ant epidermio paviršiaus (2 paveikslas). Tiriant kietąsias medžiagas, pakankamas kietosios medžiagos kiekis užpilamas ant disko, kad visas epidermio paviršius būtų padengtas kietąja medžiaga. Paskui ant kietosios medžiagos užpilama 150 μl dejonizuoto vandens, ir mėgintuvėliai atsargiai pakratomi. Tiriamosios medžiagos ir odos sąlytis turi būti kaip galima didesnis. Naudojant kai kurias kietąsias medžiagas tai pasiekama pašildžius mėgintuvėlį iki 30 °C, kad jame esanti medžiaga ištirptų, arba ji sugrūdama, kad virstų granulėmis ar milteliais.

Kiekvienai tiriamajai medžiagai naudojami trys odos diskai. Tiriamosios medžiagos inkubuojamos 24 valandas (taip pat žr. 1.5.3.4). Tiriamoji medžiaga pašalinama 30 °C temperatūros vandentiekio vandens srove tol, kol jokia kita medžiaga nebensiplauna. Sukietėjusios tiriamosios medžiagos iš mėgintuvėlio pašalinamos maždaug 30 °C temperatūros vandens srove.

1.5.3.2. Transepitelinės elektrinės varžos matavimai

Transepitelinė elektrinė varža matuojama mažos įtampos kintamosios srovės analizatoriumi (pvz. AIM 401 arba 6401 arba juos atitinkančiais prietaisais). Prieš matuojant elektrinę varžą, sumažinamas odos paviršiaus įtempimas, pridėdamas pakankamai 70 % etilo alkoholio, kad visas epitelio paviršius būtų padengtas. Po kelių sekundžių etilo alkoholis pašalinamas apvertus mėgintuvėlį, o paskui audinys sudrėkinamas, pripylus (154 mM) magnio sulfato tirpalo. Norint išmatuoti odos disko varžą kΩ/odos diskui, iš abiejų odos disko pusių uždedami analizatoriaus elektrodai (2 paveikslas). Elektrodo matmenys ir jo ilgis žemiau „krokodilo“ tipo gnybtų yra parodytas 1 paveiksle. Matuojant varžą, vidinis (storasis) elektrodo gnybtas uždedamas ant politetrafluoretileno pripildyto mėgintuvėlio viršaus, kad pakankama elektrodo atkarpa būtų panardinta į magnio sulfato tirpalą. Išorinis (plonasis) elektrodas įdedamas į receptorinę kamerą taip, kad atsidurtų kameros dugne. Atstumas tarp spyruoklinio gnybto apačios ir mėgintuvėlio, pripildyto politetrafluoretilenu (PTFE) (1 paveikslas), visą laiką turi būti vienodas, nes nuo jo priklauso matuojamos varžos dydis.

Atkreipkite dėmesį į tai, kad jei matuojama varža yra didesnė nei 20 kΩ, tai gali būti, kad tiriamoji medžiaga dengia odos disko epiderminį paviršių. Šią medžiagą galima pabandyti pašalinti, pavyzdžiui, pirštine apmautos rankos nykščiu užspausti PTFE mėgintuvėlį ir apie 10 sekundžių jį pakratyti; magnio sulfato tirpalas išpilamas, ir varža vėl matuojama. Matavimas pakartojamas su šviežiai paruoštu magnio sulfato tirpalu.

Atliekant transepitelinės elektrinės varžos matavimus, gautų rezultatų vidurkiai laikomi priimtinais, jei vienalaikės teigiamos ir neigiamos kontrolinės vertės neperžengia leistinų metodo dydžių. Toliau pateikiamos siūlomos kontrolinės medžiagos ir priimtini jų varžos svyravimo intervalai, kai taikoma aprašytą metodiką ir naudojami aprašytieji prietaisai:

Kontrolė	Medžiaga	Leistinas varžos intervalas kΩ
Teigiama	10 M HCl (36 %)	0,5 - 1,0
Neigiama	Distiliuotas vanduo	10 - 25

1.5.3.3. Modifikuota paviršiaus įtempimą didinančių medžiagų ir neutralaus pH organinių junginių tyrimo metodika

Jei tiriamųjų medžiagų paviršiaus įtempimą didinančių medžiagų ar neutralaus pH organinių junginių, transepitelinė elektrinė varža yra 5 kΩ arba mažesnė, tokiu atveju galima tirti dažų skvarbą į audinius. Ši procedūra leidžia nustatyti, ar gauti rezultatai yra teigiami, bet neteisingi (2).

1.5.3.3.1. Sulforodamino B dažo panaudojimas ir pašalinimas

Po pirminio apdorojimo tiriamąja medžiaga ant kiekvieno odos disko epidermio paviršiaus užpilama 150 µl 10 % sulforodamino B dažo, ištirpinto distiliuotame vandenyje ir palaikoma 2 valandas. Paskui odos diskai apie 10 sekundžių plaunami kambario temperatūros vandentiekio vandeniu, kad bet koks dažo perteklius ar neprisijungęs dažas būtų pašalintas. Kiekvienas odos diskas atsargiai išimamas iš PTFE mėgintuvėlio su politetrafluoretilenu ir įdedamas į indą (pvz., į 20 ml scintiliacinį indą) su 8 ml dejonizuoto vandens. Indai 5 minutes atsargiai kratomi, kad bet koks dažo perteklius ar neprisijungęs dažas būtų pašalintas. Ši plovimo procedūra pakartojama, o paskui odos diskai perkeliama į indus su 5 ml 30 % vandeninio (w/v) natrio dodecilsulfato (SDS) tirpalo ir per naktį inkubuojami 60 °C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijai, kiekvienas odos diskas išimamas ir išmetamas, o likęs tirpalas 8 minutes centrifuguojamas 21 °C temperatūroje (santykinė centrifuginė jėga @175). 1 ml supernatanto praskiedžiamas santykiu 1: 5 (v/v) (t. y. 1 ml + 4 ml) 30 % vandeniniu natrio dodecilsulfato tirpalu. Tirpalo optinis tankis (OT) išmatuojamas, bangos ilgiui esant apie 565 nm.

1.5.3.3.2. Dažo kiekio apskaičiavimas

Sulforodamino B dažo kiekis viename odos diske apskaičiuojamas pagal optinio tankio (OT) vertes (sulforodamino B dažo moliarinės ekstinkcijos koeficientas, bangos ilgiui esant 565 nm = $8,7 \times 10^4$, o molekulinė masei - 580). Kiekviename odos diske nustatomas sulforodamino B dažo kiekis, paskui pakartotinai apskaičiuojamas dažo kiekio vidurkis. Susijungimo su dažu duomenų vidurkiai laikomi priimtinais, jei vienalaikės kontrolinės vertės neperžengia leistinų metodo ribų. Siūlomi tokie priimtini dažo kiekio kontrolinėse medžiagose svyravimo intervalai taikant aprašytą metodiką ir naudojant aprašytus prietaisus:

Kontrolė	Medžiaga	Dažo kiekio intervalas µg/diske
Teigiama	10 M HCl (36 %)	40 - 100
Neigiama	Distiliuotas vanduo	15 - 35

1.5.3.4. Papildoma informacija

Tiriamosios medžiagos gali būti panaudojamos odos diskams ir trumpiau (pvz., 2 valandas), jei norima nustatyti labai odą suardančias medžiagas, tačiau, atliekant patikrinamąjį tyrimą, buvo gauti duomenys, rodantys, kad transepitelinės elektrinės varžos nustatymo metodu tiriant keletą cheminių medžiagų, panaudotų odos diskams 2 valandas (2), šių junginių sugebėjimas suardyti odą buvo pervertintas, nors šis metodas leido teisingai nustatyti odą suardančias ir nesuardančias medžiagas po 24 valandas trukusio bandymo.

Panaudoto prietaiso savybės ir matmenys bei taikyta eksperimento procedūra gali turėti įtakos duomenims, kurie gaunami, matuojant transepitelinę elektrinę varžą. Medžiagų, suardančių odos audinį, elektrinės varžos aukščiausia riba, lygi 5 kΩ buvo parinkta, panaudojus specialų prietaisą ir pritaikius šio metodo aprašyme nurodytą procedūrą. Iš esmės pakitus tyrimo sąlygoms, gali tiktai skirtingos ribinės ir kontrolinės vertės. Todėl tiriant keletą etaloninių standartų, pasirinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų, atliekant patikrinamąjį tyrimą, rekomenduojama suderinti metodologiją ir ribinę vertę.

1.6. Tyrimo metodo — žmogaus odos modelio — principas

Tiriamoji medžiaga iki 4 valandų laikoma ant trimačio žmogaus odos modelio, kurį sudaro rekonstruotas epidermis, turintis funkcinį raginį sluoksnį (*stratum corneum*). Medžiagos, suardančios odą, identifikuojamos pagal jų sugebėjimą per nustatytą inkubavimo laiką sumažinti ląstelių gyvybingumą (pvz., taikant MTT metodą) žemiau nurodytų ribinių lygių. Šis metodas patvirtina hipotezę, kad odą suardančios cheminės medžiagos yra būtent tos, kurios sugeba prasiskverbti pro raginį sluoksnį (difuzijos ar erozijos būdu), yra pakankamai citotoksiškos ir sunaikina apatinių sluoksnių ląsteles.

1.7. Tyrimo metodo — žmogaus odos modelio — aprašymas

1.7.1. Žmogaus odos modeliai

Žmogaus odos modelius galima gauti iš įvairių šaltinių, tačiau jie privalo atitikti tam tikrus kriterijus. Modelis turi turėti funkcinį raginį sluoksnį, po kuriuo turi būti gyvų ląstelių sluoksnis. Turi būti reikiama barjerinė raginio sluoksnio funkcija. Tai galima parodyti, demonstruojant modelio atsparumą citotoksiškumui, panaudojus ląsteles sunaikinančias medžiagas, kurios normaliomis sąlygomis neprasiskverbia pro raginį sluoksnį. Esant nustatytoms eksperimento sąlygoms, modelis turi rodyti, kad rezultatus galima pakartoti.

Modelyje esančios gyvosios ląstelės turi būti pakankamai gyvybingos, kad būtų galima atskirti teigiamas kontrolines medžiagas nuo neigiamų. Ląstelių gyvybingumas (pvz., įvertinamas pagal MTT kiekio sumažėjimą, matuojant optinį tankį) po inkubacijos su neigiama kontroline medžiaga turi atitikti priimtinas konkrečiam modeliui ribas. Panašiai, po inkubacijos su teigiamomis kontrolinėmis medžiagomis, palyginus jas su neigiamomis kontrolinėmis medžiagomis, ląstelių gyvybingumo laipsnis turi neperžengti nustatyto lygio. Svarbiausia įrodyti, kad panaudotas spėjimų modelis atitinka tarptautinį patvirtinimo standartą (2).

1.7.2. Tyrimo procedūra

1.7.2.1. Tiriamosios medžiagos panaudojimas

Jei tiriamosios medžiagos yra skystos, jos naudojamos taip, kad padengtų odos paviršių (mažiausiai - 25 µl/cm²). Jei tiriamosios medžiagos yra kietos, jos naudojamos taip, kad padengtų odą, paskui jos sudrėkinamos, kad kuo glaudžiau liestųsi su oda; jei reikia, prieš naudojimą kietosios medžiagos turėtų būti sutrinamos į miltelius. Reikia įrodyti, kad taikomas metodas tinka daugeliui įvairiausiems cheminiams tipams priklausančių medžiagų (2). Pasibaigus medžiagos veikimo laikui, tiriamoji medžiaga turi būti druskos tirpalu kruopščiai nuplauta nuo odos.

1.7.2.2. Ląstelių gyvybingumo matavimai

Ląstelių gyvybingumui įvertinti gali būti taikomas bet kuris patvirtintas kiekybinis metodas. Dažniausiai taikomas MTT redukcijos metodas, kuriuo įvairios laboratorijos gavo tikslius ir atkartojamus rezultatus (2). Odos diskas 3 valandoms pamerkiamas į 20-28°C temperatūros MTT tirpalą (0,3 mg/ml). Ekstrahuojamas (ekstrakcija tirpikliais) nusėdęs netirpus mėlynos spalvos formazanas ir nustatoma jo koncentracija, matuojant jo optinį tankį, kai bangos ilgis siekia 545-595 nm.

1.7.2.3. Papildoma informacija

Panaudotas odos modelis, tikslus medžiagos veikimo laikas, plovimo procedūrų protokolai ir kita turės didžiausią įtaką ląstelių gyvybingumo rezultatams. Rekomenduojama, kad metodologija ir spėjimo modelis būtų kalibruojami, išstiriant keletą etaloninių standartų, atrinktų iš cheminių medžiagų, panaudotų ECVAM tyrimui (3). Labai svarbu, kad pagal tarptautinius standartus šį metodą galima taikyti ir daugelyje laboratorijų, panaudojant daug įvairių cheminių medžiagų. Šis metodas bent jau turėtų atitikti aukščiau aprašytus mokslinio patvirtinimo kriterijus (2), o tokio patvirtinimo tyrimo duomenys privalo būti paskelbti, prieš tai juos recenzavus specialistams, moksliniame žurnale.

2. DUOMENYS

2.1. Rezultatų apdorojimas

2.1.1. Žiurkės odos transepitelinės elektrinės varžos (TEV) nustatymo — metodas

Tiriamosios medžiagos varžos dydžiai (k Ω), teigiamos bei neigiamos kontrolės ir bet kokios standartinės etaloninės cheminės medžiagos turėtų būti pateiktos lentelėse, kur būtų ir kartojamų mėginių/pakartotinių eksperimentų duomenys, vidurkiai bei nustatyta klasifikacija.

2.1.2. Žmogaus odos modelio tyrimas

Optinio tankio ir tiriamąja medžiaga bei teigiamomis ir neigiamomis kontrolėmis paveiktų ląstelių procentais išreikšto apskaičiuoto gyvybingumo duomenys ir bet kokios etaloninės nurodytos cheminės medžiagos turėtų būti pateiktos lentelėse, kur būtų ir kartojamų mėginių/pakartotinių eksperimentų duomenys, vidurkiai bei nustatyta klasifikacija.

2.2. Įvertinimas ir rezultatų aiškinimas

2.2.1. Žiurkės odos transepitelinės elektrinės varžos nustatymo — metodas

Jei tiriamosios medžiagos transepitelinės elektrinės varžos vidurkis yra didesnis nei 5k Ω , tai ji laikoma odos audinio nesuardančia medžiaga. Jei transepitelinės elektrinės varžos vidurkis yra mažesnis nei 5k Ω arba 5k Ω , o tiriamoji medžiaga priklauso paviršiaus įtempimą didinančioms ar neutraliu pH pasižyminčioms organinėms medžiagoms, ji laikoma odos audinį suardančia medžiaga.

Su paviršiaus įtempimą didinančiomis ir neutraliu pH pasižyminčiomis organinėms medžiagoms, kurių transepitelinė elektrinė varža yra mažesnė nei 5k Ω arba 5k Ω , galima atlikti dažo įsiskverbimo tyrimą. Jeigu dažo, įsiskverbusio į odos diską, vidutinis kiekis yra didesnis nei tuo pat metu gautas vidutinis dažo, įsiskverbusio į odos diską, paveiktą 36 % HCl teigiama kontrole, kiekis arba lygus jam, tai tiriamoji medžiaga yra tikrai teigiama ir todėl priklauso odos audinį suardančioms medžiagoms. Jei dažo, įsiskverbusio į odos diską, vidutinis kiekis yra mažesnis nei tuo pat metu gauto dažo, įsiskverbusio į odos diską, paveikto 36 % HCl teigiama kontrole, kiekis, tai tiriamoji medžiaga nėra laikoma teigiama ir priklauso medžiagoms, nesuardančioms odos.

2.2.2. Žmogaus odos modelio tyrimas

Neigiamos kontrolės optinio tankio reikšmė atspindi šimtaprocentinį ląstelių gyvybingumą, taigi kiekvieno tiriamojo mėginio optinio tankio reikšmės gali būti panaudotos apskaičiuoti gyvybingumo, palyginus su neigiama kontrole, procentais išreikštą reikšmę. Galutinė ląstelių gyvybingumo vertė išreikšta procentais, skirianti odą suardančias medžiagas nuo nesuardančių medžiagų (arba atskirianti vieną nuo kitos skirtingoms klasėms priklausančias odą suardančias medžiagas), turi būti aiškiai apibūdinta spėjimo modelyje prieš patvirtinant metodą, o tolesnis patvirtinimo tyrimas turi įrodyti, kad ši galutinė riba yra tinkama (2).

3. ATASKAITA

Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Tiriamoji medžiaga:

— nustatymo data, fizinė prigimtis ir, jei būtina, jos fizinės ir cheminės savybės. Panaši informacija pateikiama, jei naudojamos etaloninės medžiagos.

Tyrimo sąlygos:

— taikytos procedūros aprašymas,
— kiekvienos modifikacijos aprašymas ir pagrindimas.

Rezultatai:

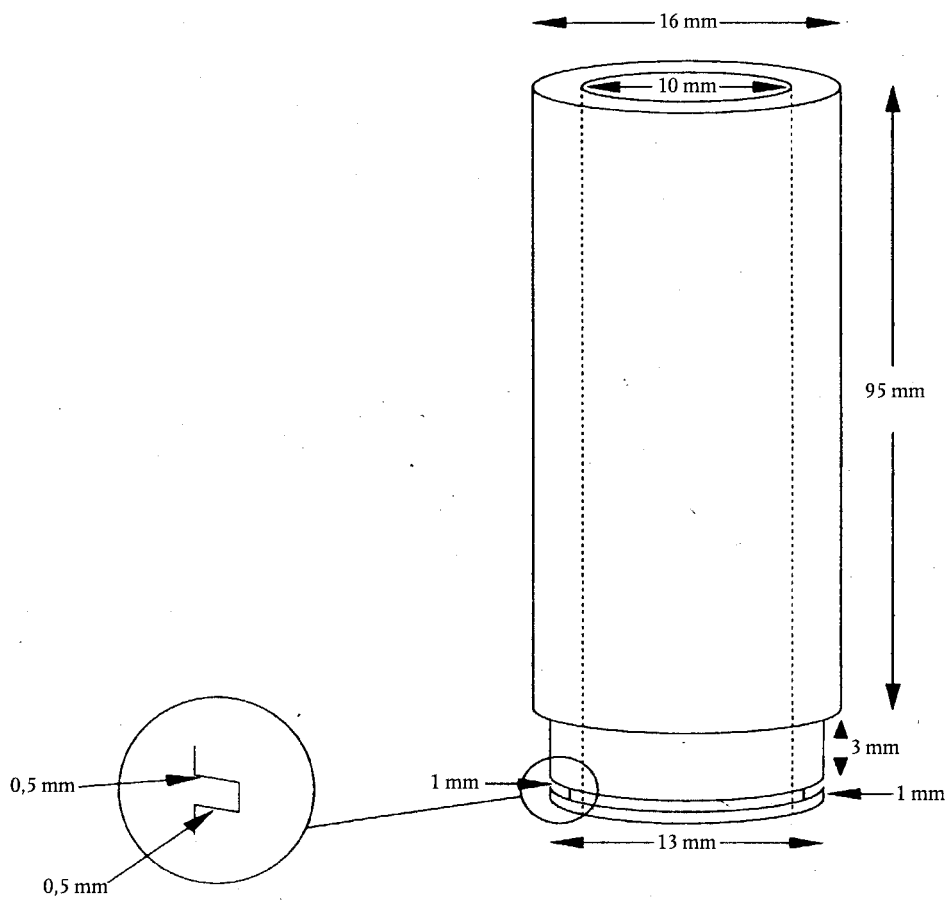
- lentelėse pateikiami tiriamosios medžiagos, teigiamų bei neigiamų kontrolinių medžiagų ir visų nurodytų standartinių etaloninių medžiagų varžos dydžiai (transepitelinės elektrinės varžos nustatymo metodas) ar ląstelių gyvybingumo, išreikšto procentais, dydžiai (žmogaus odos modelio tyrimas), kartu pateikiant pakartotinių mėginių/kartotinių eksperimentų duomenis bei vidurkius,
- bet koks kito pastebėto poveikio aprašymas.

Rezultatų aptarimas.**Išvados.****4. NUORODOS**

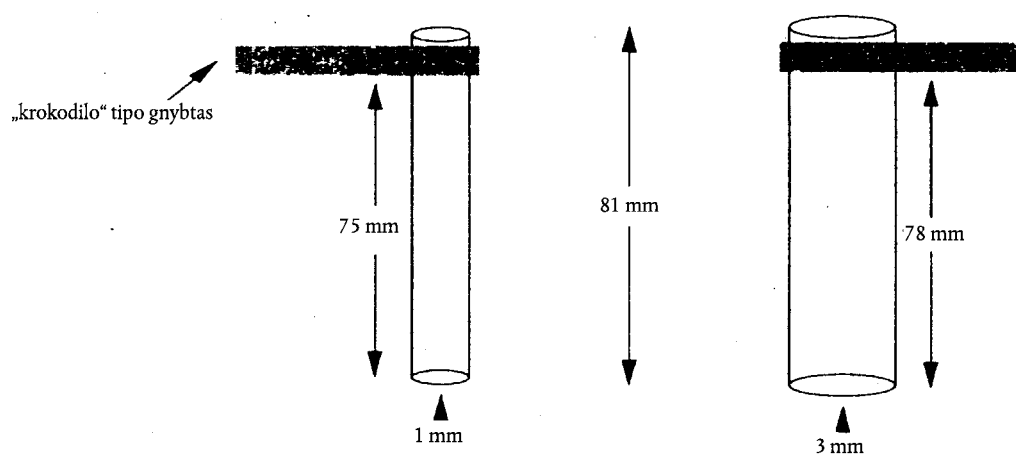
- 1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views. *ATLA* 26, p. 275-280.
- 2) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holz-hutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, p. 483-524.
- 3) Barrat, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, L., Walker, A. P. & Worth, A. P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribu-tion of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 121, p. 471-482.
- 4) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test – modifica-tions and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, p. 507-512.
- 5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheesman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxico-logy in Vitro* 6, p. 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, p. 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., Ponc, M., Regnier, J. F., Stei-ling, 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, p. 219-255.

1 paveikslas

Politetrafluoretileno pripildyto mėgintuvėlio matmenys

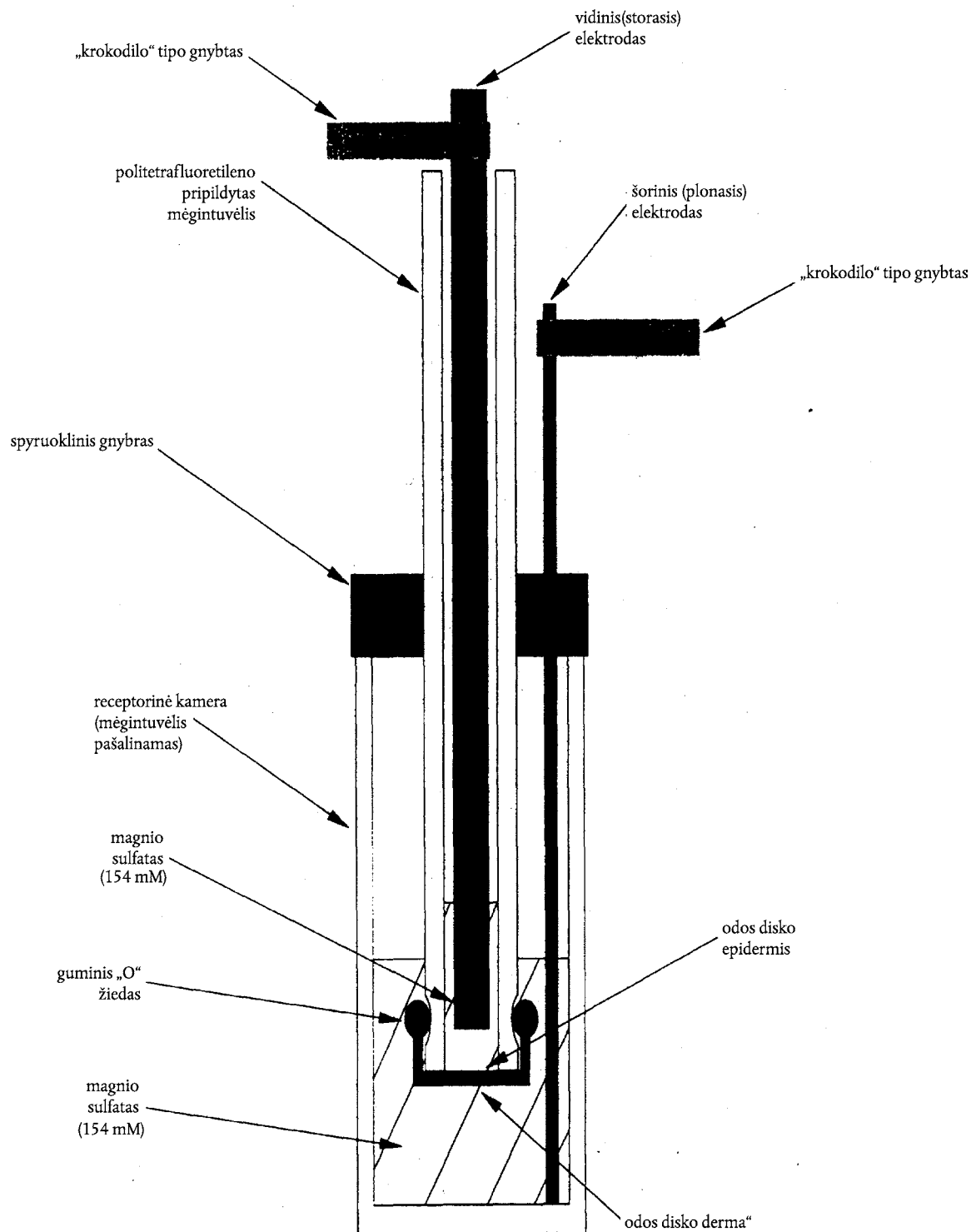


Elektrodo matmenys



2 paveikslas

Prietaisai žiurkės odos transepitelinei varžai matuoti



II PRIEDAS

„B.41. FOTOTOKSIŠKUMAS - 3T3 NRU FOTOTOKSIŠKUMO TYRIMAS *IN VITRO*“

1. METODAS

1.1. Įvadas

Fototoksiškumas apibūdinamas kaip toksišinė reakcija, kuri atsiranda, kai pirmą kartą oda paveikiama tam tikromis cheminėmis medžiagomis, o po to — šviesa, arba kuri sukeliama panašiai — kai sistemingai veikiama chemine medžiaga, oda yra apšvitinama.

3T3 NRU fototoksiškumo tyrimo *in vitro* rezultatai leidžia nustatyti tiriamos medžiagos fototoksišią aktyvumą, t. y. ar kokios nors tiriamos medžiagos ultravioletiniais ir matomos šviesos spinduliais gali kelti pavojų.

Kadangi toksikologinio tyrimo *in vitro* tikslas — ištirti fototoksiškumą, odą paveikus cheminėmis medžiagomis ir šviesa, todėl šio tyrimo metu galima identifikuoti fototoksiškus junginius *in vivo* po to, kai jais sistemingai buvo veikiama oda ir kai jie joje pasiskirsto, taip pat fotodirginančias medžiagas, kurių veikimas pasireiškia joms paveikus konkrečią odos vietą.

1992-1997 m. vykdant bendrą Europos Sąjungos ir COLIPA projektą, buvo sukurtas ir patvirtintas 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimas (1) (2) (3), kad būtų rasta patikima alternatyva metodams, taikomiems *in vivo*. 1996 m. vykusiame OECD seminare buvo pasiūlytas nuoseklus fototoksiškumo tyrimas *in vitro* (4).

3T3 NRU fototoksiškumo tyrimo *in vitro* duomenys buvo lyginami su ūmiojo fototoksiškumo/fotodirginimo poveikiu žmonėms bei gyvūnams ir buvo pastebėta, kad šis tyrimas leidžia puikiai numatyti tokį poveikį. Šiuo tyrimu nesiekama numatyti kitokio pobūdžio žalingo poveikio, kuris gali atsirasti, kai odą vienu metu veikia cheminės medžiagos bei šviesa, pvz., fotogenotoksiškumo, fotodirginimo ar fotokarcinogenotoksiškumo, nors atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą daugelis šiomis savybėmis pasižyminčių cheminių medžiagų reagavo teigiamai. Be to, šis tyrimas nėra skirtas šviesos fototoksiškumui įvertinti.

Šiame priede pateikiamas nuoseklus cheminių medžiagų fototoksiškumo tyrimas.

1.2. Sąvokos

Spinduliuotė: ultravioletinės (UV) ar matomos šviesos, krentančios ant paviršiaus, intensyvumas, išreiškiamas W/m^2 arba mW/cm^2 .

Šviesos dozė: ultravioletinės (UV) ar matomos šviesos, krentančios ant paviršiaus, kiekis išreiškiamas džauliais ($= W \times s$) paviršiaus plotui, pvz., J/m^2 , J/cm^2 .

Ultravioletinės šviesos bangų juostos: CIE (Tarptautinės radiacijos komisijos) rekomenduojami žymėjimai: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-280 nm). Vartojami ir kiti žymėjimai: skiriamoji riba tarp UVA ir UVB paprastai yra ties 320 nm padala, ir todėl UVA galima padalyti į UV-A1 ir UV-A2, skiriamąją ribą nustačius ties 340 nm padala.

Ląstelių gyvybingumas: parametras, rodantis absoliutų ląstelių populiacijos aktyvumą (pvz., vitalinio neutralaus raudonojo dažo susigėrimą į ląstelių lizosomas), kuris priklauso nuo galutinio išmatuoto dydžio bei tyrimo programos, yra susijęs su bendru ląstelių skaičiumi ir (ar) jų gyvybingumu.

Santykinis ląstelių gyvybingumas: ląstelių gyvybingumas, išreikštas palyginus su neigiamais kontroliniais mėginiais (tirpikliais), su kuriais atliekama visa tyrimo procedūra (arba + UV, arba — UV) ir kurie nebuvo paveikti tiriamąja chemine medžiaga.

Spėjimų modelis: algoritmas, naudojamas numatant toksiškumo galią, remiantis toksiškumo tyrimo rezultatais. Pasirinkus šį kelią, kai bandoma nustatyti fototoksišią aktyvumą, kai atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą *in vitro*, gauti rezultatai būtų panaudoti, numatant fototoksiškumo galią, galima naudoti FSV (fotodirginimo veiksniumi) ir VFE (vidutiniu fotoefektu).

Fotodirginimo veiksnys (FDV): veiksnys, gaunamas lyginant tarpusavyje dvi vienodai veiksmingas tiriamas cheminės medžiagos citotoksines koncentracijas (EB_{50}), gautas apšvitinus necitotoksine ultravioletinė/matomos šviesos spinduliuote.

Vidutinis fotoefektas (VFE): naujas parametras, gautas matematiškai išanalizavus visą dviejų skirtingų koncentracijų kreivių pavidalą, gautą apšvitinus necitotoksine ultravioletine/matoma šviesa.

Fototoksiškumas: ūmiai pasireiškiantis toksinis atsakas, kai oda iš pradžių veikiama tam tikromis cheminėmis medžiagomis, o vėliau — šviesa, arba kuris pasireiškia panašiai, kai į odą sistemiskai injekuojama cheminė medžiaga.

Fotodirginimas: fototoksiškumo atmaina, naudojama apibūdinant tik tokias fototoksines reakcijas, kurios vyksta odoje, kai cheminės medžiagos ją veikia vietiniu ar oraliu būdu. Vykstant šioms fototoksiniams reakcijoms, ląstelės suardomos nespecifiniu būdu (ši reakcija panaši į tą, kurią sukelia nudegimas nuo saulės).

Fotoalergija: įgytas imunologinis reaktyvumas, kurio nebūna odą veikiant chemine medžiaga pirmą kartą; ji sukelia tik 1-2 savaites trunkanti indukcija.

Fotogenotoksiškumas: genotoksinis atsakas, pažeidžiantis ląstelės genomą ir atsiranda tada, kai ląstelės apšvitinamos ultravioletinės/matomos šviesos bangų negenotoksine doze ir negenotoksiniu chemine medžiaga.

Fotokarcinogeniškumas: karcinogeniškumas, sukeliamas pakartotinai paveikus chemine medžiaga ir šviesa. Terminas „fotokarcinogeneze“ paprastai vartojamas tada, kai cheminė medžiaga suaktyvina vėžio, sukkelto ultravioletine spinduliuote, vystymąsi.

1.3. Etaloninės medžiagos

Atliekant tyrimą, kai norima iš naujo nustatyti 3T3 NRU fototoksiškumą, be teigiamos kontrolinės medžiagos — chlorpromazino, kuri turėtų būti kartu tiriama per kiekvieną naują bandymą, rekomenduojama kaip etalonus naudoti ir keletą cheminių medžiagų, kurios buvo naudojamos atliekant šį tyrimą keliose skirtingose laboratorijose (3) (1) (13).

1.4. Pirminis aptarimas

Nustatyta, kad daugelio tipų cheminės medžiagos sukelia fototoksinį poveikį (5) (6) (7) (8). Vienintelė bendra šių medžiagų ypatybė — gebėjimas absorbuoti saulės šviesos bangų spektre esančią šviesos energiją. Pagal pirmąjį fotochemijos dėsnį (Grotthauso-Draperio dėsnis) tam, kad vyktų fotocheminė reakcija, yra reikalingas pakankamas absorbuotų šviesos kvantų kiekis. Taigi, vadovaujantis šia tyrimo metodika (pagal OECD fototoksiškumo tyrimo rekomendaciją Nr. 101), prieš atliekant biologinį tyrimą siūloma nustatyti tiriamosios medžiagos absorbuojamos ultravioletinės/matomos šviesos spinduliuotės bangų spektrą. Jeigu moliarinės ekstinkcijos/absorbicijos koeficientas yra mažesnis nei $10 \text{ litrų} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, tai tiriamoji medžiaga nepasizymi fototoksiniu aktyvumu ir jos nereikia naudoti atliekant *in vitro* 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą ar kurį nors kitą biologinį tyrimą norint nustatyti žalingą fotocheminį poveikį (priedėlis).

1.5. Tyrimo metodo principas

Buvo nustatyti keturi mechanizmai, kaip chromoforas (cheminė medžiaga), absorbuodamas šviesą, sukelia fototoksinį atsaką (7). Jie visi sukelia ląstelių pažeidimus. Taigi 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimas *in vitro* yra grindžiamas cheminės medžiagos citotoksiškumo, kai medžiaga apšvitinama arba neapšvitinama necitotoksine ultravioletinės/matomos šviesos spinduliuotės doze, palyginimu. Šio tyrimo metu citotoksiškumas išreiškiamas nuo koncentracijos priklausomu vitalinio neutralaus raudonojo dažo (NR) susigėrimo į ląstelę susilpnėjimu (9) praėjus 24 valandoms, po to kai ląstelės buvo paveiktos tiriamąja chemine medžiaga bei apšvitintos.

Balb/c inbredinio pelių kamieno transformuoto fibroblastų ląstelių linija 3T3 24 valandas kultivuojama *in vitro*, kad susiformuotų monosluoksniai. Po to į dvi 96 duobučių mikrotitravimo plokšteles, skirtas kiekvienai tiriamajai medžiagai, įpilamos 8 skirtingos tiriamosios medžiagos koncentracijos, ir plokštelės 1 valandą inkubuojamos. Paskui viena mikrotitravimo plokštelė apšvitinama necitotoksine 5 J/cm^2 ultravioletinės/matomos šviesos spinduliuotės doze, o kita plokštelė tuo metu laikoma tamsoje. Vėliau abiejose plokštelėse esanti terpė pakeičiama kultivavimui skirta terpe, ir po pakartotinio 24 valandų inkubavimo pagal 3 valandas trunkantį neutralaus raudonojo dažo susigėrimą (NRU) į ląsteles nustatomas ląstelių gyvybingumas. Santykinis ląstelių gyvybingumas, išreiškiamas neigiamų kontrolinių mėginių (nepaveiktų nei chemine medžiaga, nei šviesa) procentais, apskaičiuojamas kiekvienai iš 8 tiriamosios medžiagos koncentracijų. Numatant medžiagos fototoksinį aktyvumą, lyginami atsakai į skirtingas medžiagas, apšvitintos ultravioletinės šviesos spinduliuote arba laikytos tamsoje, koncentracijas, kai lygis paprastai būna EB_{50} , t. y. tokios koncentracijos, kuri slopina ląstelių gyvybingumą 50 % tiriamąja medžiaga nepaveiktuose kontroliniuose mėginiuose.

1.6. Kokybės kriterijai

Ląstelių jautrumas UVA; ankstesnių tyrimų duomenys: ląstelių jautrumas ultravioletinės šviesos spinduliuotei turėtų būti tikrinamas reguliariai. Ląstelės pasėjamos tokiu pat tankiu, kaip ir atliekant 3T3 NRU fototoksiškumą *in vitro*, kitą dieną ląstelės apšvitinamos UVA ($1-9 \text{ J/cm}^2$) dozėmis, o dar kitą dieną ląstelių gyvybingumas nustatomas, atliekant neutralaus raudonojo dažo susigėrimo į ląsteles (NRU) tyrimą. Ląstelės laikomos atitinkančiomis kokybės kriterijus, jei jų gyvybingumas po apšvitos 5 J/cm^2 UVA spinduliuotės doze sudaro ne mažiau kaip 80 % tamsoje laikytų kontrolinių ląstelių gyvybingumo. Esant didžiausios apšvitos UVA dozei (9 J/cm^2), ląstelių gyvybingumas turėtų sudaryti ne mažiau kaip 50 % tamsoje laikytų kontrolinių ląstelių gyvybingumo. Šis tikrinimas turėtų būti daromas atliekant kas dešimtą ląstelių persėjimą.

Neigiamų kontrolinių mėginių ląstelių jautrumas UVA: šis tyrimas laikomas atitinkančiu kokybės kriterijus, jei neigiamų kontrolinių ląstelių (laikomų Earlo subalansuotame druskų tirpale (EBSS), kuriame yra arba nėra 1 % dimetilsulfoksido (DMSO) ar 1 % etiletanolio (EtOH), atliekant + UVA tyrimą gyvybingumas sudaro ne mažiau kaip 80 % neapšvitintų ląstelių, laikytų tame pačiame tirpale tamsoje (- UVA), gyvybingumo.

Neigiamų kontrolinių mėginių ląstelių gyvybingumas: absoliutus optinis tankis ($OT_{540\text{ NRU}}$), išmatuotas NR neigiamų kontrolinių mėginių ląstelių ekstrakto, parodo, ar 1×10^4 ląstelių, pasėtų į vienos mikrotitravimo plokštelės duobutę, skaičius padaugėjo, dukart pailginus tyrimo trukmę. Tyrimas laikomas priimtiniu, jei kontrolinių mėginių, nepaveiktų chemine medžiaga, optinio tankio ($OT_{540\text{ NRU}}$) vidurkis yra $3 \times 0,2$.

Teigiami kontroliniai mėginiai: atliekant kiekvieną 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą *in vitro*, tiriamas ir žinomos cheminės medžiagos fototoksinis aktyvumas. Kadangi pagal Europos Sąjungos ir COLIPA bendrą projektą atliekant tyrimo patvirtinimą chlorpromazinas buvo naudojamas kaip teigiama kontrolinė medžiaga, todėl rekomenduojama jį naudoti. Atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą *in vitro*, naudojamas chlorpromazinas arba kai pagal standartinį protokolą buvo nustatyti tokie tyrimo priimtimumo kriterijai, kai (+ UVA) bandymo metu chlorpromazino EB_{50} siekė 0,1-2,0 $\mu\text{g/ml}$, o (- UVA) bandymo metu — chlorpromazino koncentracija siekė nuo 7,0 iki 90,0 $\mu\text{g/ml}$. Fotodirginimo veiksnys, t. y. EB_{50} pokytis, turėtų būti ne mažesnis negu 6.

Vietoj chlorpromazino kaip gretutinės teigiamos kontrolinės medžiagos gali būti naudojamos kitos žinomos cheminės medžiagos, pasižyminčios fototoksinu aktyvumu, bei atitinkančios tiriamos medžiagos klasę ir pasižyminčios tokiomis pat tirpumo savybėmis. Tuo atveju, kaip rodo ankstesnių tyrimų duomenys, kaip tyrimo priimtimumo kriterijus reikėtų tinkamai nustatyti EB_{50} dydžių intervalus/skalę, fotosudirginimo veiksnį ir vidutinį fotoefektą.

1.7. Tyrimo metodo aprašymas

1.7.1. Preparatai

1.7.1.1. Ląstelės

Atliekant tyrimo patvirtinimą, buvo panaudota pelių fibroblastų ląstelių permanentinė linija Balb/c 3T3 (klonas 31), gauta arba iš ATCC, arba iš ECACC, todėl siūloma ją naudoti. Atliekant tyrimą pagal tą pačią metodiką, galima sėkmingai panaudoti kitas ląsteles ar ląstelių linijas, jei jų kultivavimo sąlygos yra pritaikytos specifiniams ląstelių poreikiams, tačiau reikia, kad jos būtų lygiavertės.

Reikia nuolat tikrinti, ar ląstelės neužkrėstos mikoplazmomis, ir tik tada, kai tokio patikrinimo rezultatai yra tinkami, ląsteles galima tirti.

Juo daugiau ląstelės bus persėjamos, tuo ląstelių jautrumas UVA spinduliotei gali padidėti, todėl turi būti tiriamos paties mažiausio persėjimo (mažesnio nei 100) Balb/c 3T3 linijos ląstelės. Svarbu patikrinti Balb/c 3T3 linijos ląstelių jautrumą UVA spinduliotei pagal šioje rekomendacijoje pateiktą kokybės kontrolės procedūrą.

1.7.1.2. Terpė ir kultivavimo sąlygos

Atliekant įprastinį ląstelių persėjimą bei tyrimo procedūras, reikia naudoti atitinkamą terpę bei paisyti kultivavimo sąlygų. Balb/c 3T3 linijos ląstelės kultivuojamos DMEM terpėje, papildytoje 10 % naujų giminių veršelių serumu, 4 mM glutaminu, penicilinu bei streptomycinu drėgnoje atmosferoje, kai aplinkos temperatūra siekia 37 °C, o CO_2 kiekis - 7,5 %. Ypač svarbu, kad ląstelių kultivavimo sąlygos užtikrintų tyrimui naudojamų ląstelių ar jų linijų gyvavimo laikotarpiu ląstelinį ciklą.

1.7.1.3. Kultūrų paruošimas

Ląstelės, paimtos iš užšaldytų kamieninių kultūrų, reikiamu tankumu pasėjamos į kultivavimo terpę ir prieš jas panaudojant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrime bent kartą yra persėjamos *in vitro*.

Ląstelės, kurios bus naudojamos fototoksiškumo tyrimui, pasėjamos į kultivavimo terpę tokiu tankiu, kad atskiros ląstelių kolonijos nesulietų kultivavimo pabaigoje, t. y. tada, kai praėjus 48 valandoms nuo ląstelių pasėjimo yra įvertinamas jų gyvybingumas. Balb/c 3T3 linijos ląstelėms, auginamoms 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje, rekomenduojamas ląstelių tankis vienoje duobutėje yra 1×10^4 .

Tiriant kiekvieną cheminę medžiagą, ląstelės vienodai pasėjamos į dvi atskiras 96 duobučių mikrotitravimo plokšteles, kurios viso tyrimo metu yra kultivuojamos vienodomis sąlygomis, išskyrus tą laikotarpį, kai ląstelės, kultivuojamos vienoje plokštelėje, apšvitinamos UVA/matomos šviesos spinduliuote, o kitoje plokštelėje — laikomos tamsoje.

1.7.1.4. Metabolinė aktyvacija

Nors iki šiol vis dar reikalaujama, atliekant tyrimus, kad būtų įvertintas tiriamų medžiagų genotoksinis bei karcinogeninis aktyvumas, naudoti metabolinės sistemos, tačiau kai atliekami fototoksikologiniai tyrimai, nėra žinoma jokia cheminė medžiaga, kurią reikėtų transformuoti metaboliniu būdu, kad ji veiktų kaip fototoksinas tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. Dėl šios priežasties laikomasi nuostatos, kad šiam tyrimui metabolinės aktyvacijos sistema nėra nei būtina, nei mokslinai pateisinama.

1.7.1.5. Tiriamoji cheminė medžiaga/preparatas

Prieš pat pradėdant tyrimą tiriamosios cheminės medžiagos turi būti iš naujo paruošiamos, nebent jų stabilumo tyrimai rodo, kad laikomos jos nepakito. Jei medžiagos gali pradėti greitai irti, apšvietus jas šviesa, gali prireikti jas ruošti raudonoje šviesoje.

Tiriamosios cheminės medžiagos turi būti ištirpinamos buferiniuose druskų tirpaluose — Earlo subalansuotame druskų tirpale (EBSS) arba buferiniame fosfatinių druskų tirpale (PBS), kuriuose turi nebūti nei baltyimų, nei absorbuojančių šviesą pH indikatorinių spalvų, nes priešingu atveju apšvitos metu nebus išvengta tyrimo klaidų.

Tiriamosios cheminės medžiagos, ribotai tirpstančios vandenyje, turi būti maksimaliai (iki 100 %) ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose, kad būtų gauta pageidaujama jų koncentracija ir tada jas būtų galima praskiesti buferiniais druskų tirpalais santykiu 1: 100. Jei naudojamas tirpiklis, visose kultūrose, t. y. neigiamuose kontroliniuose mėginiuose ir visose tiriamosios medžiagos koncentracijose, jo tūris turi būti pastovus - 1 % (v/v).

Rekomenduojami tirpikliai yra dimetilsulfoksidas (DMSO) ir etanolis (EtOH). Galima naudoti ir kitus nelabai didelio citotoksiškumo tirpiklius (pvz., acetoną), tačiau prieš naudojimą reikia detaliai iširti jų specifines savybes, pvz., jų sąveiką su chemine medžiaga, fototoksinio efekto slopinimą bei laisvųjų radikalų surišimą.

Jei reikia, tirpumą galima padidinti suplakant ir (ar) suardant ultragarsu ir (ar) kaitinant iki 37 °C temperatūros.

1.7.1.6. Apšvita ultravioletiniais spinduliais/parengimas

Šviesos šaltinis: tinkamas šviesos šaltinis bei šviesos filtras yra svarbiausi veiksniai, apsprendžiantys fototoksiškumo tyrimą. UVA bei matomos šviesos spinduliuotės bangos ilgio spektrai dažniausiai yra susiję su fotodirginimu tuo tarpu UVB spinduliuotė nėra tokia svarbi ir pasižymi dideliu tiesioginiu citotoksiškumu — bangos ilgio spektrui esant tarp 313 ir 280 nm, UVB citotoksiškumas padidėja net 1 000 kartų (11). Parenkant tinkamą šviesos šaltinį, vadovaujamas tokiais kriterijais, pagal kuriuos kurie reikalaujama, kad pasirinktu laiko tarpu, panaudojus žinomus fotodirgintojus, būtų galima užregistruoti šviesos šaltinio spinduliuotės, kurią absorbuoja tiriamoji cheminė medžiaga, bangos ilgius ir dozę. Be to, bangos ilgiai ir dozė, įskaitant ir šilumos (infraraudonojo bangos ilgio spektre) emisiją, neturi turėti pernelyg neigiamos įtakos tiriamajai sistemai.

Manoma, kad saulės šviesą imituojantys prietaisai yra optimaliausias šviesos šaltinis. Juose naudojami tiek ksenoniniai, tiek gyvsidabriu padengti kaitinamieji lankai. Pastarieji pranašesni tuo, kad yra pigesni ir mažiau išspinduliuoja šilumos, tačiau jų išspinduliuojamoji šviesa, artima saulės šviesai, nėra patenkinama. Visi prietaisai, mėgdžiojantys saulės šviesą, išspinduliuoja pakankamai didelius UVB spinduliuotės kiekius, todėl reikia tinkamai filtruoti jų išspinduliuojamą šviesą, kad didelis UVB spinduliuotės citotoksiškumas būtų susilpnintas.

Atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą *in vitro*, reikia naudoti apšvitos spektrą, neturintį UVB ilgio bangų (UVA/UVB santykis turi būti lygus 1:20). Atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimą *in vitro*, buvo paskelbti duomenys apie saulės šviesą mėgdžiojančio prietaiso išspinduliuojamos šviesos bangų spektro pasiskirstymą (3).

Dozimetrija: prieš kiekvieną fototoksiškumo tyrimą naudojant tinkamą plačiabangį ultravioletinės spinduliuotės registravimo prietaisą, visuomet turi būti pastoviai tikrinamas spinduliuotės intensyvumas. Šis matavimo prietaisas turi būti kalibruojamas šviesos šaltinio atžvilgiu. Ultravioletinės spinduliuotės registravimo prietaisą reikia tikrinti, naudojant kitą standartinį prietaisą, skirtą ultravioletinei spinduliuotei registruoti bei priklausantį tam pačiam tipui ir šviesos šaltinio atžvilgiu kalibruotą tokiu pat būdu. Idealiausia būtų tai, kad šviesos šaltinio išspinduliuotų ir praėjusių pro filtrą bangų spektras bei plačiabangis prietaisas, kalibruotas šviesos šaltinio atžvilgiu ir skirtas ultravioletinei spinduliuotei registruoti būtų atitinkamai išmatuotas bei patikrintas spektriniu radiometru, tačiau su šiuo prietaisu turi dirbti parengti kvalifikuoti asmenys.

Atliekant tyrimo patvirtinimą, buvo nustatyta, kad UVA spinduliuotės intensyvumo dozė (5 J/cm²) nėra citotoksiška Balb/c 3T3 linijos ląstelių atžvilgiu bei pakankama, kad cheminės medžiagos, pasižymincios mažu citotoksiniu aktyvumu, būtų sužadintos. Kad 5 J/cm² dozė būtų pasiekta per 50 minučių, spinduliuotės intensyvumas turi siekti 1,666 mW/cm². Jei naudojama kita ląstelių linija ar kitas šviesos šaltinis, UVA spinduliuotės dozė, kurią išspinduliuoja kitu būdu kalibruotas prietaisas, taikomi kriterijai, kurie neturi neigiamos įtakos ląstelėms ir yra pakankami, kad būtų galima užregistruoti standartinius fototoksiškus efektus. Šviesos spinduliuotės trukmė apskaičiuojama pagal tokią formulę:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{spinduliuotės dozė (J/cm}^2\text{)} \times 1\,000}{\text{spinduliuotė (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1\text{W/s})$$

1.7.2. Tyrimo sąlygos

Tiriamosios cheminės medžiagos maksimali koncentracija neturi viršyti 100 µg/ml, kadangi visos cheminės fototoksinės medžiagos nustatomos, kai jų koncentracija yra nedidelė, tuo tarpu koncentracijai didėjant, daugėja teigiamų klaidingų rezultatų (13). Kai tiriamosios cheminės medžiagos koncentracija yra maksimali, jos pH turi atitikti pageidaujamą intervalą (6,5-7,8).

Tiriamosios cheminės medžiagos, apšvitintos UVA spinduliuote arba laikomos tamsoje, koncentracijos ribos turi būti tinkamai nustatomos per ankstesnius vykdytus ribų paieškos tyrimus. Koncentracijų serijų riba ir jų skiriamoji riba turi būti taip nustatomos, kad eksperimentiniai duomenys atitiktų atsakus į skirtingas tiriamosios medžiagos koncentracijas. Tam tikslui naudojamos geometrinės koncentracijų serijos (kartu su pastovaus praskiedimo veiksmu).

1.7.3. Tyrimo procedūra ⁽¹⁾

1.7.3.1. Pirmoji diena

Łąstelių suspensija paruošiama terpėje, skirtoje ląstelėms kultivuoti (1×10^5 ląstelių/ml), ir po 100 μ l terpės išpilstoma į 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės periferines duobutes (vadinamąsias „tuščiąsias“ duobutes). Į likusias duobutes išpilstoma po 100 μ l paruoštos ląstelių suspensijos (10^5 ląstelių/ml arba 1×10^4 ląstelių/duobutėje). Kiekvienai tiriamajai cheminei medžiagai paruošiamos 2 mikrotitravimo plokštelės, kurių viena bus apšvitinama UVA spinduliuote ir skirta fototoksiškumo įvertinimui, tuo tarpu kai kita bus laikoma tamsoje ir skirta citotoksiškumui nustatyti.

Łąstelės inkubuojamos 24 valandas (atmosferoje, turinčioje 7,5 % CO₂, esant 37 °C temperatūrai), kol susidaro pusiau susiliejęs ląstelių monosluoksnis. Šios inkubacijos metu ląstelių gyvybinis ciklas atsigauja, jos prilimpa prie substrato, ir prasideda eksponentinis ląstelių populiacijos didėjimas.

1.7.3.2. Antroji diena

Po inkubacijos terpė nupilama nuo ląstelių ir jos du kartus plaunamos įpilant į kiekvieną duobutę po 150 μ l EBSS/PBS tirpalo. Po plovimo į kiekvieną duobutę įpilama po 100 μ l EBSS/PBS tirpalo, turinčio atitinkamos koncentracijos tiriamosios cheminės medžiagos ar tirpiklio (neigiamosios kontrolės). Tyrimui naudojamos 8 skirtingos tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijos. Łąstelės su tiriamąja chemine medžiaga inkubuojamos tamsoje 1 valandą (atmosferoje, turinčioje 7,5 % CO₂, 37 °C).

Atliekant fototoksiškumo tyrimą, ląstelės 50 minučių kambario temperatūroje 1,7 mW/cm² intensyvumo UVA spinduliuote (5 J/cm²) švitinamos per 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės dangtelį. Paskui plokštelė džiovinama džiovintuvu, kad po jos dangteliu nesikondensuotų vandens lašeliai. Plokštelės, kurios bus panaudotos citotoksiškumui tirti, 50 minučių laikomos tamsoje dėžėje kambario temperatūroje (laikymo sąlygos, adekvačios plokštelės, naudojamos fototoksiškumo tyrimams, sąlygoms).

Tiriamasis tirpalas nupilamas, o ląstelės du kartus plaunamos, įpilant į kiekvieną duobutę po 150 μ l EBSS/PBS tirpalo. Vėliau šis tirpalas pakeičiamas terpe, skirta ląstelėms kultivuoti ir plokštelė per naktį inkubuojama atmosferoje, turinčioje 7,5 % CO₂, esant 37 °C temperatūrai.

1.7.3.3. Trečioji diena

Mikroskopinis tyrimas

Łąstelės analizuojamos faziniu-kontrastiniu mikroskopu. Registruojami morfologiniai ląstelių pokyčiai, atsiradę dėl tiriamosios cheminės medžiagos sukeltų citotoksiškų efektų. Šis patikrinimas rekomenduojamas tam, kad būtų išvengta klaidų eksperimento metu, tačiau, tiriant citotoksiškumą ar fototoksiškumą, šie užrašai nėra naudojami.

Neutralaus raudonojo (NR) dažo susigėrimo tyrimas

Łąstelės praplaunamos su 150 μ l pašildytu EBSS/PBS tirpalu, vėliau jis atsargiai nusiurbiamas automatine mikropipete. Į kiekvieną duobutę pilama 100 μ l NR terpės ir inkubuojama 3 valandas atmosferoje, turinčioje 7,5 % CO₂, esant 37 °C temperatūrai.

Po inkubacijos NR terpė nupilama, o ląstelės praplaunamos į kiekvieną duobutę įpilant po 150 μ l EBSS/PBS tirpalo. Praplovimui skirtas tirpalas nupilamas ir plokštelė visiškai išdžiovinama, centrifuguojant ją apgręžiamuoju būdu.

Vėliau į kiekvieną duobutę įpilama po 150 μ l NR absorbcinio tirpalo (šviežiai paruošto etilo alkoholio ir acto rūgšties tirpalo).

Plokštelė 10 minučių greitai kratoma ant kratytuvo tol, kol NR visiškai difunduoja iš ląstelių ir susidaro homogeniškas tirpalas.

NR tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru (bangos ilgiui siekiant 540 nm), o duobutės, pripildytos tik terpės, naudojamos kontrolei. Gauti duomenys yra saugomi atitinkamo formato laikmenoje (pvz., ASCII) tam, kad vėliau būtų galima juos analizuoti.

2. DUOMENYS

2.1. Duomenų kokybė ir kiekybė

Remiantis duomenimis turi būti įmanoma atlikti svarbią atsako, gauto UVA (+) ir UVA (–) eksperimentų metu bei priklausomo nuo koncentracijos, analizę. Jei nustatomas citotoksiškumas, tai tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalas ir atskirų jos koncentracijų susikirtimo taškai pateikiami taip, kad eksperimentiniai duomenys atitiktų kreivę. Dėl to, kad tamsoje laikoma tiriamoji cheminė medžiaga gali būti necitotoksiška iki apibrėžtos koncentracijos (100 µg/ml), bet ypač citotoksiška tada, kai apšvitinama UVA spinduliuote, per abu eksperimento etapus turi būti tiriamas koncentracijos intervalas, šiuo tikslu gali prireikti nubrėžti aiškią skiriamąją ribą tarp atskirų koncentracijos dydžių, kad būtų paisoma adekvačių duomenų kokybei taikomo reikalavimo. Jei abiejų eksperimento etapų (medžiagą švitinant spinduliais arba laikant ją tamsoje) citotoksiškumas nenustatomas, tai užtenka nustatyti skiriamąją ribą tarp atskirų dozių iki pačios didžiausios medžiagos koncentracijos.

Nėra reikalaujama pakartoti eksperimentą tam, kad būtų patvirtintas akivaizdus teigiamas rezultatas. Be to nereikia patvirtinti akivaizdžiai neigiamų rezultatų, gaunamų tiriant cheminę medžiagą, kurios koncentracija yra pakankamai didelė. Tokiais atvejais užtenka atlikti vieną pagrindinį eksperimentą ir vieną ar keletą papildomų eksperimentų, kurių metu preliminariai nustatomi koncentracijų intervalai.

Tyrimai kartojami, jei taikant spėjimų modelį gaunami labai arti galutinės ribos esantys tarpiniai rezultatai.

Jei prireikia atlikti pakartotinį tyrimą, keičiamos eksperimento sąlygos, kurios gali turėti didelės reikšmės, kai norima gauti pageidaujamą rezultatą. Pagrindinė šio tyrimo procedūra — tiriamosios cheminės medžiagos tirpalų paruošimas. Todėl eksperimento sąlygų pakeitimai (papildomas tirpiklis, medžiagos suardymas, sutrinant ją arba veikiant ultragarsu) gali turėti reikšmės kartojant eksperimentą. Priešingu atveju reikia pakeisti inkubacijos prieš apšvitinimą trukmę. Trumpesnė inkubacija svarbi greitai vandenyje suyrančioms cheminėms medžiagoms.

2.2. Rezultatų apdorojimas

Jei yra įmanoma, tai nustatoma tiriamosios medžiagos koncentracija, kuriai esant, ląstelinis NRU inhibuojamas 50 % (EB₅₀). Tai padaroma, tyrimo metu gautus atsako į skirtingas koncentracijas duomenis apdorojant nelinejinės regresijos (pirmiausia — Hill funkcijos arba atitinkamos logistinės regresijos) arba kitomis atitikties procedūromis (14). Prieš panaudojant EB₅₀ tolesniems apskaičiavimams, būtina atitinkamai patikrinti atitikties kokybę. EB₅₀ gali būti apskaičiuojamas ir grafiniais duomenų atitikties metodais. Šiuo atveju rekomenduojama nubraižyti tikimybės grafiką (x ašis — log; y ašis — tikimybės vienetas arba probitas), kadangi atlikus šią transformaciją, atsako į įvairias koncentracijas funkcija taps linijinė.

2.3. Rezultatų įvertinimas (spėjimų modeliai)

2.3.1. Spėjimo modelio 1 variantas: fotodirglumo veiksnys (FDV)

Atliekant apšvitos UVA (+) ir UVA (–) eksperimentus gaunamos atsako į skirtingas tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijas kreivės, o FDV apskaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

Jei $FDV < 5$, tai medžiaga nėra fototoksiška, tuo tarpu jei $FDV \geq 5$, medžiaga yra fototoksiška.

Jei cheminė medžiaga, tik apšvitinta ultravioletine spinduliuote pasirodo esanti citotoksiška, o laikyta tamsoje — necitotoksiška, tai tokiu atveju neįmanoma apskaičiuoti fotodirglumo veiksnio. Tokiais atvejais, kai atliekamas citotoksiškumo tyrimas, tiriamąją cheminę medžiagą laikant tamsoje, ir nustatomas fotodirglumo veiksnys „> FDV“, tai šio veiksnio vertė apskaičiuojama pagal didžiausią tiriamosios medžiagos koncentraciją (C_{max}):

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

Jei įmanoma apskaičiuoti „> FDV“ vertę, tai, paėmus bet kokią šio veiksnio reikšmę, didesnę nei 1, bus galima spėti apie fototoksiškumą būdingą medžiagai.

Jei cheminė medžiaga, būdama pačios didžiausios koncentracijos, nepasižymi citotoksiškumu, ir dėl to, kai ji laikoma tamsoje arba apšvitinama ultravioletine spinduliuote, abiem atvejais negalima apskaičiuoti EB₅₀, tai šitai rodo, kad medžiaga nėra fototoksiška. Tokiais atvejais pažymima, kad išmatuotas fotodirglumo veiksnys lygus 1.

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

Jei galima gauti tik FDV, lygų 1, tai rodo, jog medžiaga nėra fototoksiška.

Kai b ir c atvejais bandoma nustatyti medžiagos fototoksiškumą, reikia ypač atkreipti dėmesį į tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijas, gautas tiriant 3T3 NRU fototoksiškumą *in vitro*.

2.3.2. Spėjimų modelio 2 variantas: vidutinis fotoefektas (VFE)

Bandant nustatyti medžiagos fototoksiškumą, galima taikyti ir kitą spėjimų modelio variantą, kuris buvo sukurtas, kai Europos Sąjunga ir COLIPA atliko tyrimo patvirtinimą¹⁵ ir vėliau ištyrė cheminių medžiagų, apšvitintų filtruota ultravioletine spinduliuote, fototoksiškumą *in vitro*, esant „nulinėms sąlygoms“ (13). Taikant šį modelį išvengiama fotodirglumo veiksnio modelio apribojimų tais atvejais, kai EB₅₀ neįmanoma apskaičiuoti. Šis modelis remiasi vidutiniu fotoefektu (VFE) — parametru, kuris remiasi absoliučiu atsakų į skirtingas tiriamosios medžiagos koncentracijas kreivių lyginimu. Tam, kad VFE modelis būtų pritaikytas, Berlyno Humboldtų universitete buvo sukurta nemokamai įsigyjama speciali kompiuterių programa.

2.4. Rezultatų aiškinimas

Teigiamas rezultatas, gautas tiriant 3T3 NRU fototoksiškumą *in vitro* (FDV ≥ 5 ; VFE $\geq 0,1$), rodo, kad tiriamoji cheminė medžiaga yra fototoksiška. Jei šis rezultatas buvo gautas, kai tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijos buvo mažesnės nei 10 $\mu\text{g/ml}$, tai rodo, kad ši medžiaga gali įgyti fototoksinę aktyvumą, esant įvairioms apšvitinimo sąlygoms *in vivo*. Jei teigiamas rezultatas gaunamas tada, kai didžiausia tiriamosios cheminės medžiagos koncentracija siekia 100 $\mu\text{g/ml}$, tai vėliau būtina įvertinti tos medžiagos keliamą žalą arba fototoksinę aktyvumą. Šitai galima atlikti, tiriant cheminės medžiagos įsiskverbimą bei kaupimąsi odos audinyje arba cheminę medžiagą tiriant kitu metodu, patvirtinančiu medžiagos fototoksiškumą (pvz., panaudojant modelinę žmogaus odos sistemą).

Neigiamas rezultatas, gautas tiriant 3T3 NRU fototoksiškumą *in vitro* (FDV < 5 arba VFE $< 0,1$), rodo, kad tiriamoji cheminė medžiaga nėra fototoksiška žinduolių ląstelėms, kurios buvo kultivuojamos, esant nustatytomis sąlygomis. Tais atvejais, kai tiriamosios cheminės medžiagos didžiausia koncentracija siekė 100 $\mu\text{g/ml}$, neigiamas rezultatas rodo, kad tiriamoji cheminė medžiaga nėra fototoksiška *in vitro*, ir neatrodo, kad ji tokia taps *in vivo*. Tais atvejais, kai naudojant mažesnes tiriamosios medžiagos koncentracijas, buvo gauti identiški atsakai į fototoksinės medžiagos, apšvitintos ultravioletine spinduliuote bei laikytos tamsoje, skirtingas koncentracijas, tai gauti rezultatai bus vienodai aiškinami. Tačiau tuo atveju, jei nebus nustatytas medžiagos fototoksiškumas apšvitinus ją ultravioletine spinduliuote arba laikant tamsoje ir jei tiriamosios medžiagos koncentracijos, kurias apriboja jos tirpumas vandenyje, bus mažesnės nei 100 $\mu\text{g/ml}$, bus galima suabejoti metodu, kuriuo tiriami šie cheminės medžiagos, ir reikės atlikti tyrimo patvirtinimą (odos audinio modelinė sistema *in vitro* ar *ex vivo* arba tyrimas *in vitro*).

3. ATASKAITA

Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje pateikiama tokia informacija:

Tiriamoji cheminė medžiaga:

- identifikacijos duomenys bei CAS numeris, jeigu jis žinomas,
- fizinė prigimtis ir grynumas,
- tyrimui svarbios fizikinės ir cheminės savybės,
- stabilumas ir fotostabilumas, jei jis žinomas.

Tirpiklis:

- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,
- tiriamosios cheminės medžiagos tirpumas šiame tirpiklyje,
- tirpiklio kiekis terpėje (EBSS arba PBS), kuria paveikiama cheminė medžiaga.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis,
- ar ląstelėse neaptikta mikoplazmų,
- ląstelių persėjimų skaičius, jei jis žinomas,
- ląstelių jautrumas ultravioletinei spinduliuotei, nustatytas 3T3 NRU fototoksiškumo tyrimo metu, panaudojant apšvitinančius prietaisus, *in vitro*.

Tyrimo sąlygos a) — inkubacija prieš poveikį ir po jo:

- terpės, skirtos kultivavimui, tipas ir sudėtis,
- inkubacijos sąlygos (CO₂ koncentracija, temperatūra, drėgmė),
- inkubacijos trukmė (prieš poveikį ir po jo).

Tyrimo sąlygos b) — paveikimas tiriamąja chemine medžiaga:

- pagrindimas, kodėl pasirinkta tokia apšvitinamos ultravioletine spinduliuote ir laikomos tamsoje tiriamosios cheminės medžiagos koncentracija,
- pagrindimas, kodėl tyrimui pasirinkta didžiausia koncentracija, kai tiriamosios cheminės medžiagos tirpumas terpėje yra ribotas ir medžiaga nėra citotoksiška,
- terpės, kurioje buvo paveikiamas tyrimo objektas, buferinių druskų tirpalo tipas ir sudėtis,
- poveikio tiriamąja chemine medžiaga trukmė.

Tyrimo sąlygos c) — spinduliuotė:

- pagrindimas, kodėl pasirinktas tyrimo metu naudotas šviesos šaltinis,
- šviesos šaltinio išspinduliuojamų bangų spektrinės charakteristikos,
- panaudoto šviesos filtro pralaidumo/absorbicijos charakteristikos,
- radiometro charakteristikos bei jo kalibravimo duomenys,
- atstumas tarp šviesos šaltinio ir tiriamosios sistemos,
- apšvitos UVA spinduliais intensyvumas, esant nustatytam atstumui, išreikštas mW/cm^2 ,
- apšvitos ultravioletine ir matoma šviesos spinduliuote trukmė,
- UVA spinduliuotės dozė, išreikšta J/cm^2 ,
- temperatūra, kuriai esant ląstelių kultūros buvo apšvitinamos ir tuo pačiu metu laikytos tamsoje.

Tyrimo sąlygos d) — NRU tyrimas:

- NR terpės sudėtis,
- NR inkubacijos trukmė,
- inkubacijos sąlygos (CO_2 koncentracija, temperatūra, drėgmė),
- NR išskyrimo sąlygos (išskyrimui panaudota medžiaga, trukmė),
- šviesos bangos ilgis, panaudotas spektrofotometriniam NR optinio tankio nustatymui,
- antrasis standartinis bangos ilgis (etalonas), jei toks buvo panaudotas,
- nulinė spektrofotometro padėtis, jeigu buvo panaudotas.

Rezultatai:

- ląstelių gyvybingumas, nustatytas kiekvienai tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijai ir išreikštas kontroliniuose mėginiuose esančių ląstelių vidutinio gyvybingumo procentais,
- atsakų į skirtingas tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijas kreivės (tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijos ir santykinio ląstelių gyvybingumo santykis), nustatytos vienu metu atlikus medžiagos UVA (+) ir UVA (-) fototoksiškumo tyrimus,
- atsakų į skirtingas tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijas kreivėje pateiktų duomenų analizė; jei įmanoma, tai apskaičiuojamas medžiagos EB_{50} , UVA (+) ir EB_{50} UVA (-),
- dviejų atsakų į medžiagos koncentracijas kreivių, gautų, nesant apšvitos UVA ir matomos šviesos spinduliuote, palyginimas arba apskaičiuojant fotodirglumo faktorių (FDF) arba vidutinį fotoefektą (VFE),
- fototoksinio aktyvumo klasifikacija,
- tyrimo priimtumo kriterijai a) — gretutiniai neigiami kontroliniai mėginiai:
 - absoliutus ląstelių, apšvitintų ir neapšvitintų UVA spinduliais, gyvybingumas (NR ekstrakto optinis tankis),
 - anksčiau atliktų tyrimų metu gauti duomenys apie naudotus neigiamus kontrolinius mėginius, jų vidurkis ir standartinis nukrypimas.
- tyrimo priimtumo kriterijai b) — gretutiniai teigiami kontroliniai mėginiai:
 - teigiamame kontroliniame mėginyje esančios cheminės medžiagos, apšvitintos UVA spinduliuote (UVA (+)) bei laikytos tamsoje (UVA (-)), EB_{50} bei FDV,
 - anksčiau atliktų tyrimų duomenys apie teigiamuose kontroliniuose mėginiuose esančias chemines medžiagas; EB_{50} UVA (+) ir EB_{50} UVA (-), vidutinį FDV bei jo standartinį nukrypimą.

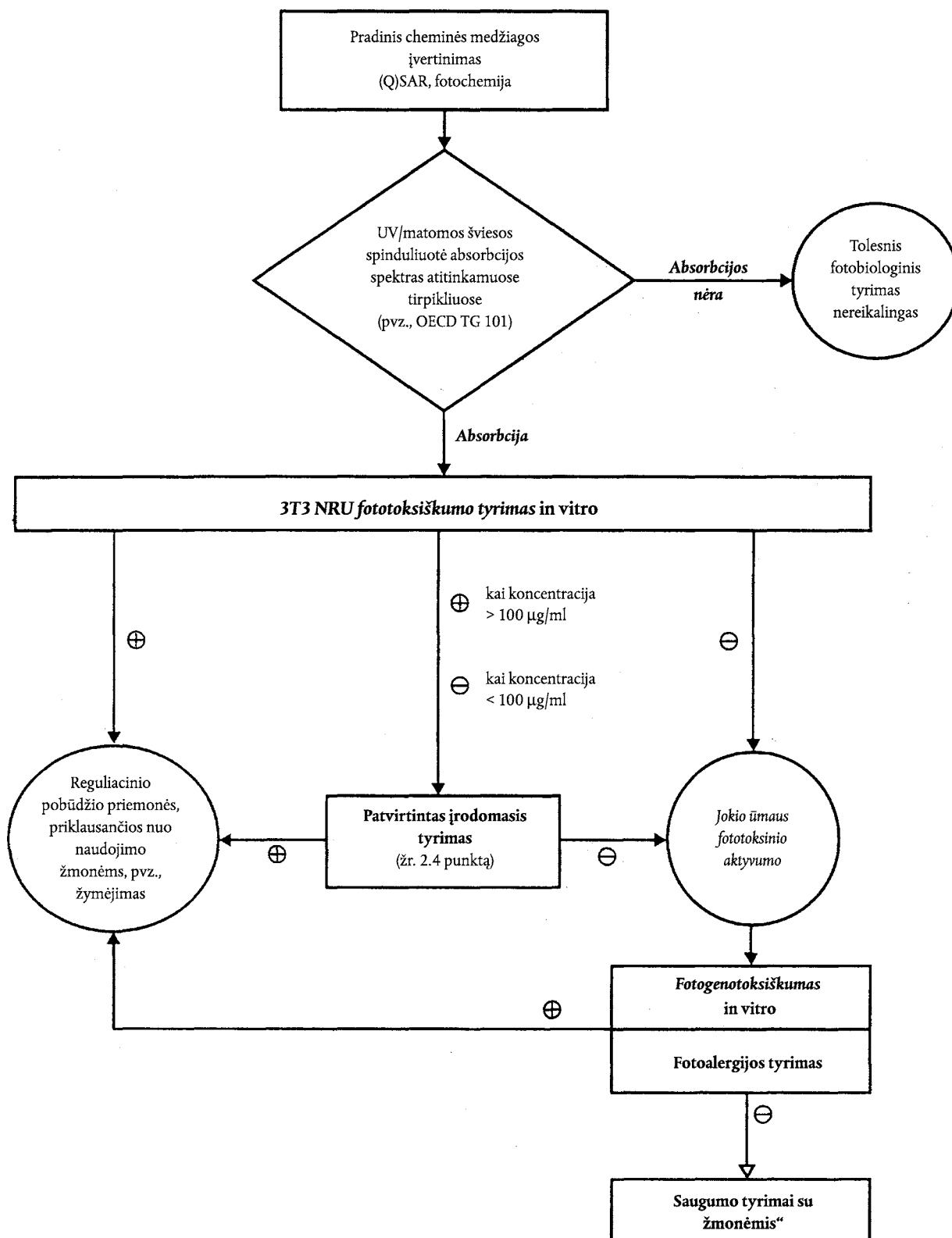
*Rezultatų aptarimas.**Išvados.*

4. NUORODOS

- 1) Spielman, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenauer, F., Moore, L., Pape, W., Phannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEB/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, p. 793-796.
- 2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, p. 7-8.
- 3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J., 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), ES/COLIPA „*In vitro* phototoxicity“ validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, p. 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, p. 95-102.
- 6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3, Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, p. XI-XXXV.
- 7) Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, p. 314-348.
- 8) Spikes, J. D. (1989), Photosensitization. *The science of photobiology*, edited by K. C. Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, p. 79-110.
- 9) Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, p. 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, p. 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, p. 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 ES/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, p. 679-708.
- 14) Holzhütter, H. G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical Modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, p. 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, p. 445-462.

Priedėlis

3T3 NRU fototoksiškumo tyrimo vaidmuo pakopiškai tiriant cheminių medžiagų fototoksiškumą



(1) Papildomi duomenys pateikti 12 nuorodoje."