

32000L0033

8.6.2000

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

L 136/90

ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 2000/33/KE

tal-25 ta' April 2000

li tadatta għall-progress tekniku għas-sebgha u għoxrin darba d-Direttiva 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-disposizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi (*)

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jstabbilixxi l-Komunità Ewropea,

Artikolu 1

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE tas-27 ta' Ġunju 1967 rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-disposizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi (1), kif l-aħħar emendata bid-Direttiva tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill 1999/33/KE (2), u partikolarment l-Artikolu 28 tagħha,

It-testi fl-Annessi I u II għal din id-Direttiva huma miżjuda mal-Parti B ta' l-Anness V tad-Direttiva 67/548/KEE.

Artikolu 2

Billi:

1. L-Istati Membri għandhom idahhlu fis-seħh il-liġijiet, ir-regolamenti u d-disposizzjonijiet amministrattivi meħtieġa sabiex jikkonformaw ma' din id-Direttiva mhux iktar tard mill-1 ta' Ottubru 2001. Għandhom jgħarrfu lill-Kummissjoni b'dan minnufih.

(1) L-Anness V tad-Direttiva 67/548/KEE jippreskrivi l-metodi għad-determinazzjoni tal-propjetajiet fiżiko-kimiċi, tossiċità u ekotossicità tas-sustanzi u preparazzjonijiet. Huwa meħtieġ li dak l-Anness ikun addattat għall-progress tekniku.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn id-disposizzjonijiet, dawn għandhom ikollhom riferenza għal din id-Direttiva jew għandhom ikunu akkumpanjati b'din ir-riferenza fl-okkażjoni tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. L-Istati Membri għandhom jistabbilixxu kif għandha ssir din ir-riferenza.

(2) Skond l-Artikolu 7(2) tad-Direttiva tal-Kunsill 86/609/KEE ta' l-24 ta' Novembru 1986 fuq l-approssimazzjoni tal-liġijiet, ir-regolamenti u d-disposizzjonijiet amministrattivi ta' l-Istati Membri dwar il-protezzjoni ta' annimali użati għall-finijiet sperimentali u xjentifiċi oħra (3), m'għandux isir esperiment li jinvolvi l-użu ta' annimali jekk metodu xjentifikament sodisfaċenti iehor biex jinkiseb ir-risultat imfittex huwa disponibbli raġonevolment u b'mod prattikabbli.

2. L-Istati Membri għandhom jikkomunikaw lill-Kummissjoni d-disposizzjonijiet ewlenin tal-liġi nazzjonali li huma jadottaw fil-qasam kopert b'din id-Direttiva u tabella ta' korrelazzjoni bejn din id-Direttiva u d-disposizzjonijiet nazzjonali adottati.

Artikolu 3

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-seħh fit-tielet jum wara l-pubblikazzjoni tagħha fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej.

(3) Il-Kummissjoni fi hsieba tintroduċi fl-Anness V tad-Direttiva 67/548/KEE ċerti metodi ta' testjar alternattivi li ma jinvolvux l-użu ta' annimali, sabiex tagħmilhom disponibbli għall-ittestjar ta' kimiċi skond l-Artikolu 3(1) tad-Direttiva 67/548/KEE.

Artikolu 4

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fil-25 ta' April 2000.

(4) Il-miżuri previsti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat għall-Addattament mal-Progress Tekniku tad-Direttivi dwar it-Tneħhija ta' l-Ostakoli Tekniċi Għall-Kummerċ f'Sustanzi u Preparazzjonijiet Perikolużi,

Għall-Kummissjoni

Margot WALLSTRÖM

Membru tal-Kummissjoni

(*) Adottata qabel is-26 addattament.

(1) ĠU C 196, tas-16.8.1967, pġ. 1.

(2) ĠU L 199, tat-30.7.1999, pġ. 57.

(3) ĠU L 358, tat-18.12.1986, pġ. 1.

ANNEX I

"B.40. KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

1. **METODU**1.1. **Introduzzjoni**

Żewġ provi *in vitro* għall-korrużività tal-ġilda, il-prova tar-resistenza transkutanea elettrika tal-ġilda tal-far u prova li tuża mudell ta' ġilda tal-bniedem, ġew approvati bhala xjentifikament validi miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM, Ċentru ta' Riċerka Kongunta, Kummissjoni Ewropea) (1) (2) (3). L-istudju ta' validazzjoni ECVAM wera li ż-żewġ provi kienu jistgħu jiddiskriminaw b'mod affidabbli bejn korrużivi tal-ġilda u dawk li m'humiex. Barra dan, il-protokoll tal-prova bbażat fuq mudell tal-ġilda tal-bniedem ippermetta distinzjoni korretta bejn gradi ta' effetti korrużivi (korrożivi tal-ġilda severi magħrufa, R35, u korrużivi oħra tal-ġilda, R34) (2). Qed jingħataw id-deskrizzjoni u l-proċeduri għaż-żewġ provi; l-għażla ta' liema prova tintuża tiddependi fuq htigiet speċifiċi u l-preferenzi ta' l-utent.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali, Parti B.

1.2. **Definizzjonijiet**

Korrużjoni tal-ġilda: Il-produzzjoni ta' hsara irriversibbli fit-tessut fil-ġilda wara l-applikazzjoni ta' materjal ta' prova.

1.3. **Sustanzi ta' Referenza**

Xejn speċifikat, imma ara l-punti 1.5.3.4 u 1.7.2.3.

1.4. **Prinċipju tal-metodu tal-prova – ġilda tal-far prova TER**

Il-materjal tal-prova huwa applikat sa 24 siegħa lill-uċuħ epidermiċi ta' diski tal-ġilda mehuda mill-ġlud ta' firien għadhom żgħar maqtula umanament. Materjali korrużivi huma identifikati bl-abbiltà tagħhom li jipproduċu telf ta' funzjoni ta' l-integrità normali ta' l-istrat korneju u l-funzjoni protettiva, li huwa mkejjel bhala tnaqqis fit-TER inerenti taht livell tal-limitu (5 k Ω)(4)(5). Materjali irritanti u mhux irritanti ma jnaqqisx it-TER taht il-livell tal-limitu. Pass fejn jintrabat il-kulur jista' jkun inkorporat fil-proċedra tal-prova għall-aġenti tensioattivi u organiċi newtri (għad-definizzjoni ara r-referenza (6)) biex jitnaqqas in-numru ta' riżultati pożittivi foloz miksuba speċifikament ma' dawn it-tipi kimiċi (2) (7).

1.5. **Deskrizzjoni tal-metodu tal-prova – prova TER tal-ġilda tal-far**1.5.1. *Animali*

Firien għadhom żgħar (20-23 jum) (razza Wistar jew simili) huma meħtieġa għall-preparazzjoni ta' diski tal-ġilda. Is-suf tad-dahar u tal-ġnub jitneħħa b'attenzjoni bi klippers ta' l-animali żgħar. L-animali huma mbagħad maħsula billi jintmesħu b'attenzjoni, waqt li ż-żona titniżżel f'soluzzjoni antibiotika (li jkollha, per eżempju, *streptomycin*, penicillina, *chloramphenicol* u *amphotericin* f'koncentrazzjonijiet effettivi biex jinibixxu li tikber il-batterja). L-animali jergħu jinhaslu bl-antibiotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel hasla, u jintużaw fi tlett ijiem (l-animali m'għandhomx ikunu akbar minn 31 jum għall-preparazzjoni tal-ġilda).

1.5.2. *Preparazzjoni tad-diski tal-ġilda*

L-animali jinqatlu umanament. Il-ġilda tad-dahar ta' kull animal hija mbagħad imneħħija u mnaddfa minn xaħam żejjed billi jitneħħa b'attenzjoni mill-ġilda. Il-ġilda titpoġġa fuq it-tarf ta' tubu tal-polytetrafluoroethylene (PTFE), waqt li jkun żgurat li l-wiċċ epidermiku huwa f'kontatt mat-tubu. 'O' ring tal-gomma jitpoġġa ssikkat fuq it-tarf tat-tubu biex iżomm il-ġilda fil-post u t-tessut fl-eċċess jitneħħa. Id-dimensjonijiet tat-tubu u ta' l-'O' ring jidher fil-Figura 1. L-'O' ring tal-gomma huwa mbagħad issiġġillat b'attenzjoni fit-tarf tat-tubu PTFE b'ġeli tal-pitrolju. It-tubu jintrifed bi klipp bil-molla ġewwa kamra tar-reċipjent li jkollha soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju (154 mM) (Figura 2).

1.5.3. *Proċedura tal-prova*1.5.3.1. *Applikazzjoni tal-materjal tal-prova*

Sustanzi tal-prova likwidi (150 µl) jiġu applikati lill-wiċċ epidermiku ġewwa t-tubu (Figura 2). Meta jkun ppruvati materjali solidi, jiġi applikat ammont biżżejjed tas-solidu lid-diska biex ikun żgurat li l-wiċċ shiħ ta' l-epidermidi jitgħatta. Ilma dejonizzat (150 µl) huwa mbagħad miżjud fuq is-solidu u t-tubi huma mca-qalqa bil-mod. Is-sustanzi tal-prova għandhom ikollhom il-kuntatt massimu mal-ġilda. Għal xi solidi dan jista' jintlaħaq bit-tishin sa 30°C biex tinhall is-sustanza tal-prova, jew bit-thin biex ikun prodott materjal granulari jew trab.

Tliet diski tal-ġilda jintużaw għal kull sustanza tal-prova. Is-sustanzi tal-prova huma applikati għall-24 siegħa (ara ukoll 1.5.3.4). Is-sustanza tal-prova hija mnehhija bil-ħasil b'ġett ta' ilma mill-vit sa 30°C sakemm ma jkunx jista' jitneħħa materjal iehor. It-tneħħija ta' sustanzi tal-prova li ssolidifikaw fit-tubu tista' tkun facilitata bil-ħasil b'ġett tal-mishun bejn wiehed u iehor 30°C.

1.5.3.2. Mizuri TER

It-TER huwa mkejjejl bl-użu ta' vultaġġ baxx, *databridge* ta' kurrent alternat (eż AIM 401 jew 6401, jew ekwivalenti). Qabel ma titkejjejl ir-resistenza elettrika, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdid volum biżżejjed ta' 70 % etanol biex ikopri l-epidermidi. Wara fit sekondi l-etanol huwa mneħħi billi jinqaleb it-tubu, u mbagħad it-tessut huwa idradat biż-żieda ta' 3ml soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju (154 mM). L-elettrodi tad-*databridge* jitqiegħdu f'kull ġenb tad-diska tal-ġilda biex jittiehed il-kejl tar-resistenza kΩ/disk tal-ġilda (Figura 2). Id-dimensjonijiet ta' l-elettrodu u t-tul ta' l-elettrodu espost taht il-*crocodile clips* jidhru fil-Figura 1. Il-klipp ta' ġewwa (ohxon) ta' l-elettrodu jitqiegħed fuq il-wiċċ tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-resistenza, biex ikun żgurat li tul konsistenti ta' l-elettrodu huwa mdahħal fis-soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju. L-elettrodu ta' barra (irqiq) huwa mqiegħed ġewwa l-kamra riċeventi biex isserrah fuq il-qiegħ. Id-distanza bejn il-qiegħ tal-klipp bil-molla u l-qiegħ tat-tubu PTFE jinżamm bhala kostanti (Figura 1), billi din id-distanza taffettwa l-valur tar-resistenza miksuba.

Innota li jekk il-valur tar-resistenza mkejla huwa akbar minn 20 kΩ dan jista' jkun minhabba li s-sustanza tal-prova tiksi l-wiċċ epidermiku tad-diska tal-ġilda. It-tneħħija ta' din il-kisja tista' tkun ippruvata, per eżempju, bl-issigillar tat-tubu PTFE b'behem gwantat imcaqlaq għal madwar 10 sekondi; is-soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju titneħħa u l-kejl tar-resistenza tiġi ripetuta b'sulfat tal-manjeżju ġdid.

Ir-rizultati TER medji huma aċċettati bil-kondizzjoni li valuri tal-kontroll pożittivi u negattivi jaqgħu fil-meded aċċettabbli għall-metodu. Is-sustanzi tal-kontroll issuġġeriti u l-meded ta' resistenza assoċjati aċċettabbli għall-metodoloġija u l-apparat deskritt huma:

Kontroll	Sustanza	Medda ta' resistenza (KΩ)
Pożittiv	10 M aċtu idrokloriku (36 %)	0,5-1,0
Negattiv	Ilma distillat	10-25

1.5.3.3. Proċedura modifikata għall-agenti tensioattivi u organiċi newtri

Jekk il-valuri TER tas-sustanzi tal-prova li huma jew agenti tensioattivi u organiċi newtri huma anqas minn jew daqs 5 kΩ tista' ssir valutazzjoni ta' kemm ippenetra l-kulur fuq it-tessuti. Din il-proċedura għandha tiddetermina jekk ir-rizultati huma pożittivi foloz (2).

1.5.3.3.1. Applikazzjoni tal-kulur *Sulforhodamine B* u tneħħija

Wara t-trattament tal-bidu bis-sustanza tal-prova, 150 µl ta 10 % (w/v) hija applikata dilwizzjoni ta' kulur *sulforhodamine B* filma distillat lill-wiċċ epidermiku ta' kull diska tal-ġilda għal sagħtejn. Id-diski tal-ġilda huma mbagħad maħsula b'ġett ta' l-ilma sat-temperatura ambjentali għal madwar 10 sekondi biex jitneħħa l-kulur fl-eċċess/li ma jkunx qabad. Kull diska tal-ġilda titneħħa b'attenzjoni mit-tubu PTFE u titpogġa f'kunjett (eż kunjett tal-ħġieg xintillanti) li jkollu ilma dejonizzat (8 ml). Il-kunjetti jithawdu bil-mod għall-5 minuti biex jitneħħa l-kulur fl-eċċess/li ma jkunx qabad. Il-proċedura tat-tlahliħ hija mbagħad imtennija, u wara dan id-diski tal-ġilda jitneħħew u jitpogġew f'kunjetti li jkollhom 5 ml ta' 30 (w/v) sulfat tas-sodju *dodecyl* (SDS) fl-ilma distillat u huma inkubati mal-lejl f'60° C. Wara l-inkubazzjoni, kull diska tal-ġilda titneħħa u titwarrab u s-soluzzjoni li jifdal hija ċentrifugata għal 8 minuti f'21° C (forza ċentrifuga ġsim h 175). Kampjun ta' 1 ml tas-supernatant huwa mbagħad mħallat 1 f'5 (v/v) (jiġifieri 1 ml + 4 ml) ma' 30 % (w/v) SDS filma distillat. Id-densità ottika (OD) tas-soluzzjoni hija mkejla f'madwar 565 nm),

1.5.3.3.2. Kalkolu tal-kontenut tal-kulur

Il-kontenut tal-kulur *sulforhodamine B* kull diska huwa kkalkolat mill-valuri OD (koeffiċjent molari kulur *sulforhodamine B* f'565 nm = $8,77 \times 10^4$; piż molekolari = 580). Il-kontenut tal-kulur *sulforhodamine B* huwa ddeterminat għal kull diska tal-ġilda u kontenut tal-kulur medju huwa mbagħad ikkalkolat għar-replikati. Ir-rizultati tal-kulur medji huma aċċettati bil-kondizzjoni li valuri tal-kontroll konkurrenti jaqgħu fil-meded aċċettabbli għall-metodu. Il-meded tal-kontenut tal-kulur suġġeriti aċċettabbli għas-sustanzi ta' kontroll għall-metodoloġija u l-apparat deskritt huma:

Kontroll	Sustanza	Medda tal-kontenut tal-kulur (µg/diska)
Pozittiv	10 M aċtu idrokloriku (36 %)	40-100
Negattiv	Ilma distillat	15-35

1.5.3.4. Informazzjoni addizzjonali

Sustanzi tal-prova jistgħu jkunu applikati wkoll lid-diski tal-ġilda għall-perjodi aqsar (eż sagħtejn) biex ikunu identifikati dawk il-materjali li huma korrużivi severament. Izda, fl-istudju ta' validazzjoni, il-prova TER instabet li stmat iżżejjed il-potenzjal korrużiv ta' diversi kimiċi tal-prova wara l-applikazzjoni tagħhom lid-diski tal-ġilda għal sagħtejn (2), għalkemm ippermettiet l-identifikazzjoni korretta tal-korrużivi u dawk li m'humiex wara applikazzjoni ta' 24 siegħa.

Il-proprietajiet u d-dimensjonijiet ta' l-apparat tal-prova u l-proċedura sperimentali użata tista' tinfluwenza l-valuri TER miksuba. Il-limitu korrużiv 5 k Ω kien żviluppat minn data miksuba b'apparat speċifiku u l-proċedura deskritta f'dan il-metodu. Valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jistgħu japplikaw jekk il-kondizzjonijiet tal-prova jitbiddu b'mod sinifikanti. Għalhekk, huwa rakkomandat li l-metodoloġija u l-valur tal-limitu tr-resistenza huma kalibrati billi jkunu pruvati serje ta' standards magħżula mill-kimiċi użati fl-istudju tal-validazzjoni (3).

1.6. **Prinċipju tal-metodu tal-prova – prova tal-mudell tal-ġilda tal-bniedem**

Il-materjal ta' prova huwa applikat topikament sa mhux iżjed minn 4 siegħat lill-mudell tal-ġilda tridimensjonali, li jikkompreni epidermini rikostruwita bi strat korneju funzjonali. Materjali korrużivi huma identifikati bl-abbiltà tagħhom li jipproduċu tnaqqis fil-vitalità taċ-ċellula (kif determinat, per eżempju, bl-użu tal-prova ta' tnaqqis MTT) taht il-livelli tal-limitu definiti f'perjodi speċifikati ta' espożizzjoni. Il-prinċipju tal-prova huwa skond l-ipotesi li kimiċi li huma korrużivi huma dawk li jistgħu jippenetraw l-istrat korneju (bid-diffużjoni jew l-erożjoni) u huma biżżejjed ċitotossici biex jikkawżaw il-mewt taċ-ċelloli fis-saffi taċ-ċelloli ta' taht.

1.7. **Deskrizzjoni tal-metodu tal-prova – prova tal-mudell tal-ġilda tal-bniedem**

1.7.1. *Mudelli tal-ġilda tal-bniedem*

Il-mudelli tal-ġilda tal-bniedem jistgħu jiġu minn diversi sorsi, imma għandhom iharsu ċerti kriterji. Il-mudell għandu jkollu strat korneju funzjonali b'saff taht ta' ċelloli hajjin. Il-funzjoni protettiva ta' l-istrat korneju għandha tkun adegwata. Dan jista' jintwera billi tkun spjegata r-resistenza tal-mudell għaċ-ċitotossicità wara l-applikazzjoni tas-sustanzi li huma magħrufa li huma ċitotossici għaċ-ċelloli, imma li normalment jgħaddu mill-istrat korneju. Il-mudell għandu jintwera li jagħti riżultati riproducibbli taht kondizzjonijiet sperimentali definiti.

Il-vitalità ta' ċelloli hajjin fil-mudell għandha tkun għolja biżżejjed li tiddiskrimina sewwa bejn is-sustanzi ta' kontroll pozittivi u negattivi. Il-vitalità taċ-ċellula (per eżempju, kif imkejla bl-ammont ta' tnaqqis MTT, jiġifieri valur OD) wara l-espożizzjoni għal sustanzi ta' kontroll negattivi għandhom jaqgħu flim投资i aċċettabbli għall-mudell partikolari. Similment, il-valuri tal-vitalità taċ-ċellola mas-sustanza tal-kontroll pozittiv (fir-rigward ta' dawk għall-kontroll negattiv) għandhom jaqgħu fil-limiti speċifiċi. Aktar importanti, il-mudell ta' tbassir użat għandu jintwera li jhares l-istandard ta' validazzjoni internazzjonali (2).

1.7.2. *Proċedura tal-prova*

1.7.2.1. *Applikazzjoni tal-materjal tal-prova*

Għall-materjali likwidi, għandha tkun applikata sustanza tal-prova suffiċjenti biex tgħatti l-wiċċ tal-ġilda (minimu ta' 25 µl/cm²). Għall-materjali solidi, għandha tkun applikata sustanza tal-prova suffiċjenti mal-ġilda, imbagħad għandha tixxarrab biex tiżgura kuntatt tajjeb mal-ġilda; fejn xieraq, is-solidi għandhom jintahnu fi trab qabel l-applikazzjoni. Il-metodu ta' applikazzjoni għandu jintwera li jkun biżżejjed għal firxa kbira ta' tipi kimiċi (2). Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-materjal tal-prova għandu jkun mahsul b'attenzjoni mill-wiċċ tal-ġilda b'soluzzjoni salina.

1.7.2.2. *Kejl tal-vitalità taċ-ċellula*

Kull metodu kwantitattiv, validat jista' jintuza biex ikejjel il-vitalità taċ-ċellula. Il-prova użata l-aktar spiss hija tnaqqis MTT, li ntweriet li tagħti riżultati preċiżi u riproducibbli f'diversi laboratorji (2). Id-diska tal-ġilda hija mpogġija f'soluzzjoni MTT ta' 0,3 mg/ml f'20-28°C għal tliet siegħat Il-prodott preċipitat ikhal formazan huwa mbagħad estratt (estrazzjoni tas-solvent) u l-koncentrazzjoni tal-formazan hija mkejla bid-determinazzjoni ta' l-OD f'wavelength bejn 545 u 595 nm.

1.7.2.3. Informazzjoni addizzjonali

Il-mudell tal-ġilda użat, u l-protokoll eżatt tal-hin ta' l-espożizzjoni u l-proċeduri ta' hasil, eċċ. għandhom ikollhom impatt maġġuri fuq ir-riżultati tal-vitalità taċ-ċellola. Huwa rakkomandat li l-metodoloġija u l-mudell ta' tbassir huma kalibrati bil-prova ta' serje ta' standards ta' referenza magħżula mill-kimiċi użati fl-istadju tal-validazzjoni tal-ECVAM (3). Huwa kritiku li l-metodu użat intwera li huwa riproduċibbli ġewwa u bejn laboratorji għal firxa kbira ta' kimiċi, skond l-istandards internazzjonali. Bħala minimu, il-metodu għandu jhares il-kriterji għall-validità xjentifika definiti qabel (2), u r-riżultati ta' dan l-istudju ta' validazzjoni għandu jkun ippubblikat f'ġurnal xjentifiku rivedut qalb pari.

2. DATA

2.1. Trattament tar-riżultati

2.1.1. Prova TER fuq il-ġilda tal-far

Valuri ta' resistenza (kΩ) għall-materjal tal-prova, kontrolli pożittivi u negattivi, u kull kimika standard ta' referenza għandhom ikunu rapportati f'forma tabulata, inkluż data għall-esperimenti replikati/ripetuti, valuri medji u l-klassifikazzjoni derivata.

2.1.2. Mudelli tal-ġilda tal-bniedem

Valuri OD u data tal-perċentwal kalkolat fuq il-vitalità taċ-ċellula għall-materjal tal-prova, kontrolli pożittivi u negattivi, u kull kimika standard ta' referenza għandhom ikunu rapportati f'forma tabulata, inkluż data għall-esperimenti replikati/ripetuti, valuri medji u l-klassifikazzjoni derivata.

2.2. Valutazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

2.2.1. Prova TER fuq il-ġilda tal-far

Jekk il-valur medju TER miksub għas-sustanza tal-prova huwa akbar minn 5 kΩ mela mhux korrużiva. Jekk il-valur TER huwa anqas minn jew ugwali għal 5 kΩ u s-sustanza tal-prova mhux *surfactant* jew organiku newtru, mela hija korrużiva.

Għas-*surfactants* jew organiċi newtri li jagħtu valuri TER anqas minn jew daqs 5 kΩ tista' ssir il-penetrazzjoni tal-kulur. Jekk il-kontenut tal-kulur medju tad-diska huwa akbar minn jew daqs il-kontenut medju tad-diska tas-36 % HCl kontroll pożittiv miksub konkorentement, mela s-sustanza tal-prova hija pożittiva vera u għalhekk korrużiva. Jekk il-kontenut medju tal-kulur tad-diska huwa anqas mill-kontenut medju tad-diska tas-36 % HCl kontroll pożittiv miksub konkorentement, mela s-sustanza tal-prova hija pożittiva falza u għalhekk mhux korrużiva.

2.2.2. Prova tal-mudell tal-ġilda tal-bniedem

Il-valur OD ta' kontroll negattiv jirrappreżenta 100 % tal-vitalità taċ-ċellola; għalhekk, il-valuri OD miksuba għal kull kampjun tal-prova jista' jintuża biex ikun kalkolat il-perċentwal tal-vitalità relattiva għall-kontroll negattiv. Il-perċentwal kritiku tal-valur tal-vitalità taċ-ċellola jiddistingwi materjali tal-prova korrużivi minn dawk li m'humiex (jew jiddiskrimina bejn klassijiet differenti korrużivi) għandu jkun definit b'mod ċar fil-mudell ta' tbassir qabel ma l-metodu ikun validat, u l-istudju ta' validazzjoni sussegwenti għandu juri li l-valur kritiku huwa xieraq (2).

3. RAPPORTAĠĠ

Rapport tal-prova

Ir-rapport tal-prova għandu mill-inqas ikollha t-tagħrif li ġej:

Sustanza tal-prova:

- data ta' identifikazzjoni, natura fiżika u, meta rilevanti, propjetajiet fizikokimiċi. Informazzjoni simili għandha tkun ipprovduta għall-sustanzi ta' referenza, jekk użati.

Kondizzjonijiet tal-prova:

- dettalji tal-proċedura tal-prova użata,
- deskrizzjoni u ġustifikazzjoni ta' kull modifika.

Riżultati:

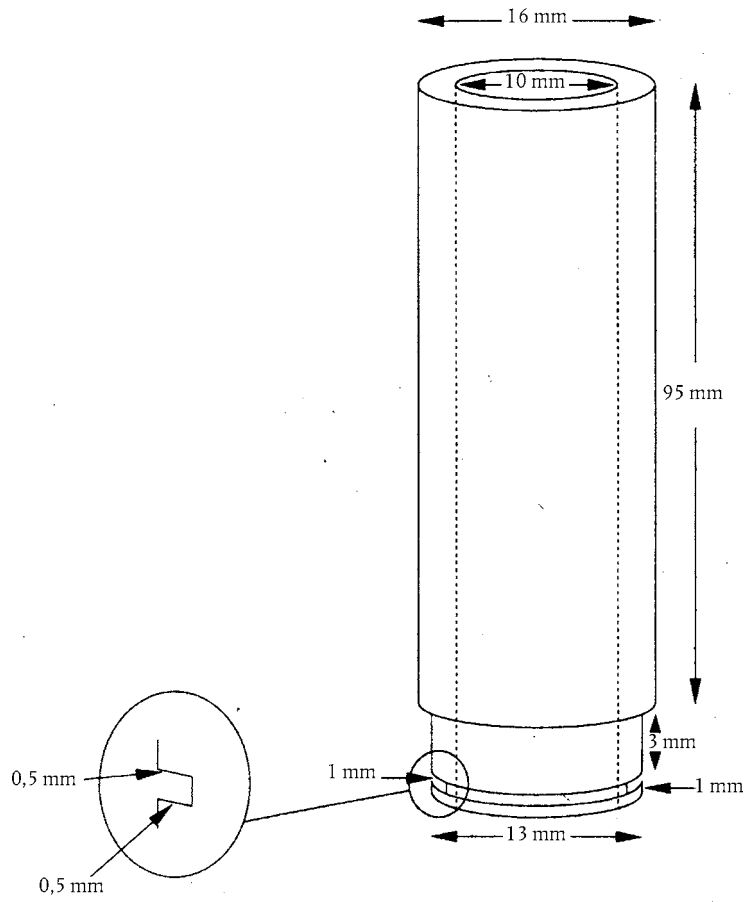
- tabulazzjoni ta' valuri ta' resistenza (prova TER) jew valuri tal-percentwal tal-vitalità taċ-ċellola (prova tal-mudell tal-ġilda tal-bniedem) għall-materjal tal-prova, kontrolli pożittivi u negattivi u kull kimika ta' riferenza standard, inkluż data għal sperimenti replikati/ripetuti u valuri medji,
- deskrizzjoni ta' kull effett iehor osservat.

Diskussjoni tar-riżultati:**Konklużjonijiet.****4.****RIFERENZI**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, pp. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, Toxicology in Vitro 12, pp. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An in vitro skin corrosivity test - modifications and validation, Food & Chemical Toxicology 24, pp. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial, Toxicology in Vitro 6, pp. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA 26, pp. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. Ir-rapport u r-rakkomandazzjonijiet tal-workshop ECVAM 6, ATLA 23, pp. 219-255.

Figure 1

Dimensjonijiet tat-tubu PTFE



Dimensjonijiet ta' l-elettrodu

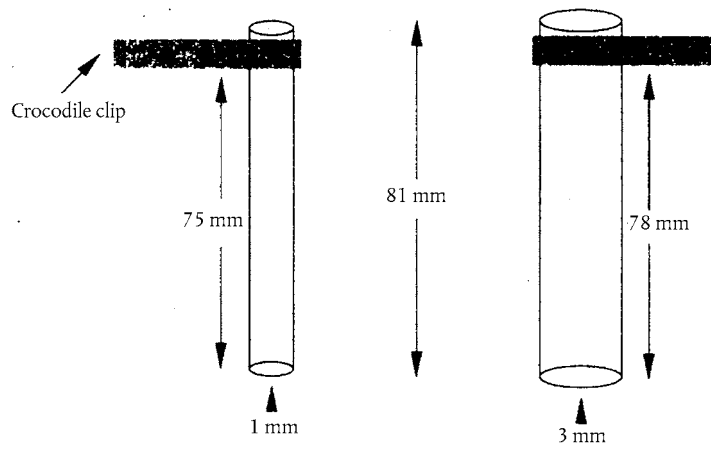
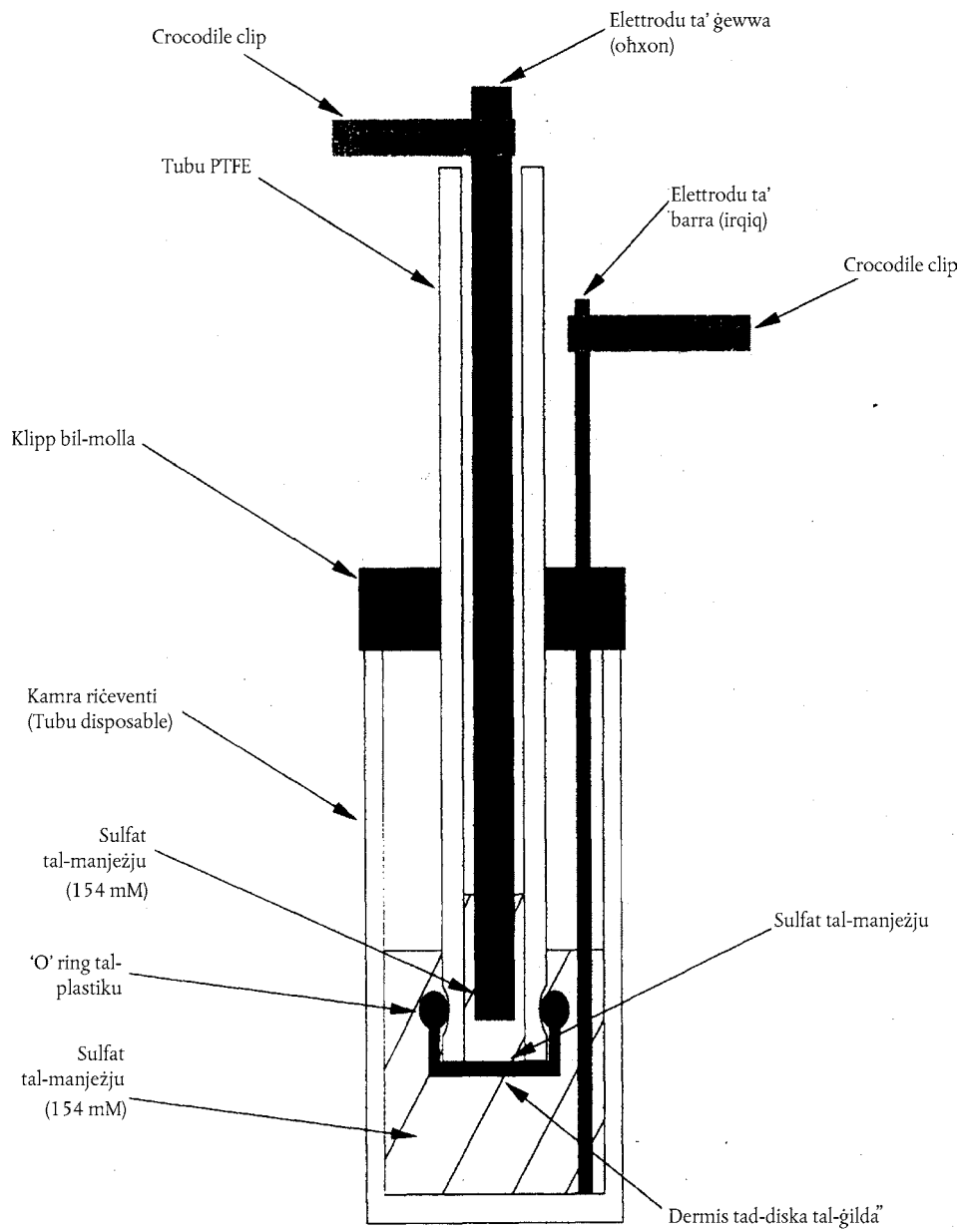


Figure 2

Apparat għall-prova TER tal-[ilda tal-far



ANNEX II

"B.41. FOTOTOSSICITÀ – PROVA *IN VITRO* 3T3 NRU TAL PROVA TAT-TOSSICITÀ1. **METODU**1.1. **Introduzzjoni**

Il-fototossicità hija definita bħala rispons tossiku li jiġi wara l-ewwel espożizzjoni tal-ġilda ma' ċerti kimiċi u l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew hija indotta similmint bl-irradjazzjoni tal-ġilda wara l-amministrazzjoni sistemika ta' kimika.

Informazzjoni miġjuba mill-prova ta' tossicità *in vitro* 3T3 NRU isservi biex tidentifika l-potenzjal fototossiku ta' sustanza tal-prova, jiġifieri l-eżistenza jew in-nuqqas ta' perikoli possibbli li x'aktarx jinqalghu minn sustanza ta' prova flimkien ma' l-espożizzjoni għall-UV u dawl visibbli.

Billi l-punt finali tossikoloġiku tal-prova *in vitro* hija d-determinazzjoni tal-fototossicità, indotta bl-azzjoni kombinata ta' kimika u d-dawl, komposti li huma fototossiċi *in vivo* wara l-applikazzjoni sistemika u d-distribuzzjoni mal-ġilda, kif ukoll komposti li jaġixxu bħala fotoirritanti wara applikazzjoni topika mal-ġilda, jista' jkun identifikat bil-prova.

Il-prova *in vitro* 3T3 NRU kienet żviluppata u validata f'proġett konġunt EU/COLIPA mill-1992-1997 (1) (2) (3), biex tkun stabbilita alternattiva valida *in vitro* għad-diversi provi *in vivo* użati. Fl-1996 workshop ta' l-OECD irrakkomanda prova sekwenzjali *in vitro* għall-valutazzjoni tal-fototossicità (4).

Riżultati mill-prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU meta paragonati ma' effetti akuti *in vivo* ta' fototossicità/fotoirritazzjoni fl-animali u l-bnedmin, u l-prova ntweriet li tagħti tbassir eċċellenti għal dawn l-effetti. Il-prova mhux infassla li tbassar effetti oħra hżiena li jistgħu jinqalghu mill-azzjoni maqgħuda ta' kimika u dawl, eż fotogenotossicità, fotoallergija, u fotokancerogenicità, għalkemm hafna kimiċi li juru dawn il-proprjetajiet speċifiċi għandhom jirreaġixxu pożittivament fil-prova ta' fototossicità 3T3 NRU *in vitro*. Barra dan, il-prova mhix iddisinjata biex tippermetti stima tal-qawwa fototossika.

Approċċ sekwenzjali għall-prova fototossika tal-kimiċi huwa provdut fl-Appendiċi.

1.2. **Definizzjonijiet**

Irradjament: l-intensità ta' dawl ultravjola (UV) jew visibbli li jaqa' fuq wiċċ, imkejjel fW/m^2 jew mW/cm^2 .

Doża ta' dawl: il-kwantità (= intensità hin) ta' radjazzjoni ultravjola (UV) jew viżibbli li jaqa' fuq wiċċ, espress $fJoules$ (= $W \times s$) kull erja tal-wiċċ, eż UJ/m^2 jew Jcm^2 .

Wavebands tad-dawl UV: l-indikazzjonijiet rakkomandati mill-CIE (*Commission Internationale de L'Eclairage*) huma: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) u UVC (100-280 nm). Indikazzjonijiet oħra huma użati wkoll: id-diviżjoni bejn UVB u UVA titpoġġa ta' spiss $f320nm$, u l-UVA tista' tiqasam f'UV-A1 u UV-A2 b'diviżjoni magħmula $f320 nm$.

Vitalità taċ-ċellola parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni taċ-ċelloli (eż. tehid tal-kultur vitali aħmar newtru fil-lisożomi ċellulari) li, waqt li jiddependi fuq il-punt tat-tmim mkejjel u d-disinn tal-prova użata, jikkorrelata man-numru totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

Vitalità relattiva taċ-ċellola vitalità espressa fir-rigward ta' kontrolli negattivi (solventi) li għaddew matul il-proċedura shiha tal-prova (jew + UV jew - UV), imma mhux trattati b'kimika ta' prova.

Mudell ta' tbassir: algoritmu użat biex ikunu trasformati r-riżultati tal-prova tat-tossicità f'tbassir tal-potenzjal tossiku. Fil-linja ta' gwida preżenti tal-prova, PIF u MPE jistgħu jintużaw għat-trasformazzjoni tar-riżultati tal-prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU fi tbassir ta' potenzjal fototossiku.

PIF (fattur ta' irritazzjoni tad-dawl) fattur ġenerat billi jkunu paragonati żewġ konċentrazzjonijiet ċitotossiċi ugwalment effettivi (EC50) tal-prova kimika miksuba fin-nuqqas (-UV) u fil-presenza (+ UV) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika bid-dawl UVA/vis.

MPE (effett medju tad-dawl) mizura ġdida misluta minn analiżi matematika tal-forma kompleta ta' żewġ kurvi ta' risposta ta' konċentrazzjoni miksuba fin-nuqqas (-UV) u fil-presenza (+ UV) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika bid-dawl UVA/vis.

Fototossicità: Il-fototossicità hija definita bħala rispons tossiku li jiġi wara l-ewwel espożizzjoni tal-ġilda għal ċerti kimiċi u l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew hija indotta similmment bl-irradjazzjoni tal-ġilda wara l-amministrazzjoni sistemika ta' kimika.

Fotoirritazzjoni subspeċi tal-kelma 'fototossicità', li hija użata biex tiddekrivi biss dawk ir-reazzjonijiet fototossiċi li huma prodotti fil-ġilda wara l-espożizzjoni għall-kimiċi (topikament jew oralment). Dawn ir-reazzjonijiet fototossiċi jwasslu għall-ħsara mhux speċifika taċ-ċellola (reazzjonijiet bħal hruq mix-xemx).

Fotoallergija: reattività immunoloġika miksuba, li ma sseħx fl-ewwel trattament bil-kimika u d-dawl, u għandha bżonn ta' perjodu ta' induzzjoni ta' ġimgha jew ġimghatejn qabel ma tidher ir-reattività tal-ġilda.

Fotogenotossicità: risposta ġenotossika osservata b'punt finali ġenetiku, li tiġri wara l-espożizzjoni taċ-ċelloli għal doża mhux ġenotossika ta' dawl UV/viżibbli u kimika mhux ġenotossika.

Fotokancerinoġenicità: kancerinoġenicità indotta bl-applikazzjoni ripetuta ta' dawl u kimika. Il-kliem 'foto ko-kancerinoġenicità', huwa użat jekk it-tumorigenesi indotta bl-UV tiżdied b'kimika.

1.3. **Sustanzi ta' riferenza**

Minbarra l-kimika ta' kontroll pożittiv *chlorpromazine* li għandha tkun ipprovata konkorentement f'kull prova, biex tkun stabbilita l-prova ta' fototossicità 3T3 NRU huwa rakkomandat li jintużaw bħala kimiċi ta' referenza subsett mill-kimiċi użati fil-provi tal-laboratorju bil-prova prezenti (1) (3) (13).

1.4. **Konsiderazzjonijiet inizjali**

Hafna tipi ta' kimiċi ġew irrapportati li jinduċu effetti fototossiċi (5) (6) (7) (8). L-unika karatteristika komuni hija l-abbiltà tagħhom li jassorbu l-enerġija fir-reġjun tad-dawl tax-xemx. Skond l-ewwel liġi tal-fotokimika (liġi Grotthaus-Draper) il-fotoreazzjoni teħtieġ assorbiment biżżejjed ta' kwanta tad-dawl. Għalhekk, qabel ma tkun kkunsidrata l-prova bijoloġika skond il-linja ta' gwida prezenti tal-prova, għandu jkun determinat l-ispettru ta' l-assorbiment UV/vis tal-kimika tal-prova (eż. skond il-Prova Linja ta' Gwida OECD 101). Jekk il-koeffiċjent ta' l-estinzjoni/assorbiment huwa anqas minn 10 litri \times mol⁻¹ \times cm⁻¹, il-kimika ma għandha l-ebda potenzjal fotoreattiv u m'għandhiex għalfejn tkun provata fil-prova tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU jew kull prova bijoloġika oħra għall-effetti ħżiena fotokimiċi (Appendiċi).

1.5. **Prinċipju tal-metodu tal-prova**

Erba' mekkanizmi ġew identifikati li bihom l-assorbiment tad-dawl b'kromofor (kimiku) jista' jirriżulta f'risposta fototossika (7). Kollha kemm huma jirriżultaw fi ħsara fiċ-ċellola. Għalhekk, il-prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU hija bbażata fuq paragun ta' ċitotossicità ta' kimika meta ppruvata fil-presenza u fl-assenza ta' espożizzjoni għal doża mhux ċitotossika ta' dawl UVA/vis. Iċ-ċitotossicità ta' din il-prova hija espressa bħala konċentrazzjoni li tiddependi fuq it-tnaqqis ta' l-assorbiment tal-kulur vitali ahmar newtrali (NR) (9) 24 siegħa wara t-trattament mal-kimika tal-prova u l-irradjazzjoni.

Ċelloli Balb/c 3T3 huma mantenuti fil-kultura għall 24 siegħa għall-formazzjoni tal-monostrati Żewġ 96-well plates kull test kimiku huwa mbagħad preinkubat b'tmien konċentrazzjonijiet differenti għal kimika għal 1 s. Imbagħad wahda miż-żewġ pjanċi hija esposta għal doża ta' dawl UVA/vis mhix ċitotossika ta' 5 J/cm² UVA (speriment + UV), waqt li l-pjanċa l-oħra tinzamm fid-dlam (speriment -UV). Fiż-żewġ pjanċi, il-mezz ta' trattament huwa mbagħad mibdul b'mezz ta' kultura u wara 24 s oħra ta' inkubazzjoni, tkun determinata l-vitalità taċ-ċellola bl-uptake newtrali ta' l-ahmar (NRU) għal 3 s. Il-vitalità relattiva taċ-ċellola, espressa bħala perċentwal tal-kontrolli negattivi mhux trattati, hija kkalkolata għal kull wieħed mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-prova. Biex jitbassar il-potenzjal fototossiku, ir-risposti tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza ta' (+ UV) u fin-nuqqas (-UV) ta' irradjazzjoni huma paragnati, is-soltu fil-livell EC50, jiġifieri fil-konċentrazzjoni ta' l-inibizzjoni tal-vitalità taċ-ċellola b'50 % cf ta' kontrolli mhux trattati.

1.6. **Kriterji ta' kwalità**

Sensittività UVA taċ-ċelloli, data storika: ċelloli għandhom ikunu verifikati regolarment għas-sensittività ta' l-UVA. Iċ-ċelloli huma miżrugħa fid-densità użata fil-prova tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU, irradjata l-ġurnata ta' wara b'dożi UVA minn 1-9 J/cm², u l-vitalità taċ-ċellola hija ddeterminata jum wara bl-użu tal-prova NRU. Iċ-ċelloli jilhqgħu l-kriterju tal-kwalità, jekk il-vitalità tagħhom wara l-irradjazzjoni b'5 J/cm² UVA mhux anqas minn 80 % tal-vitalità tal-kontrolli fid-dlam. Fl-ogħla doża UVA ta' 9 J/cm², il-vitalità m'għandhiex tkun anqas minn 50 % ta' dak ta' kontrolli fid-dlam. Din il-verifika għandha tkun ripetuta ma' kull għaxar (10) passagġi taċ-ċelloli.

Sensittività UVA taċ-ċelloli ta' kontroll negattiv, prova kurrenti: il-prova tissodisfa l-kriterji ta' kwalità jekk il-kontrolli negattivi (ċelloli fis-soluzjoni bilancjata Earl (EBSS) b'1 % *dimethylsulfoxide* (DMSO) jew mingħajrha jew 1 % etanol (EtOH)) fl-esperiment + UVA juru vitalità ta' mhux anqas minn 80 % ta' dak ta' ċelloli mhux irradjati fl-istess solvent ta' l-esperiment konkorenti fid-dlam (-UVA).

Vitalità ta' kontrolli negattivi: id-densità assoluta ottika (OD540 NRU) mkejla fl-estratt NR tal-kontrolli negattivi tindika jekk il-1 × 104 ċelloli miżrugħa kull bir ikunu kibru biż-żmien normali irduppjat matul il-jumejn ta' prova. Prova tilhaq il-kriterji ta' aċċettazzjoni jekk il-medja OD540 NRU ta' kontrolli mhux trattati hi > = 0,2.

Kontroll pożittiv: kimika maghrufa fototossika għandha tkun pruvata flimkien ma kull prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU. Il-*chlorpromazine* (CPZ) intużat bhala kontroll pożittiv fl-istudju ta' validazzjoni EU/COLIPA u għalhekk hija rakkomandata. Għal CPZ eżaminata bil-protokoll standard fil-prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU, kienu definiti l-kriterji ta' l-aċċettazzjoni tal-prova li ġejjin: CPZ irradjata (+ UVA): EC50 = 0,1 to 2,0 µg/ml, CPZ mhux irradjata (- UVA): EC50 = 7,0 to 90,0 µg/ml. Il-fattur ta' foto irradjazzjoni (PIF), jiġifieri l-ispostament ta' EC50 għandu jkun ta' l-anqas 6.

Kimiki oħra fototossiċi maghrufa, xierqa għall-klassi kimika jew karatteristiċi ta' solubilità tal-kimika tal-prova li qed tkun valutata, jistgħu jintużaw bhala l-kontrolli pożittivi konkorenti, minflok CPZ. F'dan il-każ, ibbażat fuq id-data storici, il-meded tal-valuri EC50 u PIF jew MPE (effett tad-dawl medju) għandhom ikunu definiti b'mod xieraq bhala kriterji ta' aċċettazzjoni għall-prova.

1.7. Deskrizzjoni tal-metodu tal-prova

1.7.1. Preparazzjonijiet

1.7.1.1. Ċelloli

Linja permanenti ta' ċelloli fibroblastiċi tal-ġurdien - Balb/c 3T3, klonu 31 – jew minn ATCC jew minn ECACC intużat fl-istudju ta' validazzjoni, u huwa għalhekk rakkomandat. Ċelloli oħra jew linji taċ-ċelloli jistgħu jintużaw b'suċċess ma' l-istess protokoll tal-prova, jekk il-kondizzjonijiet tal-kultura huma addattati għall-bżonnijiet speċifiċi taċ-ċelloli, imma trid tintwera l-ekwivalenza.

Iċ-ċelloli għandhom ikunu vverifikati regolarment għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni mikroplasma u għandha tintuża biss jekk ir-risultati ta' din il-verifika kienu sodisfaċenti.

Billi s-sensittività UVA taċ-ċelloli tista' tiżdied b'numru ta' passaġġi, ċelloli Balb/c 3T3 ta' l-iżgħar numru li jista' jinkiseb ta' passaġġ għandhom jintużaw, l-aħjar anqas minn 100. Huwa importanti li s-sensittività UVA taċ-ċelloli Balb/c 3T3 hija vverifikata regolarment skond il-proċedura tal-kontroll ta' kwalità deskritta f'din il-gwida.

1.7.1.2. Kondizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultura

Għandhom jintużaw għall-passaġġ taċ-ċellola ta' rutina u l-proċedura tal-prova kondizzjonijiet xierqa tal-mezzi tal-kultura u ta' inkubazzjoni. Għal ċelloli BalB/c 3T3, dawn huma miżjuda b'DMEM b'10 % ta' seru ta' għoġol għadu jitwieled, 4nM glutamina, penicillina u *streptomycin*; u inkubazzjoni umidifikata f'37 °C/7,5 % CO₂. Huwa partikolarment importanti li l-kondizzjonijiet tal-kultura taċ-ċelloli jiżguraw żmien taċ-ċiklu taċ-ċellola fil-medda normali storika taċ-ċelloli jew linja ta' ċelloli użati.

1.7.1.3. Preparazzjonijiet tal-kulturi

Ċelloli minn kulturi ta' stokk iffrizat huma miżrugħa fil-mezz tal-kultura fid-densità xierqa u subkoltivati ta' l-anqas darba qabel ma jintużaw fil-prova *in vitro* 3T3 NRU ta' fototossicità.

Għall-prova ta' fototossicità jinżerghu ċelloli fil-mezz tal-kultura f'densità tali li l-kulturi ma jilhqx il-konfluwenza fi tmien il-prova, jiġifieri meta l-vitalità taċ-ċellola hija determinata 48 s wara li jinżerghu ċ-ċelloli. Għal ċelloli Balb/c 3T3 imkabbra f'96-well plates, 1 × 104 ċellola kull bir hija d-densità rakkomandata taċ-ċellola.

Għal kull kimika ta' prova, ċelloli miżrugħa identikament f'zewġ 96-well plates separati, li huma mbagħad meħuda konkorentement fil-proċedura shiha tal-prova taht kondizzjonijiet tal-kultura identici, hliet għall-perjodu taż-żmien meta wahda mill-pjanci hija irradjata (+ UVA/vis) u l-oħra tinzamm fid-dlam (-UVA/vis).

1.7.1.4. Attivazzjoni metabolika

Billi l-użu ta' sistemi metabolizzanti hija hteġa ġenerali għall-provi kollha *in vitro* għat-tbassir tal-potenzjal ġenotossiku u karċinoġeniku, s'issa, fil-każ ta' fototossikoloġġja, l-ebda kimika m'hija maghrufa li għaliha tenhtieg it-trasformazzjoni metabolika għall-kimika biex taġixxi bhala fototossina *in vivo* jew *in vitro*. Għalhekk, mhux mitqies la mehtieg u lanqas xjentifikament ġustifikat għall-prova preżenti li ssir b'sistema metabolika ta' attivazzjoni.

1.7.1.5. Kimika tal-prova/preparazzjoni

Kimika tal-prova għandhom ikunu ppreparati friski minnufih qabel l-użu, sakemm id-data ta' stabbiltà turi l-aċċettabiltà tal-ħażna. Il-preparazzjoni taht dawl ahmar jista' jenhtieg meta x'aktar tista' tigri malajr il-fotodegradazzjoni.

Il-kimiki tal-prova għandhom jiddewbu f'soluzzjonijiet tal-melħ *buffered*, eż soluzzjoni bilanċjata Earl, (EBSS) jew *phosphate buffered saline* (PBS), li, biex ma jkunx hemm interferenza waqt l-irradjazzjoni, għandha tkun hielsa minn komponenti tal-proteina u kuluri ta' indikatur ph li jassorbu d-dawl.

Kimiki tal-prova ta' solubiltà limitata fl-ilma għandhom jiddewbu f'solventi xierqa fil-konċentrazzjoni finali mixtieqa għal 100 darba u mbagħad dilwita 1:100 bis-soluzzjoni tal-melħ *buffered*. Jekk jintuża solvent għandu jkun preżenti f'volum kostanti ta' 1 % (v/v) fil-kulturi kollha, jiġifieri fil-kontrolli negattivi kif ukoll fil-konċentrazzjonijiet kollha tal-kimika tal-prova.

Id-*dimethylsulphoxide* (DMSO) u l-etanol (EtOH) huma s-solventi rakkomandati. Jistgħu jkunu xierqa solventi oħra ta' tossiċità baxxa (eż *acetone*), imma għandhom ikunu valutati bir-reqqa għal proprjetajiet speċifiċi, eż reazzjoni mal-kimika tal-prova, l-estinjoni ta' l-effett fototossiku, u l-proprjetajiet tal-qabda tar-radikali.

Jistgħu jintużaw taħlit tal-vortex u/jew sonikazzjoni u/jew tishin sa 37 °C, jekk meħtieġ, biex tgħin is-solubilizzazzjoni.

1.7.1.6. Irradjazzjoni/Preparazzjoni UV

Sors tad-dawl: l-għażla ta' sors tad-dawl xieraq u filtru xieraq huwa l-aktar fattur xieraq fil-prova ta' tossiċità. Reġjuni UVA u visibbli huma solitament assoċjati mal-fotosensitizzazzjoni (7) (10), waqt li UVB hija ta' anqas rilevanza u hija direttament ċitotossika hafna, u żżid iċ-ċitotossicità tagħha 1 000 darba minn 313 sa 280 nm (11). Il-kriterji għall-għażla ta' sors ta' dawl xieraq għandhom jinkludu l-htieġa essenżjali li s-sors tad-dawl jemetti *wavelengths* assorbiti mit-test kimiku u li d-doża tad-dawl (li tista' tintlahaq fi żmien raġonevoli) għandha tkun biżżejjed għal kxif ta' fotosensibilizzanti magħrufa. Barra dan, il-*wavelengths* u d-doži użati m'għandhomx ikunu ta' ħsara żejda għas-sistema tal-prova, li tinkludi l-emissjoni ta' sħana (reġjun infra ahmar).

Is-simulazzjoni tad-dawl tax-xemx b'simulaturi solari hija kkunsidrata l-aħjar sors tad-dawl. Kemm *Xenon arcs* u (*doped mercury-metal halide*) huma użati fis-simulaturi solari. Ta' l-aħjar għandhom il-vantaġġ li jemmettu anqas sħana u li huma orħos, imma t-tqabbil tagħhom mad-dawl tax-xemx mhux perfett. Billi s-simulaturi kollha solari jemmettu kwantitajiet sinifikanti ta' UVB, għandhom ikunu ffiltrati kif xieraq biex itaffu il-*wavelengths* UVB ċitotossiki hafna.

Għandu jintuża għall-prova ta' fototossicità *in vitro* 3T3 NRU spettru ta' irradjazzjoni Prattikament battal minn UVB (UVA:UVB ġsim h 1:20). Kien ippubblikat eżempju tat-tqassim ta' l-irradjazzjoni spettrali tas-simulatur solari ffiltrat użat fl-istudju ta' validazzjoni tal-prova tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU (3).

Dożimetrija: l-intensità tad-dawl (l-irradjazzjoni) għandha tkun ivverifikata regolament qabel kull prova ta' fototossicità, bl-użu ta' *meter broadband* UV xieraq. Il-UV *meter* għandu jkun ikkalibrat mas-sors. Il-funzjonament tal-UV-*meter* għandu jkun ivverifikat, u għal dan l-iskop, huwa rakkomandat l-użu tat-tieni UV *meter* ta' referenza ta' l-istess tip u l-istess kalibratura. Idealment, f'intervalli akbar, spettroradjometru għandu jintuża biex ikejjel l-irradjazzjoni spettrali tas-sors ta' dawl filtrat u biex tkun ivverifikata l-kalibrazzjoni tal-*broadband* UV-*meter*, imma dawn l-istrumenti jeħtieġu l-intervent ta' persuni speċjalizzati.

Doża ta' 5 J/cm² (UVA) kienet stabbilita fl-istudju ta' validazzjoni li mhux ċitotossika għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 u biżżejjed qawwija biex teċita anki kimiċi fototossiki dgħajfin. Biex jintlahaq 5 J/cm² f'perjodu ta' 50 min, l-irradjazzjoni għandha tkun aġġustata sa 1, 666 mW/cm². Jekk jintużaw linja ta' ċelloli jew sors ta' dawl differenti, id-doża UVA jista' jkollha bżonn ta' adattament hafif, bl-użu tal-kriterji li m'humiex ta' ħsara għaċ-ċelloli u biżżejjed biex jikxfu fototossini standard. Iz-żmien ta' l-espożizzjoni tad-dawl huwa kkalkolat b'dan il-mod:

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

1.7.2. Kondizzjonijiet tal-prova

Il-konċentrazzjoni massima ta' kimika tal-prova m'għandhiex taqbeż 100 µg/ml, billi l-kimiċi fototossiki kienu rilevati f'konċentrazzjonijiet aktar baxxi, billi f'konċentrazzjonijiet oghla tiżdied l-inċidenza ta' pożittivi foloz (tbassir żejjed). Il-pH ta' l-oghla konċentrazzjoni tal-kimika tal-prova għandu jkun il-medda ph sodisfaċenti: 6,5 - 7,8).

Il-meded ta' konċentrazzjonijiet ta' kimika eżaminata fil-preżenza (+ UVA) u fin-nuqqas ta' (- UVA) ta' dawl għandhom ikunu stabbiliti b'mod adegwat f'esperimenti ta' qabel magħmula apposta għalhekk. Il-medda u l-interċett ta' serje ta' konċentrazzjoni għandhom ikunu aġġustati b'tali mod li l-kurvi ta' konċentrazzjoni-rispons huma mseddqa biżżejjed bid-data sperimentali. Jehtieg li jintużaw serje ta' konċentrazzjoni ġeometrika (b'fattur kostanti ta' dilwizzjoni).

1.7.3. *Proċedura tal-prova* ⁽¹⁾

1.7.3.1. L-ewwel ġurnata

Ipprepara sospensjoni ta' ċellola ta' 1×10^5 ċelloli/ml f'mezz ta' kultura u u ferra' 100 μ l tal-mezz tal-kultura biss fil-bjar żgħar periferiċi ta' pjanċa ta' 96-well għall-mikrotitolazzjoni tal-kultura tat-tessut (= vojta). Fil-bjar żgħar li jifdal, ferra' 100 μ l ta' sospensjoni ta' ċellola ta' 1×10^5 ċelloli/ml (= 1×10^4 ċelloli/bir). Għal kull kimika tal-prova, ipprepara żewġ pjanċi: wahda biex tistabbilixxi ċ-ċitotossicità (-UVA), u l-oħra biex tkun stabbilita l-fototossicità (+ UVA).

Inkuba ċ-ċelloli għal 24 s (7,5 % CO₂, 37 °C) sakemm jiffurmaw monostrat semikonfluwenti. Dan il-perjodu ta' inkubazzjoni jippermetti għall-irkupru taċ-ċelloli u l-aderenza, għat-tkabbir esponenzjali.

1.7.3.2. It-tieni jum

Wara l-inkubazzjoni, ferra' l-mezz tal-kultura miċ-ċelloli u aħsel darbtejn 150 μ l EBSS/PBS kull bir. Żid 100 μ l ta' EBSS/PBS li jkollhom konċentrazzjoni xierqa tal-kimika tal-prova jew solvent biss (kontroll negattiv). Applika 8 konċentrazzjonijiet differenti tal-kimika tal-prova. Inkuba ċ-ċelloli b'kimika tal-prova fid-dlam għal 60 minuta (7,5 % CO₂, 37 °C).

Biex issir il-parti (+ UVA) tal-prova, irraddja ċ-ċelloli f'temperatura ambjentali ta' 50 minuta permezz ta' l-għatu tal-pjanċa 96-well b'1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Iuventila b'fann biex ma' thallix il-kondensazzjoni taht l-għatu. Żomm platti dduplikati (-UVA) f'temperatura ta' l-ambjent f'kaxxa mudlama għal 50 minuta (= UVA hin ta' espożizzjoni).

Ferra' s-soluzzjoni tal-prova u aħsel darbtejn b'150 μ l EBSS/PBS. Ibdel EBSS/PBS b'mezz ta' kultura u inkuba (7,5 % CO₂, 37 °C) matul il-lejl (18-22 h).

1.7.3.3. It-tielet ġurnata

Valutazzjoni mikroskopika

Eżamina ċ-ċelloli taht mikroskopju bil-kuntrastr tal-fazi. Irrekordja bidliet fil-morfologija taċ-ċelloli minhabba l-effetti ċitotossici tal-kimika tal-prova. Din il-verifika hija rakkomandata, biex teskludi l-iżbalji sperimentali, imma dawn ir-rekords m'humiex użati għall-valutazzjoni taċ-ċitotossicità jew tal-fototossicità.

Prova ta' l-assorbiment ta' l-aħmar newtrali

Aħsel iċ-ċelloli b'150 μ l imsahhan minn qabel EBSS/PBS. Nehhi s-soluzzjoni tal-hasil bit-taptip ġentili. Żid 100 μ l NR mezz u inkuba f'37 °C, f'atmosfera umidifikata ta' 7,5 % CO₂, għal 3 h.

Wara l-inkubazzjoni, ferra' l-mezz NR, u aħsel iċ-ċelloli b'150 μ l EBSS/PBS. Ferra' u bblottja għal kollox EBSS/PBS. iċ-ċentrifugazzjoni bil-pjanċa bil-maqlub hija fakoltattiva.

Żid eżattament 150 μ l NR soluzzjoni ta' estinzjoni (etanol/aċtu aċetiku ppreparati friski)

Ĉaqlaq malajr il-pjanċa tal-mikrotitolazzjoni għal 10 min, sakemm l-NR ikun estratt miċ-ċelloli u fformat soluzzjoni omogenea.

Kejjel id-densità ottika ta' l-estratt NR f'540 nm f'spettofotometru, bl-użu ta' vojta bħala riferenza. Issejvja d-data f'format tal-fajl xieraq (eż. ASCII) għall-analizi sussegwenti.

2. DATA

2.1. Kwalità u kwantità ta' data

Id-data għandhom jippermettu analiżi sinifikattiva tal-konċentrazzjoni-rispons miksub fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-UVA/vis irradjazzjoni. Jekk tinsab iċ-ċitotossicità, kemm il-medda ta' konċentrazzjoni u l-interċett ta' konċentrazzjonijiet individwali għandhom ikunu ffixati b'mod biex tippermetti li tidhol kurva għad-data sperimentali. Minhabba l-fatt li kimika ta' prova tista' ma tkunx ċitotossika sal-limitu definit tal-konċentrazzjoni ta' 100 µg/ml fl-esperiment fid-dlam (- UVA), imma tossika ħafna meta rradjata (+ UVA), il-medda tal-konċentrazzjoni li għandhom ikunu ppruvati fiż-żewġ partijiet ta' l-esperiment jistgħu jkunu differenti b'ordni ta' kobor biex iħarsu l-htieġa ta' data ta' kwalità adegwata. Jekk ma tinstab l-ebda ċitotossicità fiż-żewġ partijiet ta' l-esperiment (-UVA u + UVA), hija biżżejjed prova b'interċett kbir bejn id-dożi singoli sa l-ogħla konċentrazzjoni.

M'hemm l-ebda htieġa għall-verifika ta' riżultat ċar positiv billi l-esperiment ikun ripetut. Barra dan, riżultati ċari pożittivi m'għandhomx għalfejn ikunu vverifikati, sakemm il-kimika tal-prova kienet ipprovata f'konċentrazzjonijiet oghlja biżżejjed. F'dawn il-kazijiet, huwa biżżejjed esperiment wiehed ewlieni, appoġġjat minn esperiment preliminari tad-definizzjoni tal-medda.

Provi li taw riżultati li bilkemm jintgħarfu wiehed minn iehor qrib il-linja ta' demarkazzjoni tal-mudell ta' tbassir għandhom ikunu ripetuti għall-verifika.

Jekk jitqies meħtieġ li l-provi għandhom ikunu mtennija, għalhekk il-varjazzjoni tal-kondizzjonijiet sperimentali jistgħu jkunu importanti biex jintlahaq riżultat ċar. Varjabbli fundamentali f'din il-prova hija l-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet tal-kimika tal-prova. Għalhekk, il-varjazzjoni ta' dawn il-kondizzjonijiet (ko-solvent, triturazzjoni u sonikazzjoni) jistgħu jkunu l-aktar rilevanti ripetizzjoni tal-prova. Alternattivament, tista' tkun ikkunsidrata l-varjazzjoni taż-żmien ta' l-inkubazzjoni ta' qabel l-irradjazzjoni. Jista' jkun rilevanti żmien aqsar għall-kimiċi li m'humix stabbli fl-ilma.

2.2. Trattament tar-riżultati

Meta possibbli, tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni ta' kimika tal-prova li tirrifletti 50 % inibizzjoni ta' l-NRU (EC50) ċellulari. Dan jista' jsir billi tkun applikata kull proċedura xierqa ta' regressjoni mhux lineari (preferibbilment funzjoni Hill jew regressjoni loġistika) lid-data ta' konċentrazzjoni-rispons, jew bl-użu ta' proċeduri oħra xierqa. Qabel ma tintuża EC50 għall-kalkoli oħra, hemm bżonn li tkun ivverifikata b'mod xieraq il-kwalità ta' l-addattament. Alternattivament, jistgħu jkunu użati metodi ta' addattament għar-rappreżentazzjoni grafika biex ikun ikkalkolat EC50. F'dan il-kaz, l-użu tal-karta tal-probabbiltà huwa rakkomandat (skala-x: log, skala-y: probit), billi f'ħafna kazijiet il-funzjoni tar-rispons tal-konċentrazzjoni ssir kważi lineari wara din it-trasformazzjoni.

2.3. Valutazzjoni tar-riżultati (mudelli ta' tbassir)

2.3.1. Mudell ta' tbassir verżjoni 1: Fattur ta' irritazzjoni tad-dawl (PIF)

Jekk kemm, fil-preżenza (+ UVA) u fin-nuqqas (-UV) tad-dawl, jinkisbu kurvi ta' rispons ta' konċentrazzjoni kompleti, fattur ta' irritazzjoni tad-dawl (PIF) huwa ikkalkolat permezz tal-formula li ġejja:

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

PIF < 5, ma jibassar l-ebda potenzjal fototossiku, waqt li PIF >= 5 ibassar potenzjal fototossiku.

Jekk kimika hija ċitotossika biss + UVA u mhix ċitotossika meta ppruvata -UVA, il-PIF ma jistax ikun ikkalkolat, għalkemm dan huwa riżultat li jindika l-potenzjal fototossiku. F'dawn il-kazijiet, '>PIF' jista' jkun ikkalkolat jekk il-prova ta' ċitotossicità titwettaq sa l-ghola konċentrazzjoni (Cmax) u dan il-valur huwa użat għall-kalkolu tal- '>PIF';

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

Jekk '>PIF' jista' jinkiseb, mela kull valur >1 ibassar il-potenzjal fototossiku.

Jekk kemm EC50 (- UV) u EC50 (+ UV) ma jistgħux ikunu kkalkolati minhabba l-fatt li kimika ma turix xi ċitotossicità sa l-ogħla konċentrazzjoni, din ma tindika l-ebda potenzjal fototossiku. F'dawn il-kazijiet, 'PIF = *1' formali huwa użat biex jikkarakterizza r-riżultat;

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

Jekk '>PIF = *1' biss jista' jinkiseb, dan ma j бассar l-ebda potenzjal fototossiku.

Fil-kazijiet (b) u (ċ), għandhom ikunu kkunsidrati bir-reqqa l-koncentrazzjonijiet miksuba fil-prova ta' tossiċità *in vitro* 3T3 NRU meta jkun qed jibassar il-potenzjal fototossiku.

2.3.2. Mudell ta' tbassir verżjoni 2: Effett medju tad-dawl MPE

Alternattivament, verżjoni ġdida tal-mudell għat-tbassir tal-potenzjal fototossiku tista' tkun applikat, li kien żviluppat bl-użu tad-data ta' l-istudju tal-validazzjoni EU/COLIPA(15) u ppruvat taht kondizzjonijiet fl-ghama fi studju sussegwenti fuq il-fototossiċità *in vitro* tas-sustanzi kimiki bil-filtru UV. Dan il-mudell jegħleb il-limitazzjoni tal-mudell PIF f'kazijiet fejn EC50 ma jistax jinkiseb. Il-mudell juża 'l-effett medju tad-dawl' (MPE), miżura li hija bbażata fuq paragon ta' kurvi ta' rispons ta' koncentrazzjoni shiha. Għall-applikazzjoni tal-mudell MPE, ġie żviluppat *software* tal-kompjuter speċjali fl-Università ta' Humboldt (Berlin), li jista' jinkiseb b'xejn.

2.4. Interpretazzjoni tar-riżultati

Riżultat pożittiv fil-prova ta' tossiċità *in vitro* 3T3 NRU (PIF > = 5 or MPE > = 0,1) jindika li s-sustanza tal-prova għandha potenzjal fototossiku. Jekk dan ir-riżultat jinkiseb f'koncentrazzjonijiet anqas minn 10 µg/ml, il-kimika tal-prova x'aktarx taġixxi bhala fototossina wkoll taht kondizzjonijiet varji ta' espożizzjoni *in vitro*. Jekk riżultat pożittiv jinkiseb biss fl-oghla koncentrazzjoni tal-prova ta' 100 µg/ml, konsiderazzjonijiet oħra jistgħu jkunu meħtieġa għall-valutazzjoni tal-perikolu jew potenza fototossika. Dawn jistgħu jinkludu data fuq il-penetrazzjoni, assorbiment u akkumulazzjoni possibbli tal-kimika fil-ġilda, jew l-ittestjar tal-kimika fi prova konfermatorja alternattiva, eż, l-użu ta' mudell tal-bniedem *in vitro*.

Riżultat negattiv mill-prova ta' tossiċità *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 jew MPE < 0,1) jindika li s-sustanza tal-prova ma kinitx fototossika għaċ-ċelloli mammiferi kkultivati taht il-kondizzjonijiet użati. F'kazijiet meta l-kimika tista' tkun ippruvata sa l-oghla koncentrazzjoni ta' 100 µg/ml, riżultat negattiv jindika li l-kimika m'għandha l-ebda potenzjal fototossiku, u l-fototossiċità *in vivo* tista' tkun ikkunsidrata remota. F'kazijiet meta r-rispons identiku ta' koncentrazzjoni u tossiċità (EC50 + UV and EC50- UV) nkiseb f'koncentrazzjonijiet aktar baxxi, l-interpretazzjoni tad-data tkun l-istess. Diversament, jekk ma tintwera l-ebda tossiċità (+ UV and - UV) u jekk is-solubbiltà fl-ilma tillimita l-koncentrazzjonijiet għal valuri ta' inqas minn 100 µg/ml, allura l-kompatibbiltà tas-sustanza tal-prova fil-prova tista' titpoġġa fid-dubbju u għandhom ikunu kkunsidrati provi konfermatorji (eż. l-użu ta' mudell tal-ġilda *in vitro*, jew mudell tal-ġilda *ex vivo* jew prova *in vivo*).

3. RAPPURTAĠĠ

Ir-rapport tal-prova

Ir-rapport tal-prova għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika tal-prova:

- data ta' identifikazzjoni u No SAK, jekk magħruf,
- natura fiżika u purezza,
- proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti għall-esekuzzjoni ta' l-istudju,
- stabbiltà u fotostabbiltà, jekk magħrufa.

Solvent:

- ġustifikazzjoni għall-ghażla tas-solvent,
- solubbiltà tal-kimika tal-prova f'dan is-solvent,
- percentwal ta' solvent prezenti fil-mezz tat-trattament (EBSS jew PBS).

Ċelloli

- tip u sors taċ-ċelloli,
- nuqqas ta' mikroplasma,
- numru ta' passaġġi taċ-ċellola, jekk magħrufa,
- is-sensittività UVA taċ-ċelloli, determinata bit-tagħmir ta' irradjazzjoni, użat fil-prova ta' tossiċità *in vitro* 3T3 NRU.

Kondizzjonijiet tal-prova (a) – inkubazzjoni qabel u wara t-trattament:

- tip u kompożizzjoni tal-mezz tal-kultura,
- kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni (koncentrazzjoni CO₂, temperatura, umidità).
- tul ta' l-inkubazzjoni (qabel it-trattament, wara t-trattament).

Kondizzjonijiet tal-prova (b) – trattament bil-kimika:

- kriterji għall-għażla tal-koncentrazzjonijiet tal-kimiċi tal-prova użati kemm fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni UV/vis,
- fil-każ ta' solubilità limitata tal-kimika tal-prova u n-nuqqas ta' ċitotossicità, ir-raġunijiet għall-ogħla koncentrazzjoni ppruvata,
- tip u kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament (soluzzjoni tal-melħ *buffered*),
- tul tat-trattament kimiku.

Kondizzjonijiet tal-prova (ċ) – irradjazzjoni:

- raġuni għall-għażla tas-sors tad-dawl użat,
- karatteristiċi ta' irradjazzjoni spettrali tas-sors tad-dawl,
- karatteristiċi ta' trasmissjoni/assorbiment tal-filtru(i) użat,
- karatteristiċi tar-radjomietru u dettalji fuq il-kalibrazzjoni tiegħu,
- distanza tas-sors tad-dawl mis-sistema tal-prova,
- Irradjazzjoni UVA f'din id-distanza, espressa f mW/cm²,
- tul ta' l-espożizzjoni tad-dawl UV/vis,
- doża UVA (irradjazzjoni - żmien), espressa f J/cm²,
- temperatura użata għall-kulturi taċ-ċelloli matul l-irradjazzjoni, u għall-kulturi ta' ċelloli miżmuma flimkien fid-dlam.

Kondizzjonijiet tal-prova (d) – prova NRU:

- kompożizzjoni tal-mezz NRU,
- tul ta' l-inkubazzjoni NR,
- kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni (koncentrazzjoni CO₂, temperatura, umdità),
- kondizzjonijiet ta' l-estrazzjoni NR (estraent, tul),
- *wavelength* użat għall-qari spettrofotometriku tad-densità ottika NR,
- it-tieni *wavelength* (referenza), jekk użat,
- kontenut tal-vojt spettrofotometriku, jekk użat.

Riżultati:

- vitalità taċ-ċelloli miksuba f'kull koncentrazzjoni tal-kimika tal-prova, imfissra f'percentwal tal-medja tal-vitalità tal-kontrolli,
- kurvi ta' koncentrazzjoni-rispons, (koncentrazzjoni kimika tal-prova u vitalità relattiva taċ-ċellola), miksubin f'esperimenti konkorenti + UVA u -UVA,
- analiżi tad-data tal-kurvi tal-koncentrazzjoni ta' rispons: jekk possibbli, komputazzjoni/kalkolu ta' EC50 (+ UVA) u EC50 (-UVA),
- paragun taż-żewġ kurvi ta' koncentrazzjoni respons, miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni UVA/vis, jew bil-kalkolu tal-fattur ta' fotoirritazzjoni (PIF), jew bil-kalkolu ta' l-effett medju tad-dawl (MPE),
- klassifikazzjoni tal-potenzjal fototossiku,
- kriterji(u) ta' l-aċċettazzjoni tal-prova – kontroll negattiv konkorenti:
 - vitalità assoluta (densità ottika ta' l-estratt NR) ta' ċelloli irradjati u mhux irradjati,
 - data storika ta' kontroll negattiv, devjazzjoni medja u standard.
- kriterji (b) ta' l-aċċettazzjoni tal-prova – kontroll pożittiv konkorenti:
 - EC50 (+ UVA) u EC50 (- UVA) u PIF tal-kimika ta' kontroll pożittiv,
 - data storika ta' kimika ta' kontroll pożittiv: EC50 (+ UVA) u EC50 (- UVA) u PIF, devjazzjoni medja u standard.

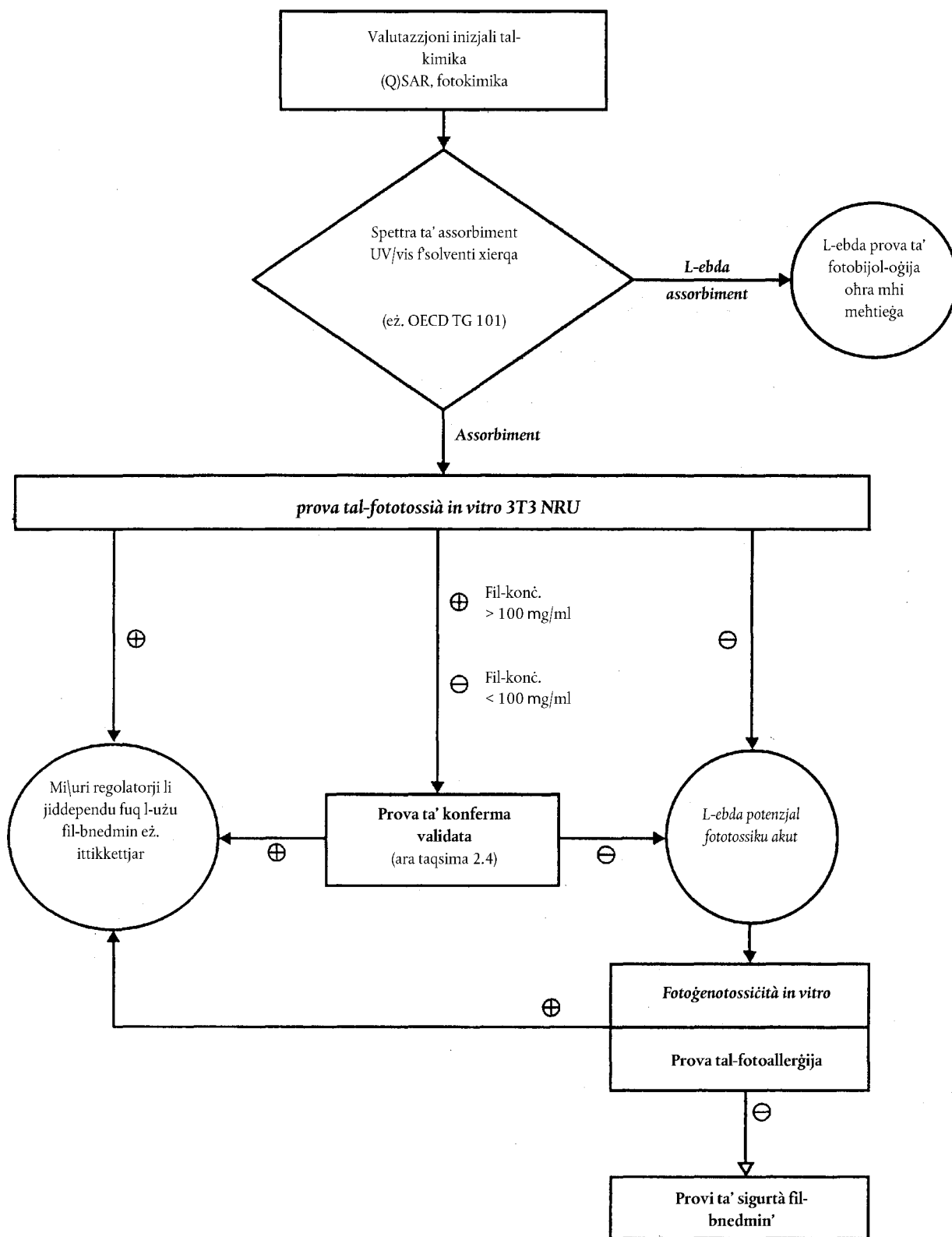
Diskussjoni tar-riżultati.**Konklużjonijiet.**

4. RIFERENZI

- (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, pp. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, pp. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA 'In vitro phototoxicity' validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry Vol. 3 Part 1*, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), *Photosensitization, The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pp. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), *Animal models for phototoxicity testing, Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pp. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project 'In Vitro Photoirritation'.
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phototoxicity Test, *ATLA* 26, pp. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pp. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, pp. 445-462.

Appendix

Rwol tal 3T3 Nru PT f'approċċ sekwenzjali għall-provi ta' fototossicità tal-kimiki



(1) Dettalji ohra jistghu jinstabu fir-riferenza 12.*