

**RICHTLIJN 2000/33/EG VAN DE COMMISSIE****van 25 april 2000****tot zeventwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen (\*)****(Voor de EER relevante tekst)**

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

*Artikel 1*

De tekst van de bijlagen I en II van deze richtlijn wordt aan bijlage V, deel B, van Richtlijn 67/548/EEG toegevoegd.

Gelet op Richtlijn 67/548/EEG van de Raad van 27 juni 1967 betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen <sup>(1)</sup>, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 1999/33/EG van het Europees Parlement en de Raad <sup>(2)</sup>, inzonderheid op artikel 28,

*Artikel 2*

1. De lidstaten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 1 oktober 2001 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Overwegende hetgeen volgt:

Wanneer de lidstaten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar deze richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van de bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de lidstaten.

(1) Bijlage V bij Richtlijn 67/548/EEG bevat de methoden voor de bepaling van de fysisch-chemische eigenschappen, de toxiciteit en de ecotoxiciteit van stoffen en preparaten. Die bijlage dient aan de vooruitgang van de techniek te worden aangepast.

2. De lidstaten doen de Commissie de tekst geworden van de belangrijkste bepalingen van intern recht die zij op het onder deze richtlijn vallende gebied vaststellen, alsmede een concordantietabel met betrekking tot deze richtlijn en de vastgestelde nationale maatregelen.

(2) Artikel 7, lid 2, van Richtlijn 86/609/EEG van de Raad van 24 november 1986 inzake de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de lidstaten betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt <sup>(3)</sup>, luidt als volgt: „Er mag geen proef worden verricht indien er een redelijke, praktische mogelijkheid bestaat het gewenste resultaat te verkrijgen met behulp van een andere wetenschappelijk verantwoorde methode waarbij geen proefdier wordt gebruikt.”

*Artikel 3*

Deze richtlijn treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

(3) De Commissie is voornemens alternatieve beproevingsmethoden waarbij geen dieren hoeven te worden gebruikt, in bijlage V van Richtlijn 67/548/EEG op te nemen ten einde deze beschikbaar te maken voor het onderzoek van chemische stoffen als bedoeld in artikel 3, lid 1, van Richtlijn 67/548/EEG.

*Artikel 4*

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

(4) De bepalingen van deze richtlijn zijn in overeenstemming met het advies van het Comité voor de aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van de richtlijnen met betrekking tot de opheffing van technische handelsbelemmeringen voor gevaarlijke stoffen en preparaten,

Gedaan te Brussel, 25 april 2000.

Voor de Commissie  
Margot WALLSTRÖM  
Lid van de Commissie

(\*) Aangenomen vóór de zesentwintigste aanpassing.

<sup>(1)</sup> PB 196 van 16.8.1967, blz. 1.

<sup>(2)</sup> PB L 199 van 30.7.1999, blz. 57.

<sup>(3)</sup> PB L 358 van 18.12.1986, blz. 1.

## BIJLAGE I

## „B.40. HUIDCORROSIE

1. **METHODE**1.1. **Inleiding**

Twee in vitro-tests voor huidcorrosiviteit, de bepaling aan de hand van de transcutane elektrische weerstand (TEW) in rattenhuid en een test met een model van de humane huid, zijn door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) van het Gemeenschappelijk Centrum voor onderzoek van de Europese Commissie als wetenschappelijk verantwoord bekrachtigd (1) (2) (3). Bij het valideringsonderzoek van het ECVAM is aangetoond dat met beide tests een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn. Bovendien kon met het test-protocol op basis van het model van de humane huid een correct onderscheid worden gemaakt tussen stoffen met een meer of minder hevige corrosieve werking (stoffen waarvan bekend is dat ze ernstig corrosief voor de huid zijn, R35, en andere stoffen die corrosief voor de huid zijn, R34) (2). Voor beide tests wordt een beschrijving en een procedure vermeld; de keuze van de te gebruiken test wordt bepaald door de specifieke eisen en voorkeuren van de gebruiker.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. **Definities**

*Huidcorrosie*: het ontstaan van onomkeerbare weefselschade in de huid na het aanbrengen van testmateriaal.

1.3. **Referentiestoffen**

Er worden geen referentiestoffen gespecificeerd, maar zie ook de punten 1.5.3.4 en 1.7.2.3.

1.4. **Principe van de testmethode — TEW-bepaling met rattenhuid**

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 24 uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van huidschijfjes die uit de huid van op humane wijze gedode jonge ratten worden genomen. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het kan leiden tot een verlies van de normale integriteit en barrièrefunctie van het stratum corneum, dat wordt gemeten als een daling van de inherente TEW tot onder een drempelwaarde ( $5 \text{ k}\Omega$ ) (4) (5). Irriterende en niet-irriterende materialen verlagen de TEW niet tot onder de drempelwaarde. Voor oppervlakteactieve stoffen en neutrale organische verbindingen (zie referentie (6) voor een definitie) kan in de testprocedure een kleurstofbindende stap worden opgenomen om te zorgen dat er specifiek met deze soorten chemische stoffen minder vals-positieve resultaten worden verkregen (2) (7).

1.5. **Beschrijving van de testmethode — TEW-bepaling met rattenhuid**1.5.1. *Dieren*

Jonge (20-23 dagen) ratten (Wistar of een vergelijkbare stam) zijn nodig voor het prepareren van de huidschijfjes. Het haar op de rug en de flanken wordt met een kleine dierschaaar zorgvuldig verwijderd. De dieren worden vervolgens gewassen door zorgvuldig te wrijven terwijl het gebied wordt ondergedompeld in een antibioticaoplossing (die bijvoorbeeld streptomycine, penicilline, chlooramfenicol of amfotericine bevat met een concentratie die werkzaam is voor het remmen van de groei van bacteriën). De dieren worden op de derde of vierde dag na de eerste maal wassen opnieuw met antibiotica gewassen en binnen drie dagen gebruikt (de dieren mogen voor het prepareren van de huid niet ouder dan 31 dagen zijn).

1.5.2. *Het prepareren van de huidschijfjes*

De dieren worden op humane wijze gedood. Vervolgens wordt de huid van de rug van elk dier verwijderd en van overtollig vet ontdaan door het voorzichtig van de huid los te trekken. De huid wordt over het uiteinde van een PTFE-buis (polytetrafluoretheen) gelegd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat het oppervlak van de epidermis in contact met de buis is. Een rubber „O”-ring wordt strak over het uiteinde van de buis geschoven om de huid op zijn plaats te houden en het overtollige weefsel wordt weggeknipt. In figuur 1 worden de afmetingen van de buis en de „O”-ring aangegeven. Vervolgens wordt de rubber „O”-ring zorgvuldig met vaseline aan de PTFE-buis vastgekit. De buis wordt met een klemring vastgezet in een houder die een magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) bevat (figuur 2).

1.5.3. *Testprocedure*1.5.3.1. *Aanbrengen van het testmateriaal*

Vloeibare teststoffen (150  $\mu\text{l}$ ) worden op het oppervlak van de epidermis in de buis aangebracht (figuur 2). Wanneer vast materiaal wordt getest, wordt een zodanige hoeveelheid van de vaste stof op het schijfje aangebracht, dat het hele oppervlak van de epidermis bedekt is. Vervolgens wordt gedeïoniseerd water (150  $\mu\text{l}$ ) boven op de vaste stof toegevoegd en worden de buizen voorzichtig geschud. De teststoffen moeten een maximaal contact met de huid hebben. Voor sommige vaste stoffen kan dit worden bereikt door ze te verwarmen tot 30°C om de stof te laten smelten of door ze fijn te malen om een korrelig materiaal of poeder te verkrijgen.

Voor elke teststof worden drie huidschijfjes gebruikt. De teststoffen worden gedurende 24 uur aangebracht (zie ook punt 1.5.3.4). De teststof wordt verwijderd door te spoelen onder een straal leidingwater van maximaal 30 °C tot er geen materiaal meer kan worden verwijderd. De verwijdering van teststoffen die in de buis gestold zijn, kan worden vergemakkelijkt door te spoelen onder een straal warm water van ongeveer 30 °C.

#### 1.5.3.2. TEW-metingen

De TEW wordt gemeten met een wisselstroommeetbrug voor zwakstroom (bv. AIM 401 of 6401 of gelijkwaardig). Alvorens de elektrische weerstand te meten wordt de oppervlaktespanning van de huid verlaagd door zoveel 70%-ethanol toe te voegen dat de epidermis bedekt is. Na enkele seconden wordt de ethanol verwijderd door de buis om te keren en wordt het weefsel gehydrateerd door 3 ml magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) toe te voegen. De elektroden van de meetbrug worden aan weerszijden van het huidschijfje geplaatst om de weerstand in kΩ te meten (zie figuur 2). De afmetingen van de elektrode en de lengte van het stuk elektrode dat onder de krokodillenklem uitkomt, zijn vermeld in figuur 1. De klem van de binnenste (dikke) elektrode rust tijdens de weerstandsmeting op de bovenkant van de PTFE-buis om ervoor te zorgen dat steeds een even lang stuk van de elektrode in de magnesiumsulfaatoplossing steekt. De buitenste (dunne) elektrode wordt zodanig in de houder aangebracht dat deze op de bodem rust. De afstand tussen de onderkant van de klemring en de onderkant van de PTFE-buis wordt constant gehouden (zie figuur 1), aangezien deze afstand de gemeten weerstand beïnvloedt.

Als de gemeten weerstand hoger is dan 20 kΩ, kan dit worden veroorzaakt doordat het oppervlak van de epidermis van het huidschijfje met een laag teststof bedekt is. Deze laag kan men trachten te verwijderen door bijvoorbeeld de PTFE-buis met de duim (met handschoen) dicht te houden en gedurende ongeveer 10 seconden te schudden. De magnesiumsulfaatoplossing wordt weggegooid en de weerstandsmeting wordt met verse magnesiumsulfaatoplossing herhaald.

De gemiddelde TEW-resultaten worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten positieve en negatieve controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als controlestoffen en aanvaardbare weerstandsintervallen voor de beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld:

Controle	Stof	Weerstandsinterval (kΩ)
Positief	10 M zoutzuur (36 %)	0,5-1,0
Negatief	Gedestilleerd water	10-25

#### 1.5.3.3. Gewijzigde procedure voor oppervlakreactieve stoffen en neutrale organische verbindingen

Als de TEW van teststoffen die oppervlakreactieve stoffen of neutrale organische verbindingen zijn, lager is dan of gelijk is aan 5 kΩ, kan op de weefsels een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Via deze procedure wordt bepaald of de resultaten vals-positief zijn (2).

##### 1.5.3.3.1. Aanbrenging en verwijdering van de kleurstof sulforhodamine B

Na de eerste behandeling met de teststof wordt 150 µl van een 10%-verdunding (g/v) van de kleurstof sulforhodamine B in gedestilleerd water gedurende twee uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van elk huidschijfje. De huidschijfjes worden vervolgens gedurende ongeveer 10 seconden onder een straal leidingwater van ten hoogste kamertemperatuur gespoeld om een eventuele overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Elk huidschijfje wordt voorzichtig van de PTFE-buis verwijderd en in een flesje (bv. een glazen scintillatieflesje van 20 ml) met gedeïoniseerd water (8 ml) gelegd. De flesjes worden gedurende 5 minuten zachtjes geschud om eventueel nog resterende overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Daarna wordt deze spoelprocedure herhaald en vervolgens worden de huidschijfjes in flesjes met 5 ml 30% (g/v) natriumdodecylsulfate (SDS) in gedestilleerd water gelegd en een nacht bij 60 °C geïncubeerd. Na incubatie wordt elk huidschijfje verwijderd en weggegooid en wordt de resterende oplossing gedurende 8 minuten bij 21 °C gecentrifugeerd (relatieve centrifugale kracht ~ 175). Vervolgens wordt 1 ml van het supernatans 1:5 (v/v) (d.w.z. 1 ml + 4 ml) verdund met 30% (g/v) SDS in gedestilleerd water. De optische dichtheid (OD) van de oplossing wordt bij ongeveer 565 nm gemeten.

##### 1.5.3.3.2. Berekening van het kleurstofgehalte

Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt berekend uit de OD-waarde (de molaire extinctiecoëfficiënt van de kleurstof sulforhodamine B bij 565 nm =  $8,7 \times 10^4$  en het molecuulgewicht = 580). Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt voor elk huidschijfje bepaald en vervolgens wordt voor de duplo's het gemiddelde kleurstofgehalte berekend. De gemiddelde resultaten voor de kleurstofbinding worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als aanvaardbare intervallen voor het kleurstofgehalte bij de controlestoffen en de beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld:

Controle	Stof	Interval kleurstofgehalte (µg/schijfje)
Positief	10 M Zoutzuur (36 %)	40-100
Negatief	Gedestilleerd water	15-35

#### 1.5.3.4. Aanvullende informatie

De teststoffen kunnen ook gedurende een kortere periode (bv. 2 uur) op de huidschijfjes worden aangebracht om te bepalen of het materiaal sterk corrosief is. Bij het valideringsonderzoek is echter gebleken dat bij de TEW-bepaling voor verschillende teststoffen een te hoge corrosieve werking werd gevonden nadat ze gedurende 2 uur op de huidschijfjes waren aangebracht (2), terwijl na aanbrengen gedurende 24 uur op correcte wijze onderscheid kon worden gemaakt tussen corrosief en niet-corrosief.

De eigenschappen en afmetingen van de gebruikte testapparatuur en -procedure kunnen de gevonden TEW-waarden beïnvloeden. De corrosiedrempelwaarde van 5 kΩ is bepaald op grond van gegevens die met de specifieke hier beschreven apparatuur en procedure zijn verkregen. Het is mogelijk dat er bij significant gewijzigde testomstandigheden ook andere drempel- en controlewaarden van toepassing zijn. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en de drempelwaarde voor de weerstand te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek zijn gebruikt (3).

#### 1.6. Principe van de testmethode — Bepaling met een model van de humane huid

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 4 uur plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal model voor de humane huid, bestaande uit een gereconstrueerde epidermis met een functioneel stratum corneum. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het bij gespecificeerde blootstellingsperioden kan leiden tot een daling van de levensvatbaarheid van de cellen (die bijvoorbeeld wordt bepaald door de reductie van MTT te meten) tot onder gedefinieerde drempelwaarden. Het principe van de bepaling is gebaseerd op de hypothese dat stoffen corrosief zijn voor cellen maar die normaal gesproken het stratum corneum kunnen penetreren en voldoende cytotoxisch zijn om in de daaronder liggende cellen celdood te veroorzaken.

#### 1.7. Beschrijving van de testmethode — Bepaling met een model van de humane huid

##### 1.7.1. Modellen van de humane huid

Modellen van de humane huid kunnen van verschillende bronnen afkomstig zijn, maar ze moeten aan bepaalde criteria voldoen. Het model moet een functioneel stratum corneum hebben met daaronder een laag levende cellen. De barrièrefunctie van het stratum corneum moet afdoende zijn. Dit kan worden aangetoond door te demonstreren dat het model bestand is tegen cytotoxiciteit na de toediening van stoffen waarvan bekend is dat ze cytotoxisch zijn voor cellen maar die normaal gesproken het stratum corneum niet kunnen passeren. Er moet worden aangetoond dat het model onder gedefinieerde experimentele omstandigheden reproduceerbare resultaten oplevert.

De levensvatbaarheid van de levende cellen in het model moet zo hoog zijn dat er duidelijk onderscheid kan worden gemaakt tussen de positieve en negatieve controlestoffen. De levensvatbaarheid van de cellen (zoals die bijvoorbeeld wordt gemeten aan de hand van de reductie van MTT, d.w.z. een OD-waarde) na blootstelling aan de negatieve controlestof moet binnen aanvaardbare grenzen voor het specifieke model vallen. Evenzo moeten de waarden voor de levensvatbaarheid van de cellen met de positieve controlestof (in vergelijking met die voor de negatieve controle) binnen gespecificeerde grenzen liggen. Het belangrijkste is dat moet zijn aangetoond dat het gebruikte voorspellingsmodel aan internationale valideringsnormen voldoet (2).

##### 1.7.2. Testprocedure

###### 1.7.2.1. Aanbrengen van het testmateriaal

Voor vloeibaar materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is (minimaal 25 µl/cm<sup>2</sup>). Voor vast materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is en moet dit vervolgens worden bevochtigd om te zorgen voor een goed contact met de huid; indien nodig moeten vaste stoffen tot een poeder worden vernalen voordat ze worden aangebracht. Van de wijze van aanbrengen moet worden aangetoond dat deze voor een breed scala van chemische stoffen geschikt is (2). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet het testmateriaal met een fysiologisch zoutoplossing zorgvuldig van het huidoppervlak worden gewassen.

###### 1.7.2.2. Meting van de levensvatbaarheid van de cellen

Voor de meting van de levensvatbaarheid van de cellen kan een willekeurige kwantitatieve gevalideerde methode worden gebruikt. De meest gebruikte bepaling is de reductie van MTT, waarvan is aangetoond dat deze in verschillende laboratoria nauwkeurige en reproduceerbare resultaten oplevert (2). Het huidschijfje wordt gedurende 3 uur bij 20-28 °C in een MTT-oplossing van 0,3 mg/ml gelegd. Er ontstaat een blauw formazan-neerslag dat vervolgens wordt geëxtraheerd (vloeistofextractie) en de formazanconcentratie wordt gemeten door de OD bij een golflengte tussen 545 en 595 nm te bepalen.

### 1.7.2.3. Aanvullende informatie

Het gebruikte huidmodel en het exacte protocol voor de blootstellingstijd, de spoelprocedures enz. hebben een grote invloed op de resultaten van de bepaling van de levensvatbaarheid van de cellen. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en het voorspellingsmodel te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek van het ECVAM zijn gebruikt (3). Het is van fundamenteel belang dat wordt aangetoond dat de gebruikte methode voor een breed scala van chemische stoffen zowel binnen één laboratorium als voor verschillende laboratoria overeenkomstig de internationale normen reproduceerbaar is. De methode moet minimaal voldoen aan de reeds eerder vastgestelde criteria voor wetenschappelijk verantwoorde tests (2) en de resultaten van een dergelijk valideringsonderzoek moeten in een wetenschappelijk tijdschrift met intercollegiale toetsing („peer review”) worden gepubliceerd.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Behandeling van de resultaten

#### 2.1.1. TEW-bepaling met rattenhuid

De weerstand (in  $k\Omega$ ) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

#### 2.1.2. Bepaling met een model van de humane huid

De OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

### 2.2. Evaluatie en interpretatie van de resultaten

#### 2.2.1. TEW-bepaling met rattenhuid

Als de gemiddelde TEW voor de teststof hoger is dan  $5 k\Omega$ , is de stof niet corrosief. Als de TEW-waarde  $5 k\Omega$  of lager is en de teststof geen oppervlakteactieve stof of neutrale organische verbinding is, is de stof wel corrosief.

Voor oppervlakteactieve stoffen of neutrale organische verbindingen die een TEW van  $5 k\Omega$  of lager opleveren, kan een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje hoger is dan of gelijk is aan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36% HCl), is de teststof echt positief en derhalve corrosief. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje lager is dan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36% HCl), is de teststof vals-positief en derhalve niet corrosief.

#### 2.2.2. Bepaling met een model van de humane huid

De OD-waarde van de negatieve controle komt overeen met een levensvatbaarheid van de cellen van 100%, zodat de voor elk testmonster bepaalde OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een procentuele levensvatbaarheid in vergelijking met de negatieve controle. De grenswaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen corrosieve en niet-corrosieve materialen (of tussen verschillende klassen van corrosiviteit) fungeert, moet in het voorspellingsmodel duidelijk worden gespecificeerd alvorens de methode wordt gevalideerd en vervolgens moet in het valideringsonderzoek worden aangetoond dat deze grenswaarde correct is (2).

## 3. RAPPORTAGE

### Testverslag

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

#### Teststof:

- gegevens over identificatie, fysisch karakter en indien van toepassing fysisch-chemische eigenschappen. Indien referentiestoffen worden gebruikt, moet ook daarover dergelijke informatie worden verstrekt.

#### Testomstandigheden:

- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- een beschrijving en motivering van eventuele wijzigingen.

*Resultaten:*

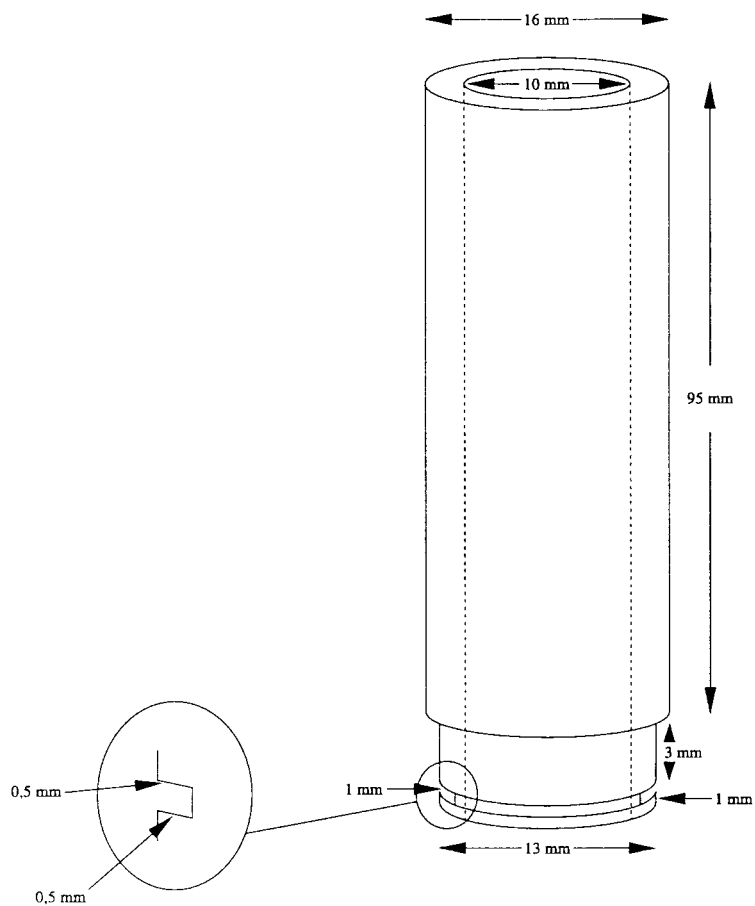
- een tabel met de waarden voor de weerstand (TEW-bepaling) of de procentuele levensvatbaarheid van de cellen (bepaling met een model van de humane huid) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen en gemiddelden;
- een beschrijving van eventuele andere waargenomen effecten.

*Bespreking van de resultaten.**Conclusies.***4. REFERENTIES**

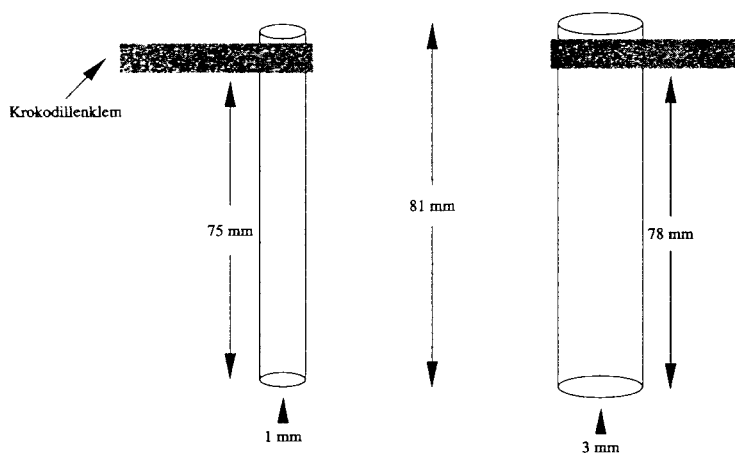
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, blz. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, blz. 219-255.

Figuur 1

**Afmetingen PTFE-buis**

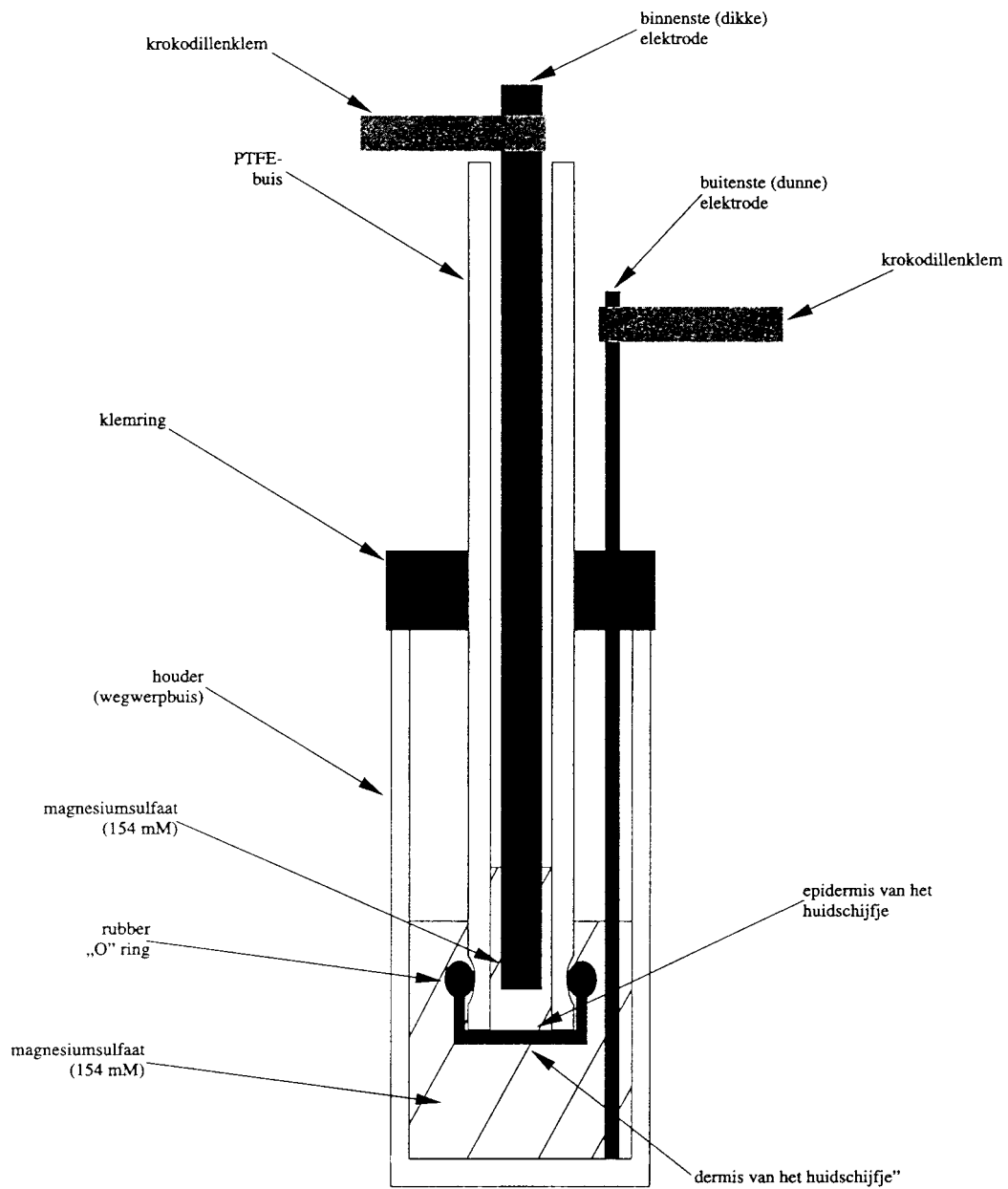


**Afmetingen elektrode**



Figuur 2

## Apparatuur voor de TEW-bepaling bij rattenhuid





## BIJLAGE II

„B.41. FOTOTOXICITEIT — *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITEITSTEST1. **METHODE**1.1. **Inleiding**

Fototoxiciteit is gedefinieerd als een toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht dan wel op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

Informatie die wordt verkregen met de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, wordt gebruikt om het fototoxische potentieel van een onderzochte stof te bepalen, d.w.z. het al dan niet aanwezig zijn van mogelijke risico's die zijn verbonden aan een onderzochte stof in combinatie met de blootstelling aan UV en zichtbaar licht.

Aangezien het toxicologische eindpunt van de *in vitro*-test wordt gevormd door de bepaling van de fototoxiciteit die wordt geïnduceerd door de gecombineerde werking van een stof en licht, kunnen verbindingen die *in vivo* fototoxisch zijn na systemische aanbrenging en verdeling op de huid en verbindingen die na topische aanbrenging op de huid een foto-irriterend effect hebben, als zodanig worden herkend.

De *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest is van 1992-1997 ontwikkeld en gevalideerd in een gezamenlijk EU/Colipa-project (1) (2) (3) om een valide *in vitro*-alternatief te bieden voor de verschillende *in vivo* tests die werden gebruikt. In 1996 werd door een OESO-workshop aanbevolen om voor de bepaling van de fototoxiciteit een stapsgewijze *in vitro*-testprocedure te volgen (4).

Resultaten van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest zijn vergeleken met acute fototoxiciteits- en foto-irritatie-effecten *in vivo* bij dieren en mensen, waarbij is gebleken dat de test deze effecten uitstekend voorspelt. De test is niet ontworpen om andere nadelige effecten te voorspellen die kunnen optreden bij de gecombineerde blootstelling aan een stof en licht, d.w.z. fotogenotoxiciteit, fotoallergie en fotocarcinogeniciteit, hoewel veel stoffen die deze specifieke eigenschappen hebben bij de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest een positieve reactie zullen opleveren. Evenmin is de test bedoeld om de fototoxische potentie te kwantificeren.

Een stapsgewijze procedure voor de uitvoering van fototoxiciteitstests is in het aanhangsel geschetst.

1.2. **Definities**

**Bestralingssterkte:** de intensiteit van het ultraviolette (UV) of zichtbare licht dat op een oppervlak valt, uitgedrukt in  $W/m^2$  of  $mW/cm^2$ .

**Lichtdosis:** de hoeveelheid (= intensiteit  $\times$  tijd) ultraviolette (UV) of zichtbare straling die op een oppervlak valt, uitgedrukt in joules (=  $W \times s$ ) per oppervlakte-eenheid, d.w.z.  $J/m^2$  of  $J/cm^2$ .

**UV-golflengtebanden:** de door de CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) aanbevolen indeling is: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) en UVC (100-280 nm). Er worden ook andere indelingen gehanteerd: de grens tussen UVB en UVA wordt vaak op 320 nm gelegd en UVA wordt soms onderverdeeld in UV-A1 en UV-A2, waarbij de grens ligt op ongeveer 340 nm.

**Levensvatbaarheid van cellen:** parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt aangegeven (d.w.z. opname van de vitale kleurstof neutraalrood in cellulaire lysosomen) die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de cellen.

**Relatieve levensvatbaarheid van cellen:** levensvatbaarheid van cellen uitgedrukt in verhouding tot negatievecontrolecellen (oplosmiddel) die tijdens de gehele testprocedure worden meegenomen, al dan niet met UV bestraald, maar niet met een onderzochte stof behandeld.

**Voorspellend model:** een algoritme om de resultaten van een toxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het toxische potentieel. In de hier beschreven test kunnen PIF en MPE worden gebruikt om de resultaten van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het fototoxische potentieel.

**PIF (foto-irritatiefactor):** een factor die wordt verkregen door twee even effectieve cytotoxische concentraties ( $EC_{50}$ ) van de onderzochte stof te vergelijken die zijn bepaald zonder (-UV) en met (+UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA/zichtbaar licht.

**MPE (gemiddeld foto-effect):** een nieuwe parameter die wordt bepaald aan de hand van een wiskundige analyse van de volledige vorm van twee concentratieresponskrommen die zijn verkregen zonder (-UV) en met (+UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA/zichtbaar licht.

**Fototoxiciteit:** een acute toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht of op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

**Foto-irritatie:** een begrip dat deel uitmaakt van de term „fototoxiciteit” en dat wordt gebruikt om alleen die fototoxische reacties te beschrijven die de huid vertoont na de blootstelling aan stoffen (topisch of oraal). Deze fototoxische reacties leiden altijd tot specifieke celbeschadiging (zonnebrandachtige reacties).

**Fotoallergie:** een verworven immunologische reactie die niet optreedt bij een eerste blootstelling aan een stof en licht, maar een inductieperiode van één of twee weken nodig heeft voordat een reactie van de huid kan worden aangetoond.

**Fotogenotoxiciteit:** een genotoxische respons die wordt waargenomen op een genetisch eindpunt en wordt opgewekt door de blootstelling van cellen aan een niet-genotoxische dosis UV/zichtbaar licht en een niet-genotoxische stof.

**Fotocarcinogeniteit:** carcinogeniteit die wordt geïnduceerd door herhaalde blootstelling aan licht en een chemische stof. De term „foto-cocarcinogenese” wordt gebruikt als door UV geïnduceerde tumorvorming wordt versterkt door een chemische stof.

### 1.3. Referentiestoffen

Behalve de positieve controlestof chloorpromazine, die in elke proef parallel moet worden getest, wordt aanbevolen voor het opzetten van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest als referentiestoffen gebruik te maken van een aantal van de stoffen die bij deze test in interlaboratoriumproeven zijn gebruikt (1) (3) (13).

### 1.4. Achtergrond

Van veel typen stoffen zijn fototoxische effecten gemeld (5) (6) (7) (8). De enige gemeenschappelijke eigenschap is hun vermogen om lichtenergie te absorberen in het zonlichtgebied. Volgens de eerste wet van de fotochemie (wet van Grothaus-Draper) is de voorwaarde voor het optreden van een fotoreactie dat er voldoende lichtkwanta worden geabsorbeerd. Voordat wordt overwogen een biologische test volgens de onderhavige methode uit te voeren, moet dan ook een absorptiespectrum van de te onderzoeken stof in het UV/zichtbare licht worden bepaald (bv. volgens OESO-terrichtlijn 101). Als de molaire extinctieabsorptiecoëfficiënt minder is dan  $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , heeft de stof geen fotoreactief potentieel en hoeft deze niet volgens de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest of een andere biologische test te worden getest op nadelige fotochemische effecten (aanhangsel).

### 1.5. Principe van de testmethode

Er zijn vier mechanismen bekend voor een fototoxische respons als gevolg van de absorptie van licht door een (chemische) chromofor (7). Deze kunnen alle leiden tot celbeschadiging. Daarom is de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest gebaseerd op een vergelijking van de cytotoxiciteit van een stof met en zonder de blootstelling aan een niet-cytotoxische dosis UVA/zichtbaar licht. De cytotoxiciteit wordt in deze test uitgedrukt als de concentratieafhankelijke verlaging van de opname van de vitale kleurstof neutraalrood (NR) (9) 24 uur na de behandeling met de te onderzoeken stof en bestraling.

Balb/c 3T3 cellen worden gedurende 24 uur in cultuur gehouden zodat zich een monocellulaire laag vormt. Vervolgens worden voor elke te onderzoeken stof twee 96-wells-platen gedurende één uur gepreïncubeerd met acht verschillende concentraties van de stof. Daarna wordt één van de twee platen blootgesteld aan een niet-cytotoxische dosis UVA/zichtbaar licht van  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA (+UV-experiment) terwijl de andere plaat in het donker wordt bewaard (-UV-experiment). In beide platen wordt het behandelingsmedium vervolgens vervangen door cultuurmedium en na nog eens 24 uur incubatie wordt de levensvatbaarheid van de cellen bepaald aan de hand van de opname van neutraalrood (NRU — neutral red uptake) gedurende drie uur. De relatieve levensvatbaarheid van de cellen, uitgedrukt als percentage van de levensvatbaarheid van onbehandelde negatieve controles, wordt voor elk van de acht testconcentraties berekend. Om een uitspraak te doen over het fototoxische potentieel worden de concentratieresponsen die zijn verkregen met (+UV) en zonder (-UV) bestraling vergeleken, gewoonlijk op het  $EC_{50}$  niveau, d.w.z. de concentratie die de levensvatbaarheid van de cellen met 50% vermindert ten opzichte van onbehandelde controles.

### 1.6. Kwaliteitscriteria

**UVA-gevoeligheid van de cellen, historische gegevens:** de cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op gevoeligheid voor UVA. Cellen worden overgeënt met de dichtheid die wordt gebruikt in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, de volgende dag bestraald met UVA-doses van  $1-9 \text{ J/cm}^2$  en de levensvatbaarheid van de cellen wordt één dag later bepaald door middel van de NRU-test. Cellen voldoen aan de kwaliteitscriteria als hun levensvatbaarheid na bestraling met  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA ten minste 80% bedraagt van de levensvatbaarheid van de niet-belichte controles. Bij de hoogste UVA-dosis van  $9 \text{ J/cm}^2$  mag de levensvatbaarheid niet minder zijn dan 50% van die van de niet-belichte controles. Deze controle dient ongeveer om de tien celpassages te worden herhaald.

**UVA-gevoeligheid van de negatievecontrolecellen, lopende test:** de test voldoet aan de kwaliteitscriteria als negatieve controles (cellen in EBSS (Earl's balanced salt solution) met of zonder 1% dimethylsulfoxide (DMSO) of 1% ethanol (EtOH)) in het +UVA-experiment een levensvatbaarheid vertonen van ten minste 80% van die van niet-bestraalde cellen in hetzelfde oplosmiddel in het parallel uitgevoerde niet-belichte experiment (-UVA).

*Levensvatbaarheid van negatievecontrolecellen:* de absolute optische dichtheid ( $OD_{540 \text{ NRU}}$ ) die wordt gemeten in het NR-extract van de negatieve controles laat zien of de  $1 \times 10^4$  cellen die per well zijn overgeënt tijdens de twee dagen van de test met de normale verdubbelingstijd zijn gegroeid. Een test voldoet aan de goedkeuringcriteria als de gemiddelde  $OD_{540 \text{ NRU}}$  van onbehandelde controles  $\geq 0,2$  is.

*Positieve controle:* parallel aan elke *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bekende fototoxische stof worden getest. Chloorpromazine (CPZ) is als positieve controle gebruikt in de EU/Colipa-valideringsstudie en wordt daarom aanbevolen. Voor CPZ dat wordt getest volgens het standaardprotocol in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, zijn de volgende goedkeuringcriteria gedefinieerd: CPZ bestraald (+UVA):  $EC_{50} = 0,1$  tot  $2,0 \mu\text{g/ml}$ , CPZ niet-bestraald (-UVA):  $EC_{50} = 7,0$  tot  $90,0 \mu\text{g/ml}$ . De foto-irritatiefactor (PIF), d.w.z. de verschuiving van  $EC_{50}$  moet ten minste 6 zijn.

In plaats van CPZ kunnen ook andere bekende fototoxische stoffen die geschikt zijn wat betreft de chemicaliënklasse of de oplosbaarheids eigenschappen van de onderzochte stof, als parallelle positieve controle worden gebruikt. In dit geval dienen de bereiken van de  $EC_{50}$  waarden en PIF of MPE (gemiddeld foto-effect) uitgaande van historische gegevens op adequate wijze gedefinieerd te zijn als aanvaardbaarheids criteria voor de test.

## 1.7. Beschrijving van de testmethode

### 1.7.1. Voorbereidingen

#### 1.7.1.1. Cellen

In de valideringsstudie is een permanente fibroblastcellijn van muizen — Balb/c 3T3, kloon 31 — van ATCC of ECACC gebruikt. Deze wordt daarom aanbevolen. Andere cellen of cellijnen kunnen met succes volgens hetzelfde testprotocol worden gebruikt als de culturomstandigheden worden aangepast aan de specifieke behoeften van de cellen, maar de gelijkwaardigheid moet worden aangetoond.

De cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op de afwezigheid van mycoplasma besmetting en mogen alleen worden gebruikt als de resultaten van die controle bevredigend zijn.

Aangezien de UVA-gevoeligheid van cellen kan toenemen met het aantal passages, moeten Balb/c 3T3 cellen met het laagste verkrijgbare passagegetal worden gebruikt, bij voorkeur lager dan 100. Het is belangrijk dat de UVA-gevoeligheid van de Balb/c 3T3 cellen regelmatig wordt gecontroleerd volgens de kwaliteitscontroleprocedure die in dit document is beschreven.

#### 1.7.1.2. Media en culturomstandigheden

Voor routinematige passage van de cellen en tijdens de testprocedure moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt. Voor Balb/c 3T3 cellen zijn dit DMEM gesupplementeerd met 10% serum van pasgeboren kalveren, 4 mM glutamine, penicilline en streptomycine en incubatie onder vochtige omstandigheden bij  $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{CO}_2$ . Het is vooral belangrijk dat de culturomstandigheden zo zijn dat de celdyctijd binnen het normale gedocumenteerde bereik van de gebruikte cellen of cellijn ligt.

#### 1.7.1.3. Prepareren van de culturen

Cellen uit ingevroren voorraadculturen worden met een geschikte dichtheid overgeënt in cultuurmedium en ten minste één maal in subcultuur gebracht voordat zij in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest worden gebruikt.

Voor de fototoxiciteitstest worden testcellen overgeënt in een cultuurmedium, waarbij de dichtheid zo is dat de culturen geen confluentie bereiken voor het einde van de test, d.w.z. wanneer de levensvatbaarheid van de cellen wordt bepaald 48 uur na het overenten van de cellen. Voor Balb/c 3T3 die worden gekweekt in 96-wells-platen, wordt een celdichtheid van  $1 \times 10^4$  cellen per well aanbevolen.

Voor elke te onderzoeken stof worden cellen op identieke wijze overgeënt op twee afzonderlijke 96-wells-platen die vervolgens parallel de gehele testprocedure onder identieke culturomstandigheden doorlopen, met uitzondering van de tijd gedurende welke een van de platen wordt bestraald (+UVA/zichtbaar licht) en de andere in het donker wordt bewaard (-UVA/zichtbaar licht).

#### 1.7.1.4. Metabolische activering

Hoewel het gebruik van metaboliserende systemen een algemene voorwaarde is voor alle *in vitro* tests voor de voorspelling van genotoxisch en carcinogeen potentieel, is tot dusverre voor fototoxicologie geen stof bekend die pas na metabolische transformatie *in vivo* of *in vitro* als fototoxine werkt. Het wordt dan ook niet nodig geacht, en evenmin zijn er wetenschappelijke gronden, om de huidige test uit te voeren met een metabolisch activeringssysteem.

#### 1.7.1.5. Te onderzoeken stof/preparatie

Te onderzoeken stoffen moeten vlak voor het gebruik vers worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is. Prepareren onder rood licht kan nodig zijn als het waarschijnlijk is dat snelle fotodegradatie optreedt.

Te onderzoeken stoffen moeten worden opgelost in gebufferde zoutoplossingen, bijvoorbeeld Earl's balanced salt solution (EBSS) of fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), die om interferentie tijdens de bestraling te voorkomen, vrij moeten zijn van proteïnecomponenten en lichtabsorberende pH-indicatorkleurstoffen.

Te onderzoeken stoffen met een beperkte oplosbaarheid in water moeten in geschikte oplosmiddelen worden opgelost met een concentratie die 100-maal de gewenste eindconcentratie is en vervolgens met de gebufferde zoutoplossing een factor 100 worden verdund. Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, moet dit in alle culturen met een constant volumegehalte van 1% (v/v) aanwezig zijn, d.w.z. zowel in de negatieve controles als in alle concentraties van de te onderzoeken stof.

De aanbevolen oplosmiddelen zijn dimethylsulfoxide (DMSO) en ethanol (EtOH). Andere oplosmiddelen met een lage cytotoxiciteit (bv. aceton) kunnen in aanmerking komen, maar zij moeten zorgvuldig worden onderzocht op specifieke eigenschappen, bijvoorbeeld reactie met de te onderzoeken stof, onderdrukking van het fototoxische effect, vermogen om radicalen te binden.

Om het oplossen te bevorderen kan gebruik worden gemaakt van vortex-menging en/of sonicatie en/of verwarming tot 37°C.

#### 1.7.1.6. UV bestraling/preparatie

*Lichtbron:* de keuze van een geschikte lichtbron en geschikte filtering is de meest cruciale factor bij fototoxiciteitstests. UVA en zichtbaar licht worden gewoonlijk geassocieerd met fotosensibilisatie (7) (10), terwijl UVB van minder belang is en rechtstreeks hoogcytotoxisch is waarbij de cytotoxiciteit van 313 nm tot 280 nm een factor 1000 toeneemt (11). Bij de keuze van een geschikte lichtbron geldt de essentiële eis dat de lichtbron golflengten uitzendt die door de te onderzoeken stof worden geabsorbeerd en dat de lichtdosis (die binnen een redelijke tijd kan worden bereikt) voldoende is om bekende fotosensitizers te detecteren. Bovendien mogen de gebruikte golflengtes en doses, met inbegrip van de emissie van warmte (infrarood), geen ontoelaatbare schade berokkenen aan het testsysteem.

Simulatie van zonlicht met zonnemotoren wordt als de optimale lichtbron beschouwd. In zonnemotoren worden xenonbooglampen en (gedoteerde) kwik-metaalhalidebooglampen gebruikt. Laatstgenoemde hebben het voordeel dat zij minder warmte afgeven en goedkoper zijn, maar de overeenstemming met het zonlicht is niet volmaakt. Aangezien alle zonnemotoren significante hoeveelheden UVB uitstralen, moeten er filters worden toegepast om de hoogcytotoxische UVB-golflengtes te verzwakken.

Voor de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bestralingspectrum worden gebruikt dat vrijwel geen UVB bevat (UVA:UVB ~ 1:20). Er is een voorbeeld gepubliceerd van de spectrale stralingsverdeling van de gefilterde zonnemotor die is gebruikt in de valideringsstudie van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (3).

*Dosimetrie:* de intensiteit van het licht (bestralingssterkte) moet regelmatig voor elke fototoxiciteitstest worden gecontroleerd met een geschikte breedband-UV-meter. De UV-meter moet op de bron zijn gekalibreerd. De werking van de UV-meter moet worden gecontroleerd en daarvoor wordt het gebruik van een tweede referentie-UV-meter van hetzelfde type en met dezelfde kalibratie aanbevolen. Idealiter moet met grotere intervallen een spectroradiometer worden gebruikt om de spectrale stralingssterkte van de gefilterde lichtbron te meten en de kalibratie van de breedband-UV-meter te controleren, maar dergelijke instrumenten vereisen speciaal opgeleid personeel.

In de valideringsstudie is vastgesteld dat een dosis van 5 J/cm<sup>2</sup> (UVA) niet-cytotoxisch is voor Balb/c 3T3 cellen maar toch voldoende sterk om zelfs zwak fototoxische stoffen te exciteren. Om in 50 minuten een bestralingsdosis van 5 J/cm<sup>2</sup> te bereiken, moet de bestralingssterkte worden afgesteld op 1,666 mW/cm<sup>2</sup>. Als een andere cellijn of een andere lichtbron wordt gebruikt, kan het nodig zijn de UVA-dosis enigszins aan te passen rekening houdend met het criterium dat de straling de cellen geen schade mag berokkenen en krachtig genoeg moet zijn om standaardfototoxines te detecteren. De duur van de blootstelling aan het licht wordt als volgt berekend:

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

#### 1.7.2. Testomstandigheden

De maximale concentratie van een te onderzoeken stof mag niet hoger zijn dan 100 µg/ml, aangezien alle fototoxische stoffen zijn gedetecteerd bij lagere concentraties, terwijl bij hogere concentraties de incidentie van fout-positieve resultaten toeneemt (13). De pH van de hoogste concentratie van de te onderzoeken stof moet een aanvaardbare waarde hebben (pH tussen 6,5 en 7,8).

Het bereik waarbinnen de concentraties van een met (+UVA) en zonder (-UVA) licht onderzochte stof moeten liggen, moet in voorbereidende experimenten worden bepaald. Het bereik en de intervallen van een concentratiereeks moeten zo worden gekozen dat de experimentele gegevens de concentratieresponskrommen voldoende onderbouwen. Er moeten geometrische concentratiereeksen (met een constante verdunningsfactor) worden gebruikt.

### 1.7.3. Testprocedure<sup>(1)</sup>

#### 1.7.3.1. 1. Eerste dag

Bereid een celsuspensie van  $1 \times 10^5$  cellen/ml in een cultuurmedium en breng uitsluitend in de buitenste wells van een 96-wells microtiterplaat voor weefselkweek 100 µl cultuurmedium aan (= blanco's). Breng in de overige wells 100 µl celsuspensie van  $1 \times 10^5$  cellen/ml (=  $1 \times 10^4$  cellen/well) aan. Prepareer voor elke te onderzoeken stof twee platen: één voor de bepaling van de cytotoxiciteit (-UVA), en de ander voor de bepaling van de fotocytotoxiciteit (+UVA).

Incubeer de cellen gedurende 24 uur (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C) totdat zij een halfconfluente monocellulaire laag vormen. Deze incubatieperiode is lang genoeg voor het herstel en de hechting van de cellen en voor exponentiële groei.

#### 1.7.3.2. Tweede dag

Na incubatie het cultuurmedium van de cellen decanteren en tweemaal spoelen met 150 µl EBSS/PBS per well. Voeg 100 µl EBSS/PBS met de gewenste concentratie te onderzoeken stof dan wel enkel oplosmiddel (negatieve controle) toe. Breng 8 verschillende concentraties van de te onderzoeken stof aan. Incubeer de cellen met de te onderzoeken stof in het donker gedurende 60 minuten (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

Voor het (+UVA) deel van de test de cellen gedurende 50 minuten bij kamertemperatuur door het deksel van de 96-wells-plaat bestralen met 1,7 mW/cm<sup>2</sup> UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>). Ventileer met een ventilator om condensatie van H<sub>2</sub>O onder het deksel te voorkomen. Bewaar de duplicaatplaten (-UVA) bij kamertemperatuur gedurende 50 minuten (= UVA-blootstellingstijd) in een donkere kast.

Decanteer de testoplossing en spoel tweemaal met 150 µl EBSS/PBS. Vervang EBSS/PBS door cultuurmedium en incubeer tot de volgende dag (18-22 h) (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

#### 1.7.3.3. Derde dag

##### Microscopisch onderzoek

Onderzoek de cellen onder een fasecontrastmicroscop. Leg de morfologische veranderingen van de cellen als gevolg van de cytotoxische effecten van de onderzochte stof vast. Deze controle wordt aanbevolen om experimentele fouten uit te sluiten, maar deze gegevens worden niet gebruikt voor de beoordeling van de cytotoxiciteit of fototoxiciteit.

##### Opname van neutraalrood

Spoel de cellen met 150 µl voorverwarmde EBSS/PBS. Verwijder de spoeloplossing door voorzichtig af te tapen. Voeg 100 µl NR medium toe en incubeer gedurende 3 uur op 37°C, in een gehumidificeerde atmosfeer met 7,5% CO<sub>2</sub>.

Na incubatie het NR-medium verwijderen en de cellen spoelen met 150 µl EBSS/PBS. Decanteren en EBSS/PBS volledig met vloeipapier verwijderen. (Andere mogelijkheid: omgekeerde plaat centrifugeren).

Voeg precies 150 µl NR-desorptieoplossing (vers bereid ethanol/azijnzuur) toe.

Schud de microtiterplaat gedurende 10 minuten snel op een microtiterplaatschudder totdat het NR uit de cellen is geëxtraheerd en zich een homogene oplossing heeft gevormd.

Meet de optische dichtheid van het NR-extract bij 540 nm in een spectrofotometer, waarbij de blanco's als referentie worden gebruikt. Sla de gegevens in een geschikt bestandsformaat (bv. ASCII) op voor verdere analyse.

<sup>(1)</sup> Nadere gegevens zijn te vinden in referentie 12.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Kwaliteit van de gegevens en aantal gegevens

De gegevens moeten een zinvolle analyse van de met en zonder UVA/zichtbaar licht verkregen concentratie-responskrommen mogelijk maken. Als cytotoxiciteit wordt geconstateerd, moeten het concentratiebereik en de intervallen tussen de verschillende concentraties zo worden gekozen dat er een kromme aan de experimentele gegevens kan worden gefit. Aangezien het mogelijk is dat een onderzochte stof niet cytotoxisch is beneden de voorgeschreven maximumconcentratie van 100 µg/ml in het niet-belichte experiment (-UVA), maar zeer cytotoxisch bij bestraling (+UVA), kan het nodig zijn dat de concentratiebereiken die in beide onderdelen van het experiment moeten worden onderzocht, grootteordes verschillen om de vereiste kwaliteit van de gegevens te bereiken. Als in geen van beide onderdelen van het experiment (-UVA en +UVA), cytotoxiciteit wordt aangetroffen, volstaat een test met grote intervallen tussen de opeenvolgende doses tot aan de maximale concentratie.

Een duidelijk positief resultaat hoeft niet in een herhalingsexperiment te worden geverifieerd. Evenmin hoeven duidelijk negatieve resultaten te worden geverifieerd, op voorwaarde dat de onderzochte stof bij voldoende hoge concentraties is getest. In dergelijke gevallen volstaat één groot experiment voorafgegaan door één of meer voorbereidende experimenten om het concentratiebereik vast te stellen.

Tests met onduidelijke resultaten in de nabijheid van de grenswaarde van het voorspellingsmodel moeten ter verificatie worden herhaald.

Als herhaald testen nodig wordt geacht, kan het van belang zijn dat de experimentele omstandigheden worden gevarieerd om een duidelijk resultaat te bereiken. Een belangrijke variabele in deze test is het bereiden van oplossingen van de onderzochte stof. Bij de herhaling van een test kan het dan ook essentieel zijn dat deze omstandigheden (co-solvent, verpulvering, sonificeren) worden gevarieerd. Een andere mogelijkheid is de incubatietijd voor de bestraling te variëren. Een kortere tijd kan zinvol zijn voor stoffen die onstabiel zijn in water.

### 2.2. Verwerking van de resultaten

Waar mogelijk wordt bepaald bij welke concentratie van een onderzochte stof 50% inhibitie van de cellulaire NRU (EC<sub>50</sub>) optreedt. Dit kan worden gedaan door een geschikte niet-lineaire regressiemethode (bij voorkeur een Hillfunctie of logistische regressie) toe te passen op de concentratieresponsgegevens of door andere fittechnieken toe te passen (14). Voordat een EC<sub>50</sub>-waarde voor verdere berekeningen wordt gebruikt, moet de kwaliteit van de fit worden gecontroleerd. Een andere mogelijkheid is de EC<sub>50</sub>-waarde te bepalen met grafische fittechnieken. In dit geval wordt aanbevolen waarschijnlijkheidspapier (x-schaal: logaritmisch, y-schaal: probit) te gebruiken, aangezien de concentratie-responsfunctie na deze transformatie in veel gevallen nagenoeg lineair zal zijn.

### 2.3. Beoordeling van de resultaten (voorspellende modellen)

#### 2.3.1. Voorspellend model versie 1: foto-irritatiefactor (PIF)

Als zowel met (+UVA) als zonder (-UVA) licht volledige concentratieresponskrommen zijn verkregen, wordt een foto-irritatiefactor van (PIF) berekend met de volgende formule:

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

PIF < 5, wijst erop dat er geen fototoxisch potentieel is, PIF ≥ 5 wijst erop dat er fototoxisch potentieel is.

Als een stof alleen +UVA cytotoxisch is en -UVA getest geen cytotoxiciteit vertoont, kan de PIF niet worden berekend, hoewel het resultaat wijst op fototoxisch potentieel. In dergelijke gevallen kan een „> PIF” waarde worden berekend als de (-UV) cytotoxiciteitstest wordt uitgevoerd tot de hoogste testconcentratie (C<sub>max</sub>) en deze waarde wordt gebruikt om de „> PIF” waarde te berekenen.

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

Als alleen een „> PIF” waarde kan worden verkregen, wijst elke waarde > 1 erop dat er fototoxisch potentieel is.

Als er geen EC<sub>50</sub> (-UV) en EC<sub>50</sub> (+UV) kunnen worden berekend omdat de stof zelfs bij de hoogste testconcentratie geen cytotoxiciteit vertoont, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is. In dergelijke gevallen wordt een formele waarde „PIF = \*1” gebruikt om het resultaat weer te geven:

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

Als alleen een „PIF = \*1” kan worden verkregen, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is.

In de gevallen (b) en (c) moet bij de voorspelling van het fototoxisch potentieel zorgvuldig rekening worden gehouden met de bij de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest bereikte concentraties.

#### 2.3.2. Voorspellend model versie 2: gemiddeld foto-effect (MPE)

Een andere mogelijkheid is om een nieuwe versie van het model voor de voorspelling van het fototoxische potentieel toe te passen, die is ontwikkeld door gebruik te maken van gegevens van de EU/Colipa-valideringsstudie (15) en die in een latere studie van de *in vitro* fototoxiciteit van chemicaliën voor UV-filters blind is getest (13). Dit model heeft geen last van de beperking van het PIF-model in gevallen waarin geen EC<sub>50</sub> waarde kan worden verkregen. In dit model wordt het „gemiddelde-foto-effect” (MPE) gebruikt, een maat die is gebaseerd op de vergelijking van de volledige concentratieresponskrommen. Voor de toepassing van het MPE-model is speciale computersoftware ontwikkeld aan de Humboldt Universiteit (Berlijn), die kosteloos kan worden verkregen.

#### 2.4. Interpretatie van de resultaten

Een positief resultaat van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (PIF  $\geq$  5 of MPE  $\geq$  0,1) wijst erop dat de onderzochte stof fototoxisch potentieel heeft. Als dit resultaat wordt verkregen bij concentraties lager dan 100 µg/ml, is het waarschijnlijk dat de onderzochte stof ook onder verschillende blootstellingsomstandigheden *in vivo* fototoxisch is. Als alleen een positief resultaat wordt verkregen bij de hoogste testconcentratie van 100 µg/ml, kan het nodig zijn verder onderzoek te doen om het gevaar of de fototoxische potentie te bepalen. Dit kan betekenen dat gegevens nodig zijn over penetratie, absorptie en eventuele accumulatie van de stof in de huid, of dat ter bevestiging een andere test op de stof moet worden uitgevoerd, bijvoorbeeld met een humaan *in vitro* huidmodel.

Een negatief resultaat van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (PIF < 5 of MPE < 0,1) wijst erop dat de onderzochte stof onder de toegepaste omstandigheden niet fototoxisch was voor de zoogdiercellen in de cultuur. In gevallen waarin de stof kon worden getest tot de hoogste concentratie van 100 µg/ml, wijst een negatief resultaat erop dat de stof geen fototoxisch potentieel heeft en dat *in vivo* fototoxiciteit onwaarschijnlijk mag worden geacht. In gevallen waarin bij lagere concentraties identieke concentratietoxiciteitsresponsen (EC<sub>50</sub> +UV en EC<sub>50</sub> -UV) werden verkregen, kunnen de gegevens op dezelfde wijze worden geïnterpreteerd. Als echter geen toxiciteit is aangetoond (+UV en -UV) en de concentraties als gevolg van de beperkte oplosbaarheid in water beperkt waren tot waarden lager dan 100 µg/ml, valt te betwijfelen of de test geschikt is voor de betreffende stof en moet worden overwogen ter bevestiging een andere test uit te voeren (bv. met een *in vitro* huidmodel of een *ex vivo* huidmodel of een *in vivo* test).

### 3. RAPPORTAGE

#### Testrapport

Het testrapport moet de volgende informatie bevatten:

##### Onderzochte stof:

- identificatiegegevens en CAS-nummer, indien bekend,
- fysische toestand en zuiverheid,
- fysisch-chemische eigenschappen die voor de test van belang zijn,
- stabiliteit en fotostabiliteit, indien bekend.

##### Oplosmiddel:

- motivering van de keuze van het oplosmiddel,
- oplosbaarheid van de onderzochte stof in dit oplosmiddel,
- percentage oplosmiddel aanwezig in het behandelingsmedium (EBSS of PBS).

##### Cellen:

- type en bron van de cellen,
- afwezigheid van mycoplasma's,
- aantal celpassages indien bekend,
- UVA-gevoeligheid van de cellen, bepaald met de bestralingsapparatuur die in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest wordt gebruikt.

##### Testomstandigheden (a) — incubatie vóór en na behandeling:

- type en samenstelling van het cultuurmedium,
- incubatieomstandigheden (CO<sub>2</sub>-concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- incubatieduur (voorbehandeling, nabehandeling).

*Testomstandigheden (b) — behandeling met de stof:*

- motivering van de keuze van de concentraties van de onderzochte stof die met en zonder bestraling met UV/zichtbaar licht zijn gebruikt,
- in geval van beperkte oplosbaarheid van de onderzochte stof en afwezigheid van cytotoxiciteit: motivering van de hoogste geteste concentratie,
- samenstelling van het behandelingsmedium (gebufferde zoutoplossing),
- duur van de chemische behandeling.

*Testomstandigheden (c) — bestraling:*

- motivering van de keuze van de lichtbron,
- spectrale bestralingskarakteristieken van de lichtbron,
- transmissie/absorptiekarakteristieken van de filters,
- karakteristieken van de radiometer en gegevens over de kalibratie ervan,
- afstand van de lichtbron tot het testsysteem,
- UVA-bestralsingssterkte op deze afstand uitgedrukt in  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ,
- duur van de blootstelling aan UV/zichtbaar licht,
- UVA-dosis (bestralsingssterkte  $\times$  tijd), uitgedrukt in  $\text{J}/\text{cm}^2$ ,
- temperatuur waarbij de celculturen tijdens bestraling respectievelijk in het donker werden bewaard.

*Testomstandigheden (d) — NRU test:*

- samenstelling van NR-medium,
- duur van NR-incubatie,
- incubatieomstandigheden ( $\text{CO}_2$ -concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- NR-extractieomstandigheden (extractiemiddel, duur),
- golflengte voor spectrofotometrische bepaling van NR optische dichtheid,
- tweede golflengte (referentie) indien gebruikt,
- inhoud van de blancocuvetten van de spectrofotometer indien van toepassing.

*Resultaten:*

- levensvatbaarheid van cellen bepaald bij elke concentratie van de onderzochte stof, uitgedrukt in gemiddelde procentuele levensvatbaarheid ten opzichte van de controles,
- concentratieresponskrommen (concentratie onderzochte stof vs. relatieve levensvatbaarheid van cellen) verkregen in parallelle +UVA en -UVA-experimenten,
- gegevensanalyse van de concentratieresponskrommen: zo mogelijk berekening van  $\text{EC}_{50}$  (+UVA) en  $\text{EC}_{50}$  (-UVA),
- vergelijking van de twee concentratieresponskrommen die zijn verkregen met respectievelijk zonder bestraling met UVA/zichtbaar licht, hetzij door berekening van de foto-irritatiefactor (PIF), hetzij door berekening van het gemiddelde foto-effect (MPE),
- classificatie van het fototoxische potentieel,
- criteria voor acceptatie van de test (a) — parallelle negatieve controle:
  - absolute levensvatbaarheid (optische dichtheid van NR-extract) bestraalde en niet-bestraalde cellen,
  - bestaande gegevens m.b.t. negatieve controle: gemiddelde en standaarddeviatie,
- criteria voor acceptatie van de test (b) — parallelle positieve controle:
  - $\text{EC}_{50}$ (+UVA) en  $\text{EC}_{50}$ (-UVA) en PIF van voor positieve controle gebruikte stof,
  - bestaande gegevens m.b.t. voor positieve controle gebruikte stof:  $\text{EC}_{50}$ (+UVA) and  $\text{EC}_{50}$ (-UVA) en PIF: gemiddelde en standaarddeviatie.

*Bespreking van de resultaten.**Conclusies.*



## 4. REFERENTIES

- (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, blz. 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, blz. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA „*In vitro* phototoxicity” validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, blz. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, blz. 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, blz. 445-462.

## Aanhangsel

## Plaats van de 3T3 NRU fototoxiciteitstests in een stapsgewijze bepaling van de fototoxiciteit van stoffen

