

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/33/EG**av den 25 april 2000****om anpassning till tekniska framsteg för tjugosjunde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (*)****(Text av betydelse för EES)**EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DETTA DIREKTIV

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

Texten i bilagorna 1 och 2 till detta direktiv skall läggas till i avsnitt B i bilaga V till direktiv 67/548/EEG.

*Artikel 2*med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen ⁽¹⁾, senast ändrat genom Europaparlamentets och rådets direktiv 1999/33/EG ⁽²⁾, särskilt artikel 28 i detta, och

1. Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv senast den 1 oktober 2001 och skall genast underrätta kommissionen om detta.

av följande skäl:

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

(1) I bilaga V till direktiv 67/548/EEG fastställs metoderna för bestämning av ämnens och preparats fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet. Denna bilaga måste anpassas till tekniska framsteg.

2. Medlemsstaterna skall till kommissionen överlämna texterna till de centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv och en tabell där detta direktiv jämförs med de nationella bestämmelser som antagits.

(2) I artikel 7.2 i direktiv 86/609/EEG ⁽³⁾ om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål föreskrivs följande: "Ett försök skall inte genomföras om det avsedda syftet kan uppnås med hjälp av någon annan vetenskapligt tillfredsställande metod som inte inbegriper användning av djur men ter sig rimlig och praktiskt genomförbar."*Artikel 3*Detta direktiv träder i kraft den tredje dagen efter det att det har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

(3) Kommissionen har för avsikt att i bilaga V till direktiv 67/548/EEG införa alternativa testmetoder som inte inbegriper användning av djur för att dessa metoder skall kunna användas för att testa kemiska ämnen.

Artikel 4

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

(4) De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Kommittén för anpassning till teknisk utveckling av direktiven om avskaffandet av tekniska handelshinder för farliga ämnen och preparat.

Utfärdat i Bryssel den 25 april 2000.

På kommissionens vägnar

Margot WALLSTRÖM

Ledamot av kommissionen

(*) Antagen före den tjugosjätte anpassningen.

⁽¹⁾ EGT 196, 16.8.1967, s. 1.⁽²⁾ EGT L 199, 30.7.1999, s. 57.⁽³⁾ EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

BILAGA I

"B.40. HUDKORROSIVITET

1 **METOD**1.1 **Inledning**

Europeiska centret för validering av alternativa provningsmetoder (ECVAM, Gemensamma forskningscentret, Europeiska kommissionen) har bedömt två *in vitro*-test för hudkorrosivitet – bestämning av transkutant elektriskt motstånd i rått hud (TER) och ett test där en modell av human hud används – som vetenskapligt validerade (1) (2) (3). Vid ECVAM-valideringsstudien påvisades att båda testerna gav tillförlitliga resultat när det gällde att skilja mellan kända korrosiva och icke-korrosiva ämnen. Med försöksprotokollet baserat på modell av human hud kunde man dessutom framgångsrikt skilja mellan olika grader av korrosivitet (kända starkt korrosiva ämnen, R35 och andra korrosiva ämnen, R34) (2). Föreliggande dokument innehåller beskrivningar och förfaranden för båda testerna. Valet av test för ett visst ändamål beror på användarens specifika krav och preferenser.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 **Definitioner**

HUDKORROSIVITET: förmågan hos ett testämne som har applicerats på huden att framkalla irreversibla vävnadsskador.

1.3 **Referensämnena**

Inga referensämnena har specificerats. Se dock punkterna 1.5.3.4 och 1.7.2.3.

1.4 **Princip för testmetoden – Bestämning av TER i rått hud**

Testämnet appliceras och får verka upp till 24 timmar på ytan av hudbitar från humant avlivade unga råttor. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att framkalla skador på hudens hornlager och störningar i den normala barriärfunktionen, vilket kan fastställas som en sänkning av hudens transkutana elektriska motstånd (TER) under ett tröskelvärde (5 k Ω) (4) (5). Irriterande och icke-irriterande material framkallar ingen sänkning av TER under tröskelvärdet. För surfaktanter och neutrala organiska ämnen kan testförfarandet kompletteras med ett färgämnesbindningssteg (för definition, se hänvisning (6)) i syfte att minska antalet falska positiva resultat som ofta fås med dessa kemikalietyper (2) (7).

1.5 **Beskrivning av testmetoden – bestämning av TER i rått hud**1.5.1 *Djur*

För beredningen av hudbitar behövs unga råttor (20–23 dagar, Wistar eller motsvarande stam). Råttornas rygg- och flankhår avlägsnas omsorgsfullt med en liten pälsklippsmaskin. Djuren tvättas genom omsorgsfull avtorkning och det hårlösa området dränks med antibiotikalösning (som kan innehålla t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol eller amfotericin i tillräcklig koncentration för att hindra bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika tre eller fyra dagar efter den första tvätten och måste därefter användas inom 3 dagar (djur som används för beredning av hudbitar får inte vara äldre än 31 dagar).

1.5.2 *Beredning av hudbitar*

Djuren avlivas på humant sätt. Rygg huden från varje djur tas tillvara och allt överskottsfett avlägsnas omsorgsfullt. Huden placeras över ändan av ett rör av PTFE (polytetrafluoroetylen) med epidermisytan mot röret. En O-ring av gummi trycks över rörets änd för att hålla hudbiten på plats och överskottshud trimmas bort. Rörets och O-ringens mått framgår av figur 1. Därefter förseglas O-ringen omsorgsfullt till PTFE-röret med paraffin. Röret stöds av en fjäderklämma innanför en receptorkammare som innehåller magnesiumsulfatlösning (154 mM) (figur 2).

1.5.3 *Testförfarande*1.5.3.1 *Applicering av testämne*

Testämnen i vätskeform (150 μ l) appliceras på epidermisytan inuti röret (figur 2). Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela epidermisytan täcks. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 μ l) på det fasta ämnet och röret omskakas varsamt. Testämnet bör ha maximal kontakt med huden. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testämnet smälter. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulater eller pulver.

Varje testämne appliceras på tre hudbitar. Testämnet får verka 24 timmar (se även 1.5.3.4) och avlägsnas därefter genom sköljning med kranvattenstråle (upp till 30 °C). Sköljningen bör pågå till dess att inget ämne längre fås bort. Testämne som har fastnat i röret kan sköljas bort med varmt vatten (cirka 30 °C).

1.5.3.2 TER-mätningar

För TER-mätningen används en LCR-mätare för lågspänning och växelström (t.ex. AIM 401, AIM 6401 eller motsvarande). För att sänka hudens ytspänning före motståndsmätningen tillförs etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka epidermisytan. Etanolen får verka i några sekunder och hålls sedan ur röret. Därefter behandlas vävnaden med 3 ml magnesiumsulfatlösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 2). Elektrodernas mått och elektrodslängden under krokodilklämman framgår av figur 1. Den inre (tjocka) elektrodslämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodslängden inne i magnesiumsulfatlösningen hålls konstant. Den yttre (tunna) elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten skall hållas konstant (figur 1) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet.

Observera att om det uppmätta motståndsvärdet överstiger ett så högt värde som 20 kΩ kan detta bero på att hudbitens epidermisyta är täckt av testämne. För att få bort ämnet kan man t.ex. sluta till PTFE-röret med tummen (som bör skyddas med handske) och skaka om röret i cirka 10 sekunder, hålla ut magnesiumsulfatlösningen och upprepa mätningen med ny magnesiumsulfatlösning.

De resulterande medelvärdena är godtagbara om samtliga positiva och negativa kontrollvärden faller inom det godkända området för metoden. I tabellen nedan anges förslag till kontrollämnen samt motsvarande godkända motståndintervall för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Motståndintervall (kΩ)
Positiv	10 M saltsyra (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Destillerat vatten	10-25

1.5.3.3 Modifierat förfarande för surfaktanter och neutrala organiska ämnen

Om testämnet är en surfaktant eller neutralt organiskt ämne och TER-värdet är lägre eller lika med 5 kΩ kan falska positiva resultat sällas ut genom bestämning av färgämnespenetrationen i vävnaderna (2).

1.5.3.3.1 Applicering och avlägsnande av färgämne (Sulforhodamine B)

Efter den första behandlingen med testämne appliceras 150 µl 10-procentig (vikt i volym) lösning av färgämnet i destillerat vatten på epidermisytan av alla hudbitar. Lösningen får verka i 2 timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle under cirka 10 sekunder. Hudbitarna tas försiktigt bort från PTFE-rören och varje hudbit placeras i en burk (t.ex. en 20 ml scintillationsburk i glas) som innehåller avjoniserat vatten (8 ml). Burkarna omskakas varsamt under 5 minuter för att avlägsna ytterligare överskott (obundet färgämne). Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentigt (vikt i volym) natriumdodekylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C. Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs. Den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (t.ex. 1 ml + 4 ml) med 30-procentigt (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mätes vid cirka 565 nm.

1.5.3.3.2 Beräkning av färgämneshalten

Färgämneshalten per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit och därefter beräknas en medelhalt för alla hudbitarna. Resultaten är godtagbara om samtliga kontrollvärden faller inom de godkända intervallen för metoden. I tabellen nedan ges förslag på godtagbara intervall för kontrollämnens färgämneshalt för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämneshalten (µg/bit)
Positiv	10 M saltsyra (36 %)	40-100
Negativ	Destillerat vatten	15-35

1.5.3.4 Tilläggsinformation

Det är också möjligt att låta testämnen verka på hudbitarna under kortare tid (t.ex. 2 timmar) i syfte att identifiera ämnen som är starkt korrosiva. Det visade sig dock vid valideringsstudien att TER-bestämning efter 2 timmars kemikaliepåverkan gav överdrivna resultat avseende flera kemikaliers korrosivitetspotential (2), trots att en korrekt identifiering av korrosiva och icke-korrosiva kemikalier kunde göras efter 24 timmars verkningstid.

Testutrustningens egenskaper och mått samt det använda testförfarandet kan påverka de uppmätta TER-värdena. Korrosivitetströskeln på 5 kΩ härleddes från data som erhållits med den specifika utrustning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Om försöket utförs under betydligt annorlunda förhållanden kan avvikande tröskel- och kontrollvärden erhållas. Det rekommenderas därför att metoden och motståndets tröskelvärde kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som valts ut bland de kemikalier som använts i valideringsstudien (3).

1.6 Princip för testmetoden – bestämning med modell av human hud

Testämnet appliceras och får verka upp till 4 timmar på ytan av en tredimensionell modell av human hud som består av rekonstruerad epidermis med funktionellt hornlager. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att efter fastställda exponeringsperioder framkalla en sänkning av cellernas viabilitet (vilket kan fastställas t.ex. med MTT-reduktionsbestämning) under definierade tröskelvärden. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret (genom diffusion eller erosion) och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celledöd i underliggande cellskikt.

1.7 Beskrivning av testmetoden – bestämning med modell av human hud

1.7.1 Modeller av human hud

Modeller av human hud kan härröra från olika källor men måste uppfylla vissa kriterier. Modellen måste ha ett funktionellt hornlager med ett underliggande lager levande celler och hornlagrets barriärfunktion måste vara tillräcklig. Tillräcklig barriärfunktion kan påvisas genom demonstration av hudmodellens beständighet vad gäller cytotoxicitet. Detta görs genom att applicera ämnen som veterligen är cytotoxiska för celler men som normalt inte passerar hornlagret. Man måste kunna påvisa att hudmodellen ger reproducerbara resultat under definierade försöksförhållanden.

Hudmodellens levande celler måste ha tillräcklig viabilitet för att det skall uppstå en skillnad mellan resultatet för positivt och negativt kontrollämne. Cellernas viabilitet (t.ex. uppmätt genom MTT-reduktion, dvs. ett OD-värde) efter exponering för det negativa kontrollämnet måste falla inom godtagbara gränser för den berörda modellen. Likaså måste cellernas viabilitetsvärden för det positiva kontrollämnet (i förhållande till värdena för det negativa kontrollämnet) falla inom fastställda gränser. Det viktigaste kriteriet är att den förutsägarhetsmodell som används måste ha påvisats uppfylla internationella valideringsstandarder (2).

1.7.2 Testförfarande

1.7.2.1 Applicering av testämne

Ämnen i vätskeform måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka hudens yta (minst 25 µl/cm²). Ämnen i fast form måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka huden och därefter måste ämnet fuktas för att säkerställa god kontakt med huden. I vissa fall måste ämnen i fast form pulveriseras före appliceringen. Appliceringsmetoden måste bevisligen vara lämplig för ett stort antal olika kemikalietyper (2). I slutet av exponeringsperioden skall testämnet omsorgsfullt tvättas bort från hudytan med saltlösning.

1.7.2.2 Mätning av cellernas viabilitet

Cellernas viabilitet kan mätas med valfri validerad metod. Den oftast använda bestämningsmetoden är MTT-reduktion, som har visat sig ge exakta och reproducerbara resultat i olika laboratorier (2). Hudbitarna får ligga 3 timmar i en MTT-lösning (0,3 mg/ml) vid 20–28°C. Den utfällda blå formazanprodukten extraheras med lösningsmedel och formazanhalten mäts genom OD-bestämning vid en våglängd mellan 545 och 595 nm.

1.7.2.3 Tilläggsinformation

Den hudmodell som används och det exakta protokollet för exponeringstid, tvättningsförfaranden och dylika faktorer har stor inverkan på resultaten avseende cellernas viabilitet. Det rekommenderas att metoden och förutsägbarhetsmodellen kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som väljs ut bland de kemikalier som användes i ECVAM-valideringsstudien (3). Ett avgörande kriterium är att metoden bevisligen är reproducerbar inom och mellan laboratorier för ett stort antal olika kemikalier, i enlighet med internationella standarder. Metoden bör minst uppfylla de fastställda kriterierna för vetenskaplig validitet (2) och resultaten från en sådan valideringsstudie måste publiceras i en kollegialt granskad vetenskaplig tidskrift.

2 DATA

2.1 Hantering av resultaten

2.1.1 TER i rått hud

Motståndsvärden ($k\Omega$) för testämnet, positiva och negativa kontrollämnen samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

2.1.2 Bestämning med modell av human hud

OD-värden och beräknade värden för cellernas procentuella viabilitet för testämnet, positiva och negativa kontrollämnen samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

2.2 Utvärdering och tolkning av resultaten

2.2.1 TER i rått hud

Om TER-medelvärdet som fås för testämnet är högre än $5 k\Omega$ är testämnet icke-korrosivt. Om TER-värdet är lägre eller lika med $5 k\Omega$ (och det inte gäller en surfaktant eller neutralt organiskt ämne) är testämnet korrosivt.

För surfaktanter eller neutrala organiska ämnen som ger TER-värden lägre eller lika med $5 k\Omega$ kan testförfarandet kompletteras med färgämnespenetrering. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är större eller lika med motsvarande värde i den positiva kontroll som samtidigt utförs med 36 % HCl är testämnet sant positivt och därmed även korrosivt. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är lägre än motsvarande värde i den positiva kontrollen är testämnet falskt positivt och därmed icke-korrosivt.

2.2.2 Bestämning med modell av human hud

Ett negativt OD-kontrollvärde betyder 100 % viabilitet för cellerna och därför kan de OD-värden som fås för vart och ett prov användas för att beräkna en procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen. Innan metoden kan valideras måste det viabilitetsgränsvärde som skiljer korrosiva testämnen från icke-korrosiva (eller som skiljer mellan olika grader av korrosivitet) definieras på ett klart sätt i förutsägbarhetsmodellen, och vid påföljande valideringsstudie måste påvisas att gränsvärdet är lämpligt (2).

3 RAPPORTERING

Testrapport

Testrapporten måste innehålla minst följande information:

Testämne

- identifierande data, fysikalisk natur och i tillämpliga fall fysikalkemiska egenskaper. Motsvarande information bör lämnas för eventuella referensämnen.

Försöksförhållanden

- Detaljerade uppgifter om det testförfarande som har använts.
- Beskrivning av och motivering för eventuella modifieringar.

Resultat

- Tabelluppställning med testämnets motståndsvärden (TER-bestämning) eller cellernas procentuella viabilitet (bestämning med modell av human hud), positiva och negativa kontroller och eventuella standardreferenskemikalier, inbegripet data för replikat eller upprepade försök och medelvärden.
- Beskrivning av eventuella andra observerade verkningar.

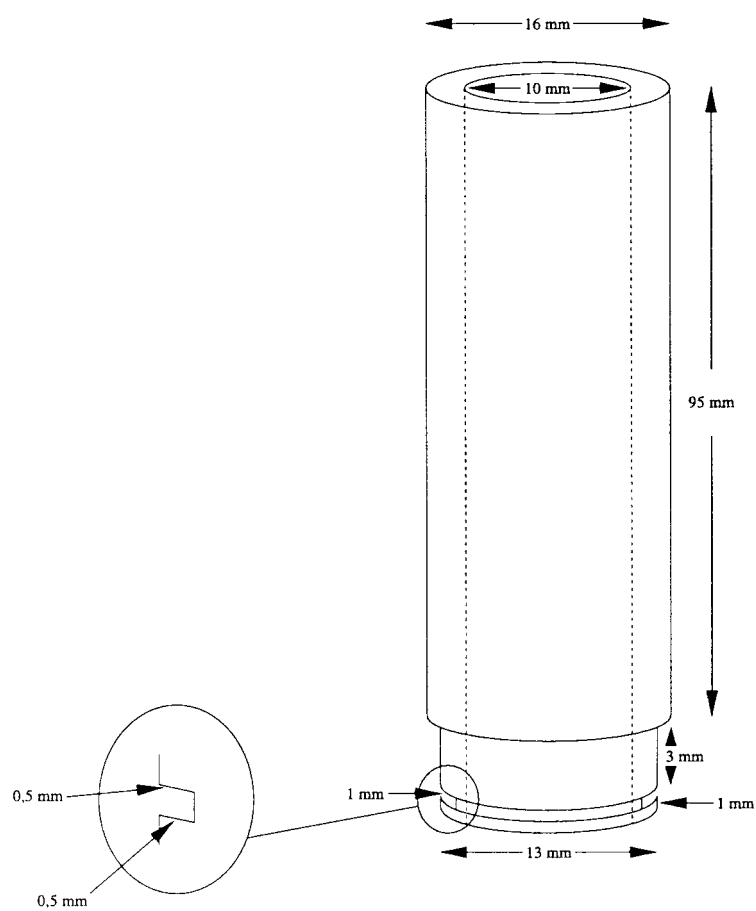
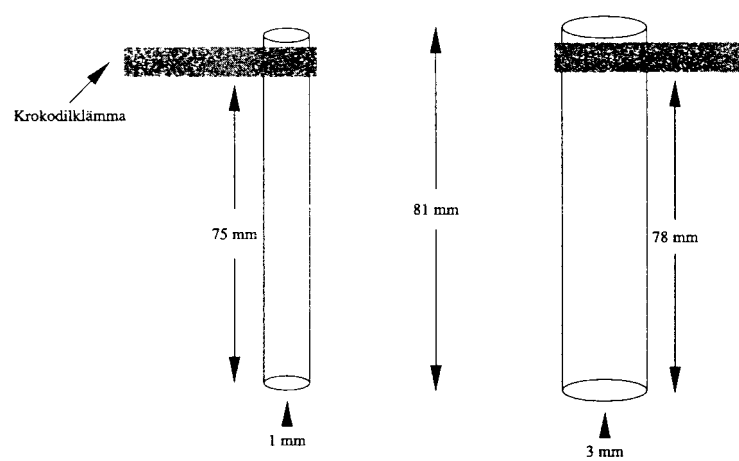
*Diskussion om resultaten**Slutsatser*

4

HÄNVISNINGAR

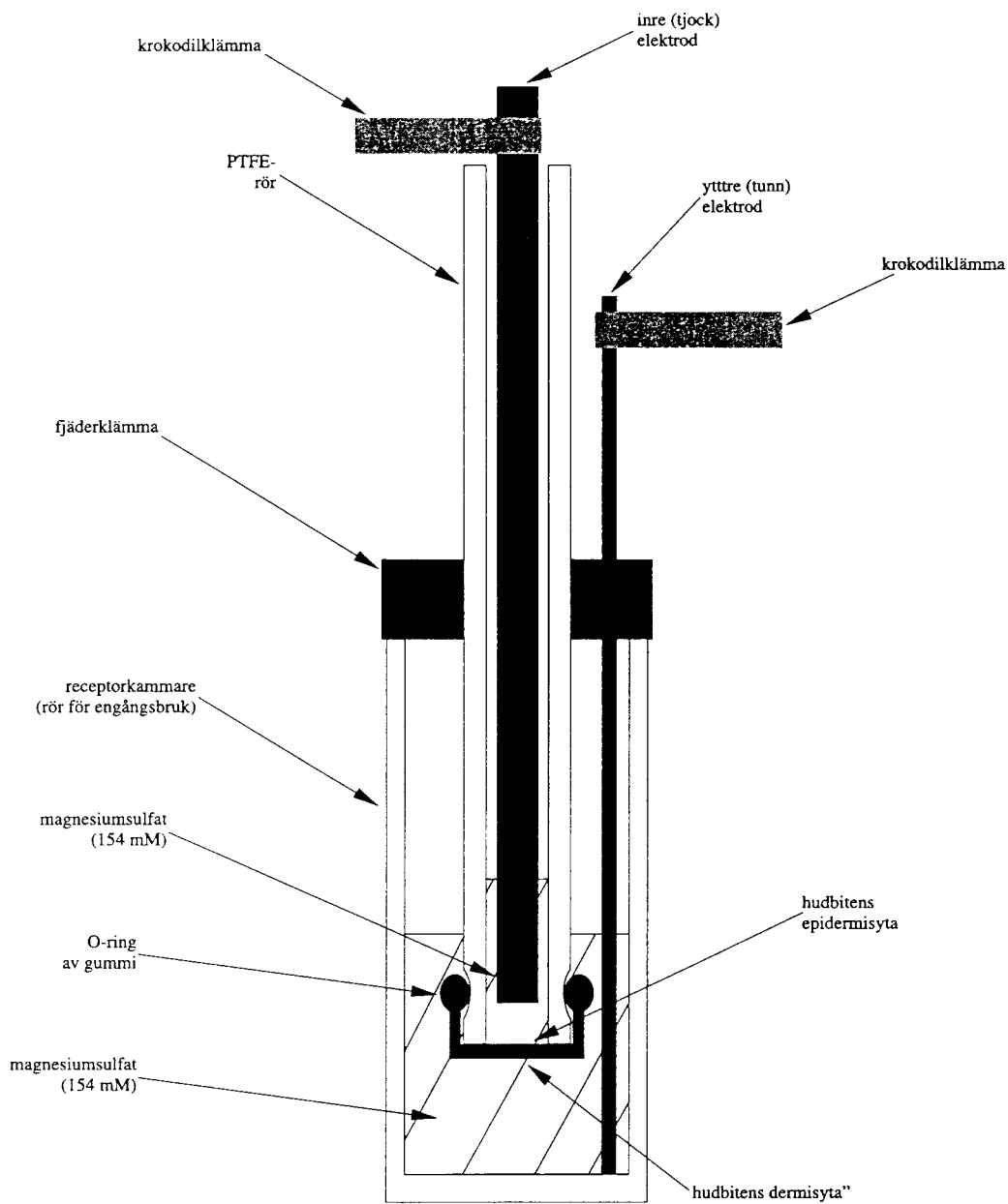
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, s. 275–280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation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

Figur 1

PTFE-rörets mått**Elektrodens mått**

Figur 2

Utrustning för bestämning av TER i råttthud



BILAGA II

"B.41. FOTOTOXICITET – 3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*"1. **METOD**1.1 **Inledning**

Fototoxicitet definieras såsom toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

Den information som erhållits från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* kan användas för att identifiera den fototoxiska potentialen hos ett testämne, dvs. huruvida testämnet kan ge upphov till skador eller inte i kombination med exponering för UV-strålning och synligt ljus.

Den toxikologiska slutpunkten för *in vitro*-testet består av fastställandet av fototoxicitet som framkallas genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, och därför kan testet användas för att identifiera både föreningar som är fototoxiska *in vivo* efter systemisk applicering och fördelning på huden, och föreningar som har fotoirriterande egenskaper efter applicering på hudens yta.

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* utvecklades och validerades inom ramen för ett gemensamt EU/COLIPA-projekt 1992–1997 (1) (2) (3) i syfte att få fram ett adekvat *in vitro*-alternativ till de olika *in vivo*-tester som var i bruk. Ett OECD-arbetsmöte lämnade 1996 rekommendationer om en sekventiell *in vitro*-testmetod för bedömning av fototoxicitet (4).

Resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* jämfördes med akuta fototoxicitets- och fotoirritationsverknings *in vivo* hos djur och människor, och testet har visat sig ge utmärkt förutsägbarhet vad gäller dessa verkningar. Avsikten med testet är inte att förutsäga andra skadliga verkningar som kan uppstå genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, t.ex. fotogenotoxicitet, fotoallergi och fotokarcinogenitet, även om många kemikalier med sådana specifika egenskaper reagerar positivt vid 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*. Testet är inte heller avsett att användas för bedömning av fototoxisk potential.

En sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet presenteras i tillägget.

1.2 **Definitioner**

Strålning: Intensiteten hos ultraviolett (UV) eller synligt ljus som når en yta, uttryckt i W/m² eller mW/cm².

Ljusdos: Den mängd (= intensitet × tid) ultraviolett (UV) eller synlig strålning som når en yta, uttryckt i Joule (= W × s) per ytenhet, t.ex. J/m² eller J/cm².

UV-ljusets våglängdsområden: CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) rekommenderar följande uppdelning: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) och UVC (100–280 nm). Även andra uppdelningar förekommer – gränsen mellan UVB och UVA sätts ofta vid 320 nm och UVA kan uppdelas i UV-A1 och UV-A2 med en gräns vid cirka 340 nm.

Cellviabilitet: En parameter för att mäta en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. upptag av det vitala färgämnet neutralrött i cellernas lysosomer). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet celler och deras vitalitet.

Relativ cellviabilitet: Cellviabiliteten uttryckt i förhållande till negativa kontroller (med lösningsmedel) som har tagits fortlöpande under hela testförfarandet (+ UV eller – UV), utan behandling med testkemikalie.

Förutsägbarhetsmodell: En algoritm som används för att omvandla resultaten från ett toxicitetstest till förutsägelse av toxisk potential. I föreliggande testriktlinjer kan PIF och MPE användas för att omvandla resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* till en förutsägelse av fototoxisk potential.

PIF (fotoirritationsfaktor): En faktor som fås genom att jämföra två cytotoxiska koncentrationer (EC₅₀) av testkemikalien som ger samma effekt i frånvaro (–UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

MPE (Mean Photo Effect): Ett nytt mått som har härletts från matematisk analys av den fullständiga formen hos två koncentrations-responskurvor som erhållits i frånvaro (–UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

Fototoxicitet: Akut toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

Fotoirritation: Ett underbegrepp av termen 'fototoxicitet'. Begreppet används endast för att beskriva sådana fototoxiska reaktioner som uppstår i huden efter kemikalieexponering (på huden eller oralt) och som alltid leder till icke-specifika cellskador (reaktioner av typen solbrännskador).

Fotoallergi: En förvärvad immunologisk reaktivitet som inte uppkommer vid en första behandling med kemikalie och ljus, och som behöver en induktionsperiod på en eller två veckor innan hudens reaktionsbenägenhet kan påvisas.

Fotogenotoxicitet: Genotoxisk respons som observeras med en genetisk slutpunkt. Denna framkallas efter att cellerna har exponerats för en icke-genotoxisk dos av UV/synligt ljus och en icke-genotoxisk kemikalie.

Fotokarcinogenitet: Karcinogenitet som induceras genom upprepad behandling med ljus och kemikalie. Termen 'foto-co-karcinogenes' står för att en kemikalie förstärker UV-inducerad tumorigenes.

1.3 Referensämnen

För upprättandet av 3T3 NRU-fototoxicitetstest rekommenderas, utöver användning av den positiva kontrollkemikalien klorpromazin som vid varje bestämning bör testas parallellt, att referenskemikalierna väljs ut ur den uppsättning kemikalier som användes i de laboratorier som deltog i provningarna för det aktuella testet (1) (3) (13).

1.4 Bakgrund

Många typer av kemikalier har rapporterats orsaka fototoxiska verkningar (5) (6) (7) (8). Dessa kemikaliers enda gemensamma egenskap är förmågan att absorbera ljusenergi inom solljusets våglängdsområde. Enligt fotokemins första lag (Grotthaus-Drapers lag) är tillräcklig absorption av ljuskvanta förutsättningen för en fotoreaktion. Innan man planerar biologisk testning av en kemikalie enligt de aktuella testriktlinjerna bör man därför fastställa den berörda kemikalies absorptionspektrum avseende UV/synligt ljus (t.ex. enligt OECD:s testriktlinjer 101). Om den molära extinktions- eller absorptionskoefficienten ligger under 10 liter $\times$ mol⁻¹ $\times$ cm⁻¹ har kemikalien ingen fotoreaktiv potential och behöver inte testas med 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* eller annat biologiskt test av skadliga fotokemiska effekter (bilaga 1).

1.5 Princip för testmetoden

Man har identifierat fyra mekanismer som kan resultera i fototoxisk respons genom att ljus absorberas av en (kemisk) kromofor (7). Alla fyra mekanismer leder till cellskador. Därför bygger 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* på en jämförelse av cytotoxiciteten hos en kemikalie när den testas exponerad respektive icke-exponerad för en icke-cytotoxisk dos av UVA/synligt ljus. Cytotoxiciteten uttrycks då som en koncentrationsberoende minskning av upptaget av det vitala färgämnet neutralrött (NR) (9) 24 timmar efter behandling med testkemikalien och påföljande bestrålning.

Balb/c 3T3-celler hålls i kultur under 24 timmar för monolayerbildning. Två 96-hålsplattor per testkemikalie förinkuberas i en timme med åtta olika koncentrationer av kemikalien. Därefter exponeras den ena av de två plattorna för en icke-cytotoxisk dos (5 J/cm² UVA) av UVA/synligt ljus (+UV-provning) medan den andra plattan hålls i mörker (-UV-provning). Sedan byter man ut båda plattornas behandlingsmedium mot kulturmedium (närlösning) och efter ytterligare 24 timmars inkubering bestäms cellviabiliteten med neutralrött-upptag (NRU) i 3 timmar. Den relativa cellviabiliteten, uttryckt som en procentandel jämfört med obehandlade negativa kontrollprov, beräknas för envar av de åtta testkoncentrationerna. Därefter uppskattas den fototoxiska potentialen genom jämförelse av den koncentrationsrespons som erhålls i närvaro (+UV) och i frånvaro (-UV) av strålning, i regel på nivån EC₅₀, dvs. den koncentration som minskar cellviabiliteten med 50 % jämfört med de obehandlade kontrollproverna.

1.6 Kvalitetskriterier

Cellernas UVA-känslighet, historiska data: Cellerna skall regelbundet kontrolleras avseende UVA-känslighet. Cellerna sås ut med samma täthet som i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*, bestrålas följande dag med UVA-doser på 1–9 J/cm² och en dag senare bestäms cellernas viabilitet med NRU-metoden. Cellerna uppfyller kvalitetskriterierna om deras viabilitet efter bestrålning med 5 J/cm² UVA är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Vid den högsta UVA-dosen på 9 J/cm² bör viabiliteten vara minst 50 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Kontrollen bör upprepas cirka var tionde cellpassage.

Negativkontrollcellernas UVA-känslighet, aktuell test: Testet uppfyller kvalitetskriterierna om +UVA-försökets negativkontrollceller (celler i EBSS – Earl's Balanced Salt Solution) med eller utan 1 % dimetylsulfoxid (DMSO) eller 1 % etanol (EtOH) har en viabilitet som är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade celler i likadan lösning i det parallella mörkerexperimentet (-UVA).

Negativkontrollcellernas viabilitet: Den absoluta optiska densiteten ($OD_{540\text{ NRU}}$) uppmätt för negativkontrollcellernas NR-extrakt indikerar om de 1×10^4 celler som har såtts ut per hål har vuxit med normal dubblingstid under de två dagar bestämningen pågår. Ett test uppfyller kriterierna för godkännande om medelvärdet för $OD_{540\text{ NRU}}$ hos obehandlade kontrollceller är $\geq 0,2$.

Positivkontrollämne: Varje 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* skall åtföljas av parallelltest av en känd fototoxisk kemikalie. Vid EU/COLIPA-valideringsstudien användes klotpromazin (CPZ) som positivkontrollämne och denna kemikalie kan därför rekommenderas. För CPZ som hade testats enligt standardprotokollet i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* definierades följande kriterier för godkännande: CPZ bestrålat (+UVA): $EC_{50} = 0,1\text{--}2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$, CPZ obestrålat (–UVA): $EC_{50} = 7,0\text{--}90,0\text{ }\mu\text{g/ml}$. Fotoirritationsfaktorn (PIF), dvs. brytpunkten för EC_{50} , bör vara minst 6.

I stället för CPZ kan även andra kända fototoxiska kemikalier, lämpliga för den kemiska klass eller de löslig-hetsgenskaper som gäller för testkemikalien, användas vid de parallella positivkontrollerna. I sådant fall skall historiska data användas som hjälp för att definiera de värdeområden för EC_{50} och för PIF eller MPE som används som kriterier för godkännande.

1.7 Beskrivning av testmetoden

1.7.1 Förberedelser

1.7.1.1 Celler

För valideringsstudien användes en etablerad musfibroblastcellinje – Balb/c 3T3, klon 31 – antingen från ATCC eller från ECACC, som därför kan rekommenderas. Andra celler eller cellinjer kan med framgång användas med samma testprotokoll, förutsatt att odlingsbetingelserna anpassas till cellernas specifika behov. Motsvarigheten måste demonstreras.

Cellerna skall regelbundet kontrolleras med avseende på mykoplasmaförorening och får endast användas när resultatet från en sådan kontroll är godtagbart.

Eftersom cellernas UVA-känslighet kan öka med antalet passager skall Balb/c 3T3-celler med lägsta möjliga passagenummer användas, helst under 100. Det är viktigt att Balb/c 3T3-cellernas UVA-känslighet kontrolleras enligt det kvalitetskontrollförfarande som beskrivs i dessa riktlinjer.

1.7.1.2 Media och odlingsbetingelser

Lämpliga näringslösningar och inkuberingsbetingelser bör användas för vanliga cellpassager och under testförfarandet. Balb/c 3T3-celler DMEM-kompletteras med 10 % serum från nyfödd kalv, 4 mM glutamin, penicillin och streptomycin samt inkubering i fuktig atmosfär vid 37°C och 7,5 % CO_2 . Det är särskilt viktigt att man med cellodlingsbetingelserna kan säkerställa en cellcykeltid inom det normala historiska intervallet för de celler eller den cellinje som används.

1.7.1.3 Beredning av kulturer

Celler från djupfrysta stamkulturer sås ut i näringslösningen i lämplig täthet och subkultiveras minst en gång innan de används i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*.

För fototoxicitetstestet sås testcellerna ut i näringslösningen med sådan täthet att odlingarna inte växer samman före avslutat test, dvs. när cellviabiliteten bestäms 48 timmar efter utsådden. För Balb/c 3T3-celler som odlas på 96-hålsplattor rekommenderas tätheten 1×10^4 celler per hål.

För varje testkemikalie sås celler ut på samma sätt på två separata 96-hålsplattor som därefter parallellt används genom hela testförfarandet under identiska odlingsförhållanden, med undantag av den tidsperiod då den ena plattan bestrålas (+UVA/synligt ljus) och den andra hålls i mörker (–UVA/synligt ljus).

1.7.1.4 Metabolisk aktivering

Metaboliserande system är ett allmänt krav för alla *in vitro*-test som används för förutsägelse av genotoxisk och karcinogen potential, men när det gäller fototoxicitet känner man än så länge inte till någon kemikalie där metabolisk omvandling krävs för att kemikalien skall fungera fototoxiskt *in vivo* eller *in vitro*. Det är därför varken nödvändigt eller vetenskapligt motiverat att det aktuella testet genomförs med ett system som har metabolisk aktivering.

1.7.1.5 Testkemikalie – beredning

Testkemikalierna måste ha beretts omedelbart före användningen, om man inte med stöd av stabilitetsdata kan visa att kemikalierna är lagringsbeständiga. Om det är sannolikt att kemikalien har hög sönderfallshastighet under inverkan av ljus måste beredningen genomföras under rött ljus.

Testkemikalierna skall lösas upp i buffrade saltlösningar, t.ex. EBSS (Earl's Balanced Salt Solution) eller PBS (fosfatbuffrad saltlösning). Saltlösningarna får inte innehålla proteinkomponenter eller ljusabsorberande pH-indikatorfärger som kan störa bestrålningsresultatet.

Testkemikalier med begränsad vattenlöslighet skall lösas upp i lämpligt lösningsmedel i en koncentration som är 100 gånger högre än den önskade och därefter spädas ut i förhållandet 1:100 med den buffrade saltlösningen. Om lösningsmedel används måste detta förekomma i en konstant volymkoncentration på 1 % i alla odlingar, dvs. både i de negativa kontrollerna och i alla koncentrationer av testkemikalien.

Som lösningsmedel rekommenderas dimetylsulfoxid (DMSO) och etanol (EtOH). Andra lösningsmedel med låg cytotoxicitet (t.ex. aceton) kan vara lämpliga men måste utvärderas omsorgsfullt med avseende på specifika egenskaper, t.ex. reaktionsbenägenhet med testkemikalien, dämpning av den fototoxiska verkan eller benägenhet att fånga upp radikaler.

Vid behov kan man använda Vortex-blandning, ultraljudsbehandling eller uppvärmning till 37°C för att underlätta upplösningen.

1.7.1.6 UV-bestrålning – beredning

Ljuskälla: Lämplig ljuskälla i kombination med lämplig filtrering är den viktigaste faktorn vid testning av fototoxicitet. I regel förknippas UVA och de synliga våglängdsområdena med fotosensibilisering (7) (10), medan UVB har mindre relevans och är direkt mycket cytotoxisk – cytotoxiciteten ökar 1000-faldigt när våglängden minskar från 313 till 280 nm (11). Kriterierna för valet av lämplig ljuskälla bör inbegripa det grundläggande kravet om att ljuskällan emitterar våglängder som absorberas av testkemikalien och att ljusdosen (den dos som uppnås inom skälig tid) är tillräcklig för detektering av kända fotosensibilisatorer. Dessutom får de våglängder och doser som används inte vara otillbörligt skadliga för testsystemet, vilket inbegriper värmeemission (infraröda området).

Det optimala är att använda simulerat solljus från en solsimulator. I solsimulatorer används både xenonbåglampor och (dopade) kvicksilver-metallhalidbåglampor. Fördelen med de senare är att de emitterar mindre värme och är billigare, men ljusets likhet med solljus är inte perfekt. Alla solsimulatorer emitterar betydande mängder UVB och bör därför förses med lämpliga filter för att dämpa de mycket cytotoxiska UVB-våglängderna.

Det strålningsspektrum som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* måste vara praktiskt taget fritt från UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Man har offentliggjort ett exempel på den spektrala strålningsdistributionen från den filtrerade solsimulator som användes i valideringsstudien för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (3).

Dosimetri: Ljusets (strålningens) intensitet skall före varje fototoxicitetstest rutinmässigt kontrolleras med hjälp av en bredbands UV-mätare. UV-mätaren måste ha kalibrerats mot källan och dess prestanda bör kontrolleras. För detta ändamål rekommenderas användning av en referensmätare, dvs. en annan, identiskt kalibrerad UV-mätare av samma typ. Helst skall man även då och då använda en spektrometriometer för att mäta den spektrala strålningen från den filtrerade ljuskällan och för att kontrollera UV-mätarnas kalibrering. Användningen av sådana instrument är dock mycket krävande och förutsätter tillbörligt utbildad personal.

I valideringsstudien konstaterades att en dos på 5 J/cm² (UVA) inte var cytotoxisk för Balb/c 3T3-celler men ändå tillräckligt stark för att excitera även svagt fototoxiska kemikalier. För att uppnå 5 J/cm² inom en tidsperiod på 50 minuter måste strålningen ställas in på 1,666 mW/cm². Om en annan cellinje eller en annan ljuskälla används måste UVA-dosen eventuellt justeras i någon mån. Som kriterium skall då gälla att strålningen inte får vara skadlig för cellerna men tillräcklig för detektering av vanliga fototoxiska ämnen. Tiden för ljusexponeringen beräknas på följande sätt:

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

1.7.2 Försöksförhållanden

Testkemikalies maximikoncentration får inte överskrida 100 µg/ml, eftersom alla fototoxiska kemikalier detekterades vid lägre koncentrationer. Vid högre koncentrationer ökar återigen förekomsten av falska positiva utslag (13). Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör ha ett tillfredsställande pH-värde (pH-område: 6,5–7,8).

Koncentrationsområdena för en kemikalie som skall testas i närvaro (+UVA) respektive i frånvaro (–UVA) av ljus skall först fastställas på lämpligt sätt i förberedande försök. Koncentrationsseriens område och intervall skall justeras på sådant sätt att försöksdata ger tillräckligt underlag för koncentrations-responskurvorna. Koncentrationsserierna skall vara geometriska (dvs. ha konstant utspädningsfaktor).

1.7.3 Testförfarande⁽¹⁾

1.7.3.1 Dag 1

Bered en cellsuspension på 1×10^5 celler/ml i näringslösning och dosera 100 µl ren näringslösning i de perifera hålen av en 96-håls TC-mikroplatta (= blindprov). Dosera 100 µl cellsuspension med 1×10^5 celler/ml i de återstående hålen (= 1×10^4 celler/hål). Det behövs två plattor per kemikalie: en för bestämning av cytotoxicitet (–UVA) och en för bestämning av fotocytotoxicitet (+UVA).

Inkubera cellerna i 24 timmar (7,5% CO₂, 37°C) för att få bildning av halvkonfluent monolayer. Denna inkuberingsperiod är tillräcklig för cellernas återhämtning och vidhäftning samt exponentiell tillväxt.

1.7.3.2 Dag 2

Dekantera näringslösningen från cellerna efter inkuberingen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS per hål. Tillsätt 100 µl EBSS/PBS som innehåller lämplig koncentration av testkemikalien eller rent lösningsmedel (negativ kontroll). Använd 8 olika koncentrationer av testkemikalien. Inkubera cellerna med testkemikalie i mörker i 60 minuter (7,5% CO₂, 37°C).

Utför bestämnings +UVA-del genom att bestråla cellerna vid rumstemperatur i 50 minuter genom 96-hålsplattans lock med 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Ventilera med en fläkt för att förebygga kondensbildning under locket. Håll parallellplattorna (–UVA) vid rumstemperatur i en mörk låda i 50 minuter (=UVA-exponeringstiden).

Dekantera testlösningen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS. Ersätt EBSS/PBS med näringslösning och inkubera (7,5% CO₂, 37°C) över natten (18–22 timmar).

1.7.3.3 Dag 3

Utvärdering med mikroskop

Undersök cellerna i faskontrastmikroskop. Notera alla ändringar i cellernas morfologi till följd av cytologiska verkningar av testkemikalien. Denna undersökning rekommenderas som kontroll i syfte att utesluta experimentella fel men resultatet används inte för utvärdering av cytotoxicitet eller fototoxicitet.

Test med upptagning av neutralrött

Tvätta cellerna med 150 µl föruppvärmd EBSS/PBS. Avlägsna tvättlösningen genom att klappa försiktigt. Tillsätt 100 µl NR-medium och inkubera vid 37°C, i fuktig atmosfär med 7,5% CO₂ i 3 timmar.

Avlägsna NR-mediet efter inkuberingen och tvätta cellerna med 150 µl EBSS/PBS. Dekantera och absorbera EBSS/PBS helt och hållet. (Alternativt: centrifugera omvänd platta.)

Tillsätt exakt 150 µl NR-desorptionslösning (färsk lösning av etanol och ättiksyra).

Skaka plattan snabbt i en skakmaskin i 10 minuter för att extrahera NR ur cellerna och få ett homogent NR-extrakt.

Mät NR-extraktets optiska densitet vid 540 nm i en spektrofotometer och använd blindproven som referens. Spara data i lämpligt filformat (t.ex. ASCII) för efterföljande analys.

⁽¹⁾ Närmare detaljer finns i hänvisning 12.

2. DATA

2.1 Kvalitet och kvantitet hos data

Erhållna data bör ge möjlighet till meningsfull analys av den koncentrationsberoende respons som konstateras i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus. Om cytotoxicitet detekteras skall både koncentrationsområdet och intervallet för enskilda koncentrationer anpassas så att försöksdata kan sammanställas till en kurva. Eftersom en testkemikalie kan vara icke-cytotoxisk upp till den definierade gränskoncentrationen på 100 µg/ml i mörkerförsöket (-UVA) men mycket cytotoxisk när den bestrålas (+UVA), måste man eventuellt använda koncentrationsområden av olika storleksordningar för de två delarna av försöket i syfte att få adekvat kvalitet på data. Om kemikalien inte uppvisar cytotoxicitet i någondera försöksdelen (-UVA och +UVA) är det tillräckligt att testa med stort intervall mellan enskilda doser upp till den högsta koncentrationen.

Klart positiva resultat behöver inte verifieras genom upprepade försök. Dessutom behöver klart negativa resultat inte verifieras förutsatt att testkemikalien har testats vid tillräckligt höga koncentrationer. I sådana fall är det tillräckligt med ett huvudförsök som stöds av ett eller flera preliminära försök för bestämning av område.

Om man får testresultat som kommer nära förutsägarhetsmodellens gräns måste resultaten verifieras genom upprepat test.

Om upprepat test behövs kan det vara viktigt att variera försöksförhållandena för att få ett tydligt resultat. En nyckelvariabel är då beredningen av testkemikalilösningarna. Därför kan variationer i beredningen (hjälpmedel, sönderdelning, ultraljudsbehandling) ha mycket stor relevans vid en upprepning. Alternativt kan man överväga variation av inkuberingstiden före bestrålningen. En kortare bestrålningstid kan ha betydelse när det gäller kemikalier som inte är stabila i vatten.

2.2 Hantering av resultaten

När detta är möjligt fastställs den koncentration av testkemikalien som motsvarar en minskning på 50 % av cellernas NR-upptag (EC₅₀). Detta kan genomföras med hjälp av valfri icke-linjär regressionsprocedur (helst en Hill-funktion eller logistisk regressionsanalys) för koncentrations-responsdata, eller med hjälp av andra anpassningsprocedurer (14). Innan ett EC₅₀-värde används för ytterligare beräkningar skall anpassningens kvalitet kontrolleras på tillbörligt sätt. Alternativt kan man använda grafiska anpassningsmetoder för beräkning av EC₅₀. I sådant fall rekommenderas användning av sannolikhetspapper (x-skala: log, y-skala: probit) eftersom funktionen för koncentrationsrespons efter denna omvandling i många fall blir nästan linjär.

2.3 Utvärdering av resultaten (förutsägarhetsmodeller)

2.3.1 Förutsägarhetsmodell version 1: Fotoirritationsfaktor (PIF)

Om man som resultat får fullständiga koncentrations-responskurvor både i närvaro (+UVA) och i frånvaro (-UVA) av ljus, kan en fotoirritationsfaktor (PIF) beräknas med hjälp av följande formel:

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

En PIF-faktor under 5 tyder på att kemikalien inte har fototoxisk potential, medan en PIF-faktor ≥ 5 tyder på fototoxisk potential.

Om en kemikalie endast är cytotoxisk när den testas med +UVA men inte är cytotoxisk när den testas med -UVA kan PIF inte beräknas, även om detta är ett resultat som tyder på fototoxisk potential. I ett sådant fall kan man beräkna ett '>PIF'-värde om (-UV)-cytotoxicitetstestet genomförs upp till den högsta testkoncentrationen (C_{max}) och detta värde används för beräkning av '>PIF':

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

Om endast '>PIF' kan erhållas tyder varje värde större än 1 på fototoxisk potential.

Om varken EC₅₀ (-UV) eller EC₅₀ (+UV) kan beräknas på grund av att en kemikalie inte uppvisar någon cytotoxicitet upp till den högsta testkoncentrationen, tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential. I sådana fall används ett formellt värde 'PIF=*1' för att karakterisera resultatet:

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

Om endast 'PIF = * 1' kan erhållas tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential.

I fall (b) och fall (c) skall resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* omsorgsfullt beaktas vid förutsägelser av den fototoxiska potentialen.

2.3.2 Förutsägbarhetsmodell version 2: MPE (Mean-Photo-Effect)

Alternativt kan en ny version av modellen för förutsägbarhet av den fototoxiska potentialen tillämpas. Denna nya version har tagits fram med hjälp av data från EU/COLIPA-valideringsstudien (15) och har testats under blindförhållanden i en efterföljande studie om *in vitro*-fototoxiciteten hos UV-filterkemikalier (13). Med stöd av denna modell kan man överkomma PIF-modellens begränsningar i fall där EC₅₀ inte kan erhållas. Modellen stöder sig på MPE, ett mått som grundar sig på jämförelse av de fullständiga koncentrations-responskurvorna. MPE-modellen tillämpas med hjälp av ett datorprogram som har utvecklats speciellt för ändamålet vid Humboldt-universitetet (Berlin, Tyskland) och som kan rekvireras kostnadsfritt.

2.4 Tolkning av resultaten

Ett positivt resultat i 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF ≥ 5 eller MPE $\geq 0,1$) indikerar att testämnet har fototoxisk potential. Om resultatet fås med koncentrationer under 10 µg/ml är det sannolikt att testkemikalien också fungerar som fototoxin under olika exponeringsförhållanden *in vivo*. Om positivt resultat endast fås med den högsta testkoncentrationen på 100 µg/ml kan det vara nödvändigt med ytterligare överväganden för bedömningen av risk eller fototoxisk potential. Sådana kan inbegripa data om penetrering, absorption och möjlig ackumulering av kemikalien i huden, eller testning av kemikalien i ett bekräftande alternativt test, t.ex. med modell av human hud *in vitro*.

Ett negativt resultat från 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF < 5 eller MPE $< 0,1$) indikerar att testämnet under gällande förhållanden inte är fototoxiskt för de odlade däggdjurscellerna. I fall där kemikalien kan testas upp till den högsta koncentrationen på 100 µg/ml indikerar ett negativt resultat att kemikalien saknar fototoxisk potential och att fototoxicitet *in vivo* kan anses osannolik. I fall där identisk koncentrations-toxicitetsrespons (EC₅₀+UV och EC₅₀-UV) fås vid lägre koncentrationer skall data tolkas på samma sätt. Om däremot ingen fototoxicitet kan påvisas (+UV och -UV) och om begränsad vattenlöslighet medför att man inte kan få koncentrationer på över 100 µg/ml, måste testämnets lämplighet för bestämningen ifrågasättas och bekräftande testning bör övervägas (t.ex. med modell av human hud *in vitro*, hudmodell *ex vivo* eller *in vivo*-test).

3 RAPPORTERING

Testrapport

Testrapporten skall innehålla följande uppgifter:

Testkemikalier:

- identifieringsdata och CAS-nr (i mån av tillgänglighet),
- fysikalisk form och renhetsgrad,
- fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien,
- stabilitet och fotostabilitet (i mån av tillgänglighet).

Lösningsmedel:

- motivering för valet av lösningsmedel,
- testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet,
- procenthalten lösningsmedel i behandlingsmediet (EBSS eller PBS).

Celler:

- typ av celler och deras källa,
- frånvaron av mykoplasma,
- antalet cellpassager (i mån av tillgänglighet),
- cellernas UVA-känslighet, bestämd med den bestrålningsutrustning som använts för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro*.

Försöksförhållanden (a) – inkubering före och efter behandlingen:

- näringslösningens (kulturmediets) typ och sammansättning,
- inkuberingsförhållanden (CO₂-koncentration, temperatur, fuktighet),
- inkuberingens varaktighet (förbehandling, efterbehandling).

Försöksförhållanden (b) – behandling med kemikalien:

- motivering för valet av de koncentrationer av testkemikalien som använts i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UV/synligt ljus,
- om testkemikalien är begränsat löslig och om cytotoxicitet inte föreligger, motivering för den högsta koncentration som testats,
- typ av och sammansättning hos behandlingsmediet (buffrad saltlösning),
- kemikaliebehandlingsens varaktighet.

Försöksförhållanden (c) – bestrålning:

- motivering för valet av den ljuskälla som använts,
- ljuskällans spektrala strålningsegenskaper,
- transmissions- och absorptionssegenskaper hos filter som använts,
- radiometerns egenskaper och närmare uppgifter om kalibreringen,
- avstånd mellan ljuskälla och testsystem,
- UVA-bestrålning på detta avstånd, uttryckt i mW/cm^2 ,
- varaktigheten hos bestrålningen med UV/synligt ljus,
- UVA-dos (bestrålning $\times$ tid), uttryckt i J/cm^2 ,
- temperatur som använts för cellodlingarna under bestrålningen och för cellodlingar som parallellt hållits i mörker.

Försöksförhållanden (d) – NRU test:

- sammansättning hos NR-mediet,
- NR-inkuberingens varaktighet,
- inkuberingsförhållanden (CO_2 -koncentration, temperatur, fuktighet),
- NR-extraktionsbetingelser (extraktionsmedel, varaktighet),
- våglängd som använts för spektrofotometrisk avläsning av optisk densitet för NR,
- annan våglängd (referens), om sådan har använts,
- spektrofotometerblindprovets innehåll, om blindprov har använts.

Resultat:

- cellviabilitet som erhållits vid varje koncentration av testkemikalien, uttryckt som genomsnittlig procentuell andel jämfört med kontrollernas viabilitet,
- koncentrations-responskurvor (testkemikaliekoncentration i förhållande till relativ cellviabilitet), som erhållits i parallella försök med +UVA och -UVA,
- dataanalys av koncentrations-responskurvorna: om möjligt beräkning av EC_{50} (+UVA) och EC_{50} (-UVA),
- jämförelse av de två koncentrations-responskurvorna som erhållits i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus, antingen genom beräkning av PIF eller genom beräkning av MPE,
- klassificering av fototoxisk potential,
- kriterier för godkännande av testet (a) – parallell negativkontroll:
 - absolut viabilitet (optisk densitet hos NR-extrakt) hos bestrålade och obestrålade celler,
 - historiska data för negativkontroll, medelvärde och standardavvikelse.
- kriterier för godkännande av testet (b) – parallell positivkontroll:
 - EC_{50} (+UVA) och EC_{50} (-UVA) och PIF för positivkontrollkemikalie,
 - historiska data för positivkontrollkemikalie: EC_{50} (+UVA) och EC_{50} (-UVA) och PIF, medelvärde och standardavvikelse

*Diskussion av resultaten**Slutsatser*

4. HÄNVISNINGAR

- (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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 314–348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, s. 79–110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, s. 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, s. 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, s. 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, s. 679–708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, s. 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, s. 445–462.

Tillägg

Rollen hos 3T3 NRU-fototoxicitetstest i en sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet

