

ДИРЕКТИВА 2000/33/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 25 април 2000 година

за привеждане в съответствие с техническия прогрес за 27-ми път на Директива 67/548/ЕИО на Съвета относно сближаването на законовите, подзаконовите и административни разпоредби относно класифицирането, опаковането и етикетирането на опасни вещества *

(Текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 67/548/ЕИО на Съвета от 27 юни 1967 г. относно сближаването на законовите, подзаконовите и административни разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества¹, последно изменена от Директива 1999/33/ЕО на Европейския парламент и на Съвета², и по-специално член 28 от нея,

като има предвид, че:

- (1) Приложение 5 към Директива 67/548/ЕИО определя методите за определяне на физикохимическите свойства, токсичността и екотоксичността на веществата и препаратите. Необходимо е това приложение да се приведе в съответствие с постиженията на техническия прогрес.
- (2) Съгласно член 7, параграф 2 от Директива 86/609/ЕИО на Съвета от 24 ноември 1986 г. за сближаване на законовите, подзаконовите и административните разпоредби на държавите-членки по отношение на защита на животните, използвани за опитни и други научни цели³, експеримент, при който се налага използването на животни не следва да бъде провеждан, ако съществува и е практически достъпен друг научен метод, с помощта на който да се постигнат търсените резултати.
- (3) Комисията възнамерява да въведе в приложение 5 към Директива 67/548/ЕИО алтернативни тест-методи, при които не се използват животни, с цел запазването им за тестване на химични вещества в съответствие с член 3, параграф 1 от Директива 67/548/ЕИО.
- (4) Предвидените в настоящата директива мерки са в съответствие със Становището на Комитета по адаптиране на директивите към техническия прогрес за премахване на техническите бариери пред търговията с опасни вещества и препарати,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

* Приета преди 26-та адаптация

¹ ОВ 196, 16.8.1967 г., стр.1.

² ОВ L 199, 30.7.1999 г., стр.57.

³ ОВ L 358, 18.12.1986 г., стр.1.

Член 1

Текстовете в приложение I и приложение II към настоящата директива се добавят към част Б на приложение V към Директива 67/548/ЕИО.

Член 2

1. Държавите-членки приемат и публикуват не по-късно от 1 октомври 2001 г. необходимите закони, подзаконови и административни разпоредби, за да се съобразят с настоящата директива. Те незабавно информират Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условиата и редът на позоваване се определят от държавите-членки

2. Държавите-членки уведомяват Комисията за текста на основните разпоредби от националното си законодателство в областта, регулирана от настоящата директива, както и таблица на съответствието между разпоредбите на настоящата директива и приетите национални разпоредби.

Член 3

Настоящата директива влиза в сила на третия ден от датата на публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 25 април 2000 година.

За Комисията:

Magot WALLSTRÖM

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

‘Б.40. Корозия на кожата

1. МЕТОД

1.1 Въведение

Двата теста *in vitro* за корозивност на кожата, едно изследване на транскутантната електрическа резистентност (ТЕР) при плъховете и един тест с използване на модела на човешката кожа са одобрени като научно обосновани от Европейския център за утвърждаване на алтернативни методи (ECVAM) (1) (2) (3). Проучването за утвърждаване, направено от ECVAM показва, че и двата теста дават възможност да се диференцират познатите кожни корозивни вещества от не-корозивните. Освен това, протоколът от теста, основаващ се на модела на човешката кожа, позволява точно разграничение между степените на корозивните ефекти (познати като тежки кожни корозиви, R35, и други кожни корозиви, R34)(2). Описанията и процедурите по двата теста са дадени по-долу; изборът на определен тест зависи от специфичните изисквания и предпочитания на потребителя.

Виж също “Общо въведение”, част Б.

1.2. Дефиниции

Корозия на кожата: необратимо увреждане на кожата, вследствие на прилагането на проучвания материал.

1.3. Референтни вещества

Не са уточнени, но виж т.1.5.3.4 и 1.7.2.3.

1.4. Принцип на тест-метода – кожен тест ТЕР при плъхове

Материалът за тестване се поставя за 24 часа върху епидермалната повърхност на кожни проби, взети от необработени кожи на хуманно убити млади плъхове. Корозивните материали се идентифицират според способността им да предизвикват загуба на целостта при нормална слоеста структура на роговия слой, както и нарушаване на предпазната му функция, което се измерва като намаление на вродената ТЕР под определено прагово ниво(5 кΩ)(4)(5). Дразнещи и недразнещи материали не намаляват ТЕР под праговото ниво. В тестовата процедура може да се включи стъпка за свързване на повърхностно-активни и неутрални органични вещества (за дефиниция виж (6) с багрилно вещество, с цел намаляване на неверните положителните резултати, получавани специфично с тези химични видове (2) (7).

1.5. Описание на тест - метода – кожен тест ТЕР при плъхове

1.5.1. Животни

За подготовката на кожни проби се изискват млади (20-23 дневни) плъхове (от порода Wistar или подобна). Козината по гърба и хълбоците се отстранява внимателно с малки животински ножици. След това животните се измиват внимателно, като областта се обработва с антибиотичен разтвор (съдържащ, например стрептомицин, пеницилин, хлорамфеникол или амфотерицин в концентрация, инхибираща ефективно бактериалния растеж). Животните се измиват отново с антибиотичен разтвор на третия или четвъртия ден след първото измиване, и се използват в рамките на 3 дни (за да се използват за кожни проби, животните не трябва да са по-стари от 31 дни).

1.5.2. Подготовка на кожни проби

Животните се убиват по хуманен начин. Отстранява се кожата от гърба на всяко животно, като излишната мазнина внимателно се отделя чрез обелване от кожния слой. Необработената кожа се поставя върху една политетрафлуоретиленов (PTFE) тръба така, че повърхността на епидермиса да е в контакт с тръбата. Гумен пръстен с формата на буквата “О” е вкаран плътно върху единия край на тръбата така, че да държи кожата, а излишната тъкан се отстранява. Размерите на тръбата и на О-образния гумен пръстен са показани на фигура 1. Посредством гумения пръстен се запечатва единия край на тръбата с керосинов клей. Тръбата се поддържа от пружинен клипс(скоба) във вътрешността на рецепторна камера, съдържаща разтвор на магнезиев сулфат(154 mM) (фигура 2).

1.5.3. Процедура за тестване

1.5.3.1. Прилагане на материала за тестване

Проучваните течни вещества (150µl) се прилагат върху епидермалната повърхност, намираща се в тръбата (фигура 2). Ако се тестват твърди материали, необходимо е да се приложи достатъчно количество от твърдия материал върху пробата, така че цялата повърхност на епидермиса да бъде покрита. Добавя се дейонизирана вода (150µl) до върха на материала и тръбите внимателно се разклащат. Тестваните вещества следва да имат плътен контакт с кожата. За някои вещества това може да бъде постигнато посредством нагряването им до 30° C с цел разтопяване на веществото или чрез стриване до получаване на гранули или прах.

За всяко проучвано вещество се използват по три кожни проби. Проучваните вещества се прилагат в продължение на 24 часа (виж също 1.5.3.4). Тестваното вещество се отстранява на струя течаща вода при температура до 30° C до пълното отстраняване на материала. Отстраняването на втвърдилите се в тръбата проучвани вещества може да се улесни чрез измиването им със струя вода с температура приблизително 30° C.

1.5.3.2. Измервания на ТЕР

ТЕР се измерва като се използва мост с нисковолтов, променлив ток (AIM 401 или 6401, или еквивалентен на тях). Преди измерване на електрическото съпротивление повърхностното напрежение на кожата се намалява, като епидермисът се покрива достатъчно добре със 70% разтвор от етанол (етилов алкохол). След няколко секунди етанолът се отстранява, като тръбата се обръща и тъканта се хидратира с добавяне на 3 ml разтвор на магнезиев сулфат (154 mM). Електродите на измервателния мост се поставят от двете страни на кожната проба, за да се получи измерване на съпротивлението в $k\Omega$ /кожна проба (диск) (фигура 2). Размерите на електродите, а също и размерите на непокритата им част под “крокодилските” клипси, са показани на фигура 1. По време на измерване на съпротивлението придържащият вътрешния (дебел) електрод “крокодилски” клипс, остава на върха на тefлоновата тръба, така че да осигури потопяването на достатъчна дължина от електрода в разтвора от магнезиев сулфат. Външният (тънък) електрод се поставя във вътрешността на рецепторната камера, така че да опира на нейното дъно. Разстоянието от долната повърхност на пружинения клипс до дъното на тefлоновата тръба се поддържа постоянно (фиг.1), тъй като то влияе на измереното съпротивление.

Да се има предвид, че ако измереното съпротивление надвишава 20 $k\Omega$, това може да се дължи на слоя проучвано вещество, покриващо епидермалната повърхност на кожния диск. Отстраняването на този слой може да се извърши, като например тefлоновата тръба се запуши с пръст от ръкавица, след това се разклати за около 10 секунди; разтворът от магнезиев сулфат се отстранява и измерването на резистентността (съпротивлението) се повтаря с нов магнезиев сулфат.

Получените средни резултати за ТЕР се приемат при условие, че едновременно проведените положителни и отрицателни контроли попадат в рамките на допустимите за метода. Предложените контролни вещества и съответните им допустими области за транскутанна електрическа резистентност според възприетата методология и апаратура, са дадени по-долу:

Контрола	Вещество	Област на резистентност ($k\Omega$)
Положителна	10 М солна киселина(36%)	0,5-1,0
Отрицателна	Дестилирана вода	10-25

1.5.3.3. Променена процедура за повърхностно-активни и неутрални органични вещества

Ако стойностите на ТЕР за проучваните вещества, които са или повърхностно-активни или неутрални органични вещества, са по-малки или равни на 5 $k\Omega$, следва да се направи оценка на степента на проникване на багрилното вещество в тъканта. Тази процедура определя дали резултатите са невярно положителни (2).

1.5.3.3.1. Приложение и отстраняване на багрилото сулфородамин Б

След начална обработка с проучваното вещество, 150 µl от 10%(w/v) разтвор на сулфородамин Б в дестилирана вода, се прилага върху епидермалната повърхност на всеки кожен диск в продължение на 2 часа. След това кожните дискове се измиват на струя течаща вода при стайна температура за около 10 секунди, за да се отстрани излишното(несвързано) багрило. Всеки кожен диск се изважда от тefлоновата тръба и се поставя в стъкленица (20 ml стъклен чист съд), съдържаща дейонизирана вода (8ml). Стъклениците се разклащат внимателно за около 5 минути с цел отстраняване на останалото излишното(несвързано) багрило. Тази процедура на изплакване се повтаря, след което кожните дискове се изваждат и поставят в стъкленици, съдържащи 5 ml от 30%(W/v) разтвор на натриев додецилсулфат (НДС) в дестилирана вода, и се инкубират в продължение на една нощ при температура 60 °C. След инкубирането всеки кожен диск се отделя и отстранява, като останалият разтвор се центрофугира в продължение на 8 мин. при температура 21 °C (относителна центрофугираща сила ~175). Проба от 1 ml суперанатант се разрежда в отношение 1 в 5(v/v) (т.е. 1 ml + 4ml) със 30% (w/v) НДС в дестилирана вода. Оптичната плътност на разтвора се измерва при дължина на вълната около 565 nm.

1.5.3.3.2. Изчисляване съдържанието на багрилото

Съдържанието на багрилото сулфородамин Б във всяка проба се изчислява според стойностите на оптичната плътност (коэффициентът на моларна екстинкция на сулфородамин Б при дължина на вълната 565 nm = $8,7 \times 10^4$; молекулярно тегло = 580). Съдържанието на сулфородамин Б се определя за всеки кожен диск по отделно, след което за повторните тестове се изчислява средна величина. Средните резултати за свързването на багрилото се приемат при условие, че стойностите на едновременно извършените контролни тестове, попадат в обсега на допустимите за метода. Предлагащите приемливи области за съдържание на багрилото в контролните вещества по отношение на методологията и апаратурата, са дадени по-долу:

Контрола	Вещество	Област на съдържанието на багрилото (mg/проба)
Положителна	10 М солна киселина(36%)	40-100
Отрицателна	Дестилирана вода	15-35

1.5.3.4. Допълнителна информация

Проучваните вещества могат да бъдат приложени върху кожните дискове за по-кратки периоди (например 2 часа) с цел идентифициране на онези материали, които са силно корозивни. Проучване за установяване на валидност открива, че определянето на ТЕР надценява корозивния потенциал на няколко проучвани химически вещества след прилагането им върху кожните дискове за период от 2

часа (2), въпреки, че точно са идентифицирани корозивните и не-корозивните вещества след 24 - часово прилагане.

Свойствата и размерите на опитната апаратура и използваната експериментална процедура могат да окажат влияние върху получените стойности за ТЕР. Прагът за корозивност от 5 кΩ е уточнен според данните, получени със специалната апаратура и процедура, описани в този метод. В случай, че опитните условия са променени значително, то тогава се използват друг праг и контролни стойности. Ето защо се препоръчва методологията и стойността на прага на резистентност да бъдат калибрирани посредством тестване на серия от референтни стандарти, избрани от химическите вещества, използвани в проучването за валидност (3).

1.6. **Принцип на тест – метода – анализ на човешкия модел на кожата**

Проучваните материали се прилагат в продължение на 4 часа локално, към три-измерен модел на човешката кожа, представляващ реконструиран епидермис с функционален рогов слой. Корозивните материали се идентифицират според тяхната способност да предизвикват намаляване на жизнеността на клетките (определя се например, чрез използването на теста за намаляване на МТТ) под определени прагови нива при определени експозиционни периоди. Принципът на опита е в съответствие с хипотезата, че корозивните химически вещества са тези, които са способни да проникнат в роговия слой (чрез дифузия или ерозия) и са достатъчно цитотоксични, за да причинят смърт на клетките в подлежащите клетъчни слоеве.

1.7. **Описание на метода за тестване – анализ на човешкия модел на кожата**

1.7.1. *Модели на човешката кожа*

Моделите на човешката кожа произхождат от различни източници и трябва да отговарят на определени критерии. Моделът следва да притежава функционален рогов слой с подлежащ слой от живи клетки. Пазещата (бариерната) функция на роговия слой следва да бъде адекватна. Това може да се докаже чрез определяне на резистентността на модела към цитотоксичността, последвала прилагането на вещества, познати като цитотоксични към клетките, но които нормално не преминават през роговия слой. Моделът следва да дава резултати при определени експериментални условия.

Жизнеспособността на живите клетки на модела следва да е достатъчно висока, за да разграничи добре положителните от отрицателните контролни вещества. Клетъчната жизнеспособност (например, измерена със степента на понижаването на МТТ, т.е. стойността на оптичската плътност -ОП) след излагане на действието на отрицателно контролно вещество следва да попадне в приемливи за съответния модел граници. По подобен начин стойностите за клетъчна жизнеспособност под действие на положителното контролно вещество (отнесени към тези за отрицателната контрола) следва също да попаднат в определени граници. Най-важното е да се покаже, че използваният предсказващ модел отговаря на утвърдените международни стандарти(2).

1.7.2. *Процедура за тестване*

1.7.2.1. Прилагане на проучвания материал

По отношение на течните материали, следва да се приложи достатъчно количество от проучваното вещество, така че да се покрие повърхността на кожата (минимално $25\mu\text{l}/\text{cm}^2$). По отношение на твърдите материали, следва да се приложи достатъчно количество от проучваното вещество, така че да се покрие повърхността на кожата, последната да бъде навлажнена с цел осигуряване на добър контакт с нея; при необходимост твърдите вещества, преди използването им, могат да бъдат стрити на прах. Трябва да се докаже, че прилаганият метод е подходящ за широк набор от химически вещества (2). В края на експозиционния период, проучваният материал трябва да бъде измит внимателно от кожата повърхност с физиологичен разтвор.

1.7.2.2. *Определяне на жизнеспособността на клетките*

Всеки един утвърден количествен метод би могъл да бъде използван за определяне жизнеспособността на клетките. Най-често използваният количествен метод е изследване на МТТ редуцирането, доказал, че представя точни и резултати в различни лаборатории(2). Кожният диск се поставя в МТТ разтвор с концентрация $0,3\text{ mg/ml}$ при температура $20-28^\circ\text{C}$ в продължение на 3 часа. Утайният се син формаза продукт се екстрахира (екстракция на разтворителя) и концентрацията на формаза се измерва посредством определяне на оптичната плътност при дължина на вълната между 545 и 595 nm.

1.7.2.3. *Допълнителна информация*

Използваният модел на кожата и точният протокол за времето на експозиция, както и процедурите по измиване, и.т.н. оказват най-голямо влияние върху резултатите за оценка на клетъчната жизнеспособност. Препоръчва се методологията и модел на прогнозиране да се калибрират посредством тестването на серия от референтни стандарти, избрани от химическите вещества, използвани в проучването за валидност на ECVAM(3). Изключително важно е да се покаже, че използваният метод е в рамките на всяка една и между отделните лаборатории, по отношение на широк кръг от химически вещества, в съответствие с международните стандарти. Като минимално условие се изисква методът да отговаря на критериите за научна достоверност, дефинирана предварително (2), като резултатите от такова утвърдително проучване трябва да бъдат публикувани в обзорно научно списание.

2. ДАННИ

2.1. **Обработване на резултатите**

2.1.1. Изследване на кожна ТЕР при плъховете

Стойностите за резистентност ($\text{k}\Omega$) на проучвания материал, положителните и отрицателните контроли, както и всяко стандартно референтно химическо вещество, следва да бъдат представени в таблична форма, включвайки данните за повторените експерименти, средните стойности и създадената класификация.

2.1.2. Изследване на модел на човешка кожа

Стойностите на оптичната плътност, процентните данни за клетъчната жизнеспособност на проучвания материал, положителните и отрицателните

контроли, както и всяко стандартно референтно химическо вещество, следва да бъдат представени в таблична форма, включвайки данните за повторените експерименти, средните стойности и създадената класификация .

2.2. **Оценка и интерпретация на резултатите**

2.2.1. Изследване на кожна ТЕР при плъховете

Ако получената средна стойност на ТЕР за проучваното вещество е по-голяма от 5 кΩ, то не е корозивно. Ако тя е по-малка или равна на 5 кΩ и тестваното вещество не е повърхностно-активно или неутрално органично, то е корозивно. За повърхностно-активните или неутралните органични вещества, чиято стойност за ТЕР е по-малка или равна на 5 кΩ, би могло да бъде направен тест за проникване на багрилото. В случай, че средното количество на багрилото в кожния диск е по-голямо или равно на средното съдържание на багрило в диск, съдържащ 36% солна киселина като положителна контрола, изследвана едновременно, то тогава проучваното вещество е истински положително и затова корозивно. В случай, че средното количество на багрилото в кожния диск е по-малко от средното съдържание на багрило в диск, съдържащ 36% солна киселина като положителна контрола, получена едновременно, то тогава проучваното вещество е невярно положително и затова не-корозивно.

2.2.2. Изследване на модел на човешка кожа

Стойността на отрицателната контрола на оптичната плътност представлява 100% жизнеспособност на клетката; оттук следва, че стойностите на оптичната плътност, получени за всяка проба, могат да бъдат използвани за изчисляване на процентната жизнеспособност, отнесена към отрицателната контрола. Процентната граничната прагова стойност за клетъчна жизнеспособност, разграничаваща корозивните от не-корозивните проучвани материали (или отличава различните корозивни класове), трябва да бъде ясно определен в модел на прогнозиране преди узаконяването на метода, като следващото проучване за валидност трябва да потвърди, че този праг е достоверен(2).

3. **Докладване**

Доклад за теста

Докладът за теста трябва да включва най-малко следната информация:

Проучвано вещество:

- Идентифициращи данни, физична същност и при необходимост - данни за физико-химичните свойства. Подобна информация следва да се представи и за референтните вещества, в случай че се използват.

Условия на теста:

- подробности за използваната тестова процедура,
- описание и обосновка на всякакъв вид промени.

Резултати:

-представяне в табличен вид на стойностите за резистентност (изследване на ТЕР) или процентната стойност за клетъчна жизнеспособност (изследване на модел на човешка кожа) на проучвания материал, положителните и отрицателните контроли, както и всяко стандартно референтно химическо вещество, включвайки данните за повторените експерименти и средните стойности .

-описание на всички други наблюдавани ефекти

Обсъждане на резултатите.

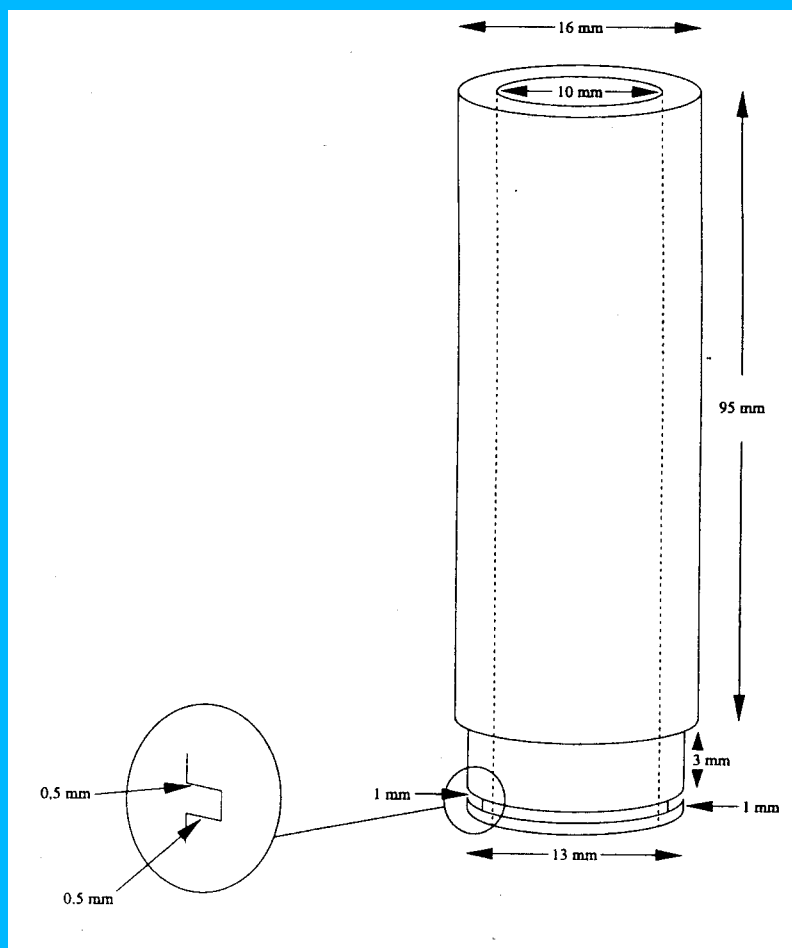
Заключения.

4. ЛИТЕРАТУРА

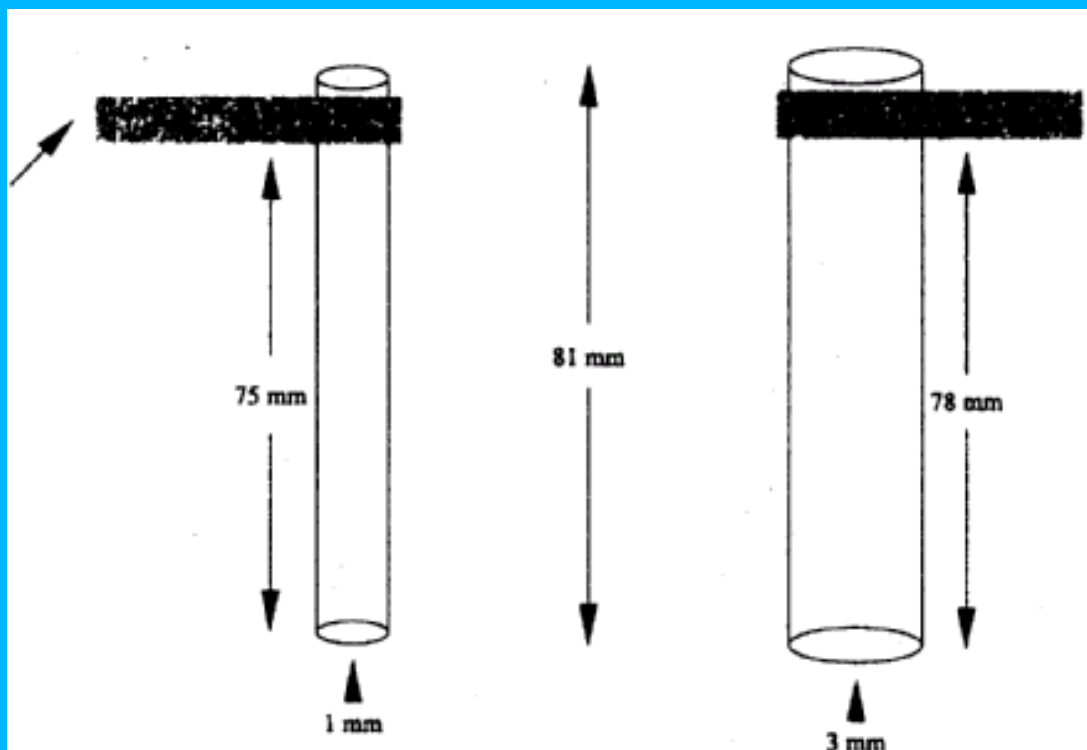
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, pp. 275-280.
- (2) Fentem, J. H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *Ин вумпо* tests for skin corrosivity. 2. Results and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

Фигура 1

Размери на тefлоновия цилиндър (грьба)



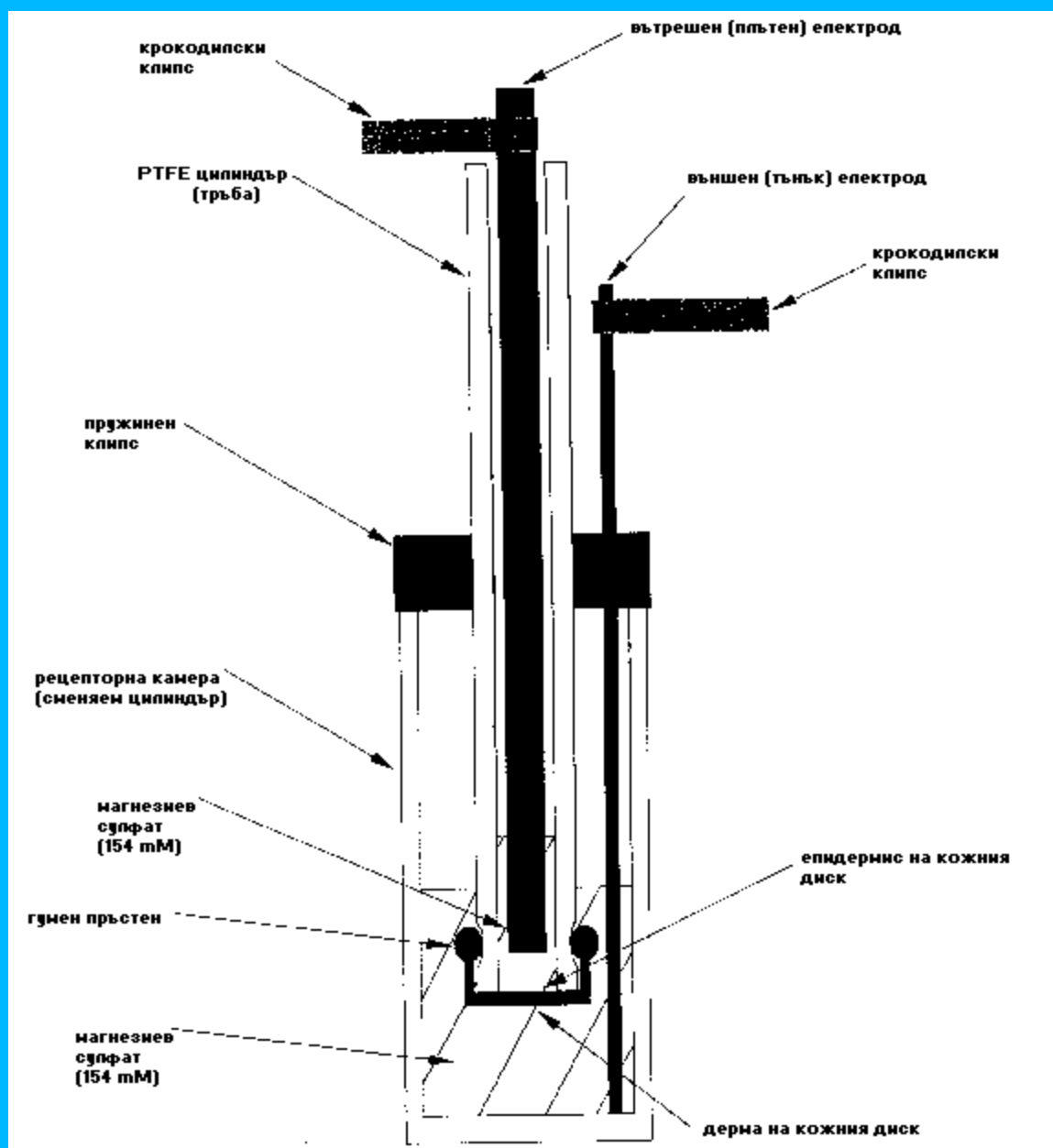
Размери на електрода



“крокодилски” клипс

Фигура 2

Апаратура за определяне на кожния ТЕР при плъхове



ПРИЛОЖЕНИЕ II

В.41.ФОТОТОКСИЧНОСТ – ИН ВИТРО 3Т3 NRU ФОТОТОКСИЧЕН ТЕСТ

1. МЕТОД

1.1 . Въведение

Фототоксичността се определя като токсична реакция, предизвикана след първото излагане на кожата на действието на определени химични вещества и последващо излагане на светлина, или реакция индуцирана по подобен начин чрез облъчване на кожата след системно прилагане на химично вещество.

Информацията, получена от фототоксичния тест *ин витро* 3Т3 NRU (поглъщане на неутрално червено), служи за определяне на фототоксичния потенциал на проучваното вещество, т.е. наличие или липса на възникване на възможни рискове от страна на тестваното вещество при експозиция на ултравиолетова и видима светлина.

Тъй като токсикологичната крайна цел на теста *ин витро*, е определяне на фотоцитотоксичността, индуцирана от комбинираното въздействие на химическото вещество и светлината, съединенията, които са фототоксични *ин vivo* след системно прилагане и разпределение в кожата, както и съединения, които действат като фотодразнителни след локално прилагане върху кожата, могат да бъдат определени чрез теста.

Фототоксичният тест *ин витро* 3Т3 NRU е разработен и утвърден в съвместен проект на Европейския съюз/Европейската федерация на проЗаклучениятелите на козметика (EU/COLIPA) от 1992-1997 (1)(2)(3) с цел утвърждаване на тест *ин витро*, алтернативен на използваните дотогава тестове *ин vivo*. През 1996 г. работна среща на Организацията за икономическо сътрудничество и развитие препоръчва провеждането на поредица от опити *ин витро*, като подход за оценка на фототоксичност (4).

Резултати от фототоксичния тест *ин витро* 3Т3 NRU са сравнени с силните ефекти на фототоксичност/фотодразнимост *ин vivo* при животни и хора, като тестът показва, че дава отлична предсказуемост на тези ефекти.

Тестът не е предназначен за прогнозиране на други неблагоприятни ефекти, които могат да възникнат при комбинираното действие на химическото вещество и светлината, т.е. фотогенотоксичност, фотоалергия и фотоканцерогенност, макар че много химически вещества, които притежават тези специфични свойства, реагират положително в фототоксичния тест *ин витро* 3Т3 NRU. Освен това, фототоксичният тест не е предназначен за оценяване на фототоксичния потенциал.

В Допълнението е представен последователен подход за тестване на химически вещества за фототоксичност.

1.2. Определения

Ирадиация: Интензитетът на ултравиолетовата(UV) или видима светлина, падаща върху повърхност, измерен в W/m^2 или mW/cm^2 .

Доза светлина: Количеството (= интензитет x време) на ултравиолетовата (UV) или видима светлина, падаща на повърхност, изразена в джаули (W x s) на единица площ, т.е. J/m² или J/cm².

Ултравиолетова дължина на вълната: означенията, препоръчани от Международната комисия, разработила цветови стандарти - CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) са: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) и UVC (100-280 nm). Използват се и други указания: разделът между UVB и UVA се поставя на 320 nm, като UVA може да бъде разделена на UV-A1 и UV-A2, разделна линия на около 340 nm.

Клетъчна жизнеспособност: параметър, измерващ общата активност на клетъчната популация (т.е. поглъщане на неутралното червено багрило в клетъчните лизозоми), който в зависимост от измерената крайна стойност и използвания проект на теста, корелира с общия брой и/или жизненост на клетките.

Относителна клетъчна жизнеспособност: клетъчната жизнеспособност, изразена по отношение на отрицателните (с разтворител) контроли, които са определяни по време на цялата тест - процедура (+UV или -UV), но без да са обработвани с тестваното химическо вещество.

Модел на прогнозиране: алгоритъм за трансформиране на резултатите от тест за токсичност в прогнозиране на токсичния потенциал. В настоящото ръководство за теста, ФФД и СФЕ могат да бъдат използвани за трансформиране на резултатите от фототоксичния тест *in vitro* 3T3 NRU за прогнозиране на фототоксичния потенциал.

ФФД (фактор на фотодразнимост): фактор, получен при сравнението на две еднакво ефективни цитотоксични концентрации (EC₅₀) на проучваното химическо вещество, получени в отсъствието (-UV) и присъствието (+UV) на не-цитотоксична ирадиация с UVA/видима светлина.

СФЕ(среден фото ефект): ново измерване, получено от математически анализ на завършените форми на двете ответни криви на концентрацията, получени в отсъствието (-UV) и присъствието (+UV) на не-цитотоксична ирадиация с UVA/видима светлина.

Фототоксичност: остра токсична реакция, предизвикана след първото излагане на кожата на действието на определени химически вещества и последващо излагане на светлина, или която е индуцирана по подобен начин от кожна ирадиация след системно прилагане на химическо вещество.

Фотодразнимост: подвид на термина “фототоксичност”, предназначен да опише само тези фототоксични реакции, които се наблюдават в кожата след излагането ѝ на химически вещества(локално или през устата). Тези фототоксични реакции винаги водят до неспецифично увреждане на клетката(подобно на реакция при слънчево изгаряне) .

Фотоалергия: придобита имунологична реактивност, която не се наблюдава при първото третиране с химическо вещество и светлина, и която се нуждае от

индукционен период от една или две седмици преди изявата на кожната реактивност.

Фотогенотоксичност: генотоксична реакция, наблюдавана при генетично промяна, предизвикана след излагане на клетки на действието на не-генотоксична доза ултравиолетова/видима светлина и не-генотоксично химическо вещество.

Фотоканцерогенност: канцерогенност, стимулирана от повтарящо се прилагане на светлина и химическо вещество. Терминът “фото ко-канцерогенност”, се използва в случай, че предизвиканата с UV туморогенеза (развитие на тумор), се засилва под действието на химично вещество.

1.3. Референтни вещества

Освен положителната контрола хлорпромазин, която следва да бъде тествана при всяко изследване, се препоръчва - при въвеждане на нов фототоксичен тест 3ТЗ NRU - да се прилагат като референтни химически вещества набор от тези, които се използват в междублабораторни изпитания с наличния тест (1) (3) (13).

1.4. Начални съображения

Съобщава се за голям брой химически вещества, които предизвикват фототоксични ефекти (5) (6) (7) (8). Единствената им обща характеристика е способността им да абсорбират светлинна енергия в слънчевия спектър. Съгласно първия закон на фотохимията (законът на Grotthaus-Draper), фотореакцията изисква достатъчно абсорбиране на светлинна квантова енергия. Така че, преди да се обсъди извършването на биологично проучване, съгласно съществуващото ръководство за теста, следва да се определи абсорбционния спектър в ултравиолетовата/видима зона светлина на проучваното химическо вещество(в съответствие с Ръководството за извършване на тестове 101 на Организацията за икономическо сътрудничество и развитие). Химическото вещество няма фотореактивен потенциал, ако моларният коефициент на екстинкция/абсорбция е по-малък от $10 \text{ литра} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, и не е нужно да бъде тествано чрез фототоксичен тест *ин витро* 3ТЗ NRU, или какъвто да е друг биологичен тест за установяване на неблагоприятни фотохимични ефекти (Допълнение).

1.5. Принцип на тест-метода

Известни са четири механизми, чрез които абсорбирането на светлина от (химически) хромофор може да предизвика фототоксична реакция(7). Всички те увреждат клетката. Ето защо фототоксичният тест *ин витро* 3ТЗ NRU се основава на сравнението на цитотоксичността на определено химическо вещество, тествано както при наличие, така и при липса на излагане на не-цитотоксична доза от UVA/видима светлина. Цитотоксичността в този тест се представя като зависимо от концентрацията намаляване на поглъщането на неутрално червено багрило(NR) (9) 24 часа след обработване с проучваните химически вещества и облъчване (иридиация).

Клетки Balb/C 3ТЗ се култивират в среда в продължение на 24 часа с цел образуване на монослое. След това две плаки с по 96 гнезда за всяко едно от

проучваните химически вещества предварително се инкубират с осем различни негови концентрации за 1 час. След това една от двете плаки се излага на действието на доза от 5 J/cm^2 не-цитотоксична UVA/видима светлина (+UV експеримент), докато другата плака се съхранява на тъмно (-UV експеримент). Опитната среда и в двете плаки се заменя с култивирана среда и след нова 24-часова инкубация, клетъчната жизнеспособност се определя с опит за поглъщане на неутрално червено (NRU) за 3 часа. Относителната клетъчна жизнеспособност се изчислява за всяка от осемте пробни концентрации и се изразява като процент от необработените отрицателни контроли. За да се предскаже фототоксичния потенциал, концентрациите, получени в присъствието (+UV) и отсъствието (-UV) на облъчване (и радиация) се сравняват, обикновено на ниво EC_{50} , т.е. при концентрацията, инхибираща клетъчната жизнеспособност с 50% в сравнение с необработените контроли.

1.6. Качествени критерии

Чувствителност на клетките към UVA, данни от предишни изследвания: клетките следва да бъдат периодично проверявани за чувствителност към UVA. Клетките се посяват при плътност, каквато се използва в фототоксичния тест *in vitro* 3ТЗ NRU, облъчват се на следващия ден с дози от 1 до 9 J/cm^2 UVA, след което един ден по-късно се определя жизнеспособността на клетката посредством NRU тест. В случай, че жизнеспособността на клетките след ирадиация с 5 J/cm^2 UVA не спада под 80% от жизнеспособността на тъмни контроли, то те отговарят на качествените критерии. Жизнеспособността на клетките не следва да бъде по-малка от 50% от тази на тъмните контроли при най-високата UVA доза от 9 J/cm^2 . Такава проверка следва да се извършва на всеки 10-ти пасаж на клетките.

UVA чувствителност на отрицателните контролни клетки, настоящ тест: тестът отговаря на критериите за качество, ако отрицателните контроли (клетки в балансиран солен разтвор на Earl (EBSS)) със или без 1% диметилсулфоксид (DMSO) или 1% етанол (EtOH) по време на +UVA експеримент показват жизнеспособност, не по-малка от 80% от тази на необлъчените клетки в същия разтворител, при едновременно протичащ експеримент на тъмно (-UVA).

Жизнеспособност на отрицателните контроли: абсолютната оптична плътност ($\text{OD}_{540\text{ NRU}}$), измерена в NR екстракт от отрицателни контроли, показва дали 1×10^4 на гнездо култивирани клетки са се размножили двойно по време на двудневния опит. Тестът отговаря на общоприетите критерии, ако средната $\text{OD}_{540\text{ NRU}}$ на необработените контроли е по-голяма или равна на 0,2.

Положителна контрола: познато фототоксично химическо вещество се проверява във всеки фототоксичен тест *in vitro* 3ТЗ. Препоръчва се хлорпромазин (ХПЗ), който е използван като положителна контрола при стандартизационния тест на Европейския съюз/Европейската федерация на проЗаклучениятелите на козметика - EU/COLIPA. За хлорпромазин, тестван според стандартния протокол по време на фототоксичния тест *in vitro* 3ТЗ, са одобрени следните критерии за приемливост на теста: облъчен (и радиран) хлорпромазин (+UVA): $\text{EC}_{50} = 0,1\text{--}2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$, необлъчен хлорпромазин (-UVA): $\text{EC}_{50} = 7,0\text{--}90,0\text{ }\mu\text{g/ml}$. Факторът за фотодразнимост (ФФД), т.е. промяната в EC_{50} , следва да бъде най-малко 6.

Други познати фототоксични химически вещества, отговарящи на химическия клас или на характеристиките за разтворимост на проучваното химическо вещество, след оценка могат да се използват като равностойни положителни контроли, заместители на хлорпромазин. В този случай, основавайки се на данни от предишни изследвания, следва да бъдат прецизно определени областта от значения за EC₅₀ и ФФД или СФЕ (среден фотоефект), като критерии за приемливост на теста.

1.7. Описание на тест - метода

1.7.1. Препарати

1.7.1.1. Клетки

Постоянна клетъчна линия от фибробласти на мишки – Balb/c 3T3, клонинг 31, получени или от ATCC или от ECACC, е използвана в проучването за стандартизация (узаконяване), заради което се и препоръчва. Ако условията за отглеждане се адаптират към специфичните нужди на клетките, то и други клетки или клетъчни линии може да се използват успешно със същия протокол за тестване, но трябва тяхната еднозначност да е доказана.

Клетките следва да бъдат редовно проверявани за микоплазмено замърсяване и следва да бъдат използвани само в случай, че резултатите са задоволителни.

Тъй като UVA чувствителността на клетките може да се увеличава с броя пасажите, следва да бъдат използвани клетки Balb/c 3T3 от най-ниския получен пасаж номер, за предпочитане по-малък от 100. Необходимо е чувствителността към UVA на клетки Balb/c 3T3 да бъде редовно проверявана, в съответствие с процедурата за контрол на качеството, описана в настоящото ръководство.

1.7.1.2. Среда и условия за отглеждане

За обичайния пасаж на клетки, както и по време на процедурата за тестване, следва да се използват подходяща среда за култивиране и условия за инкубация. По отношение на клетки Balb/c 3T3, това са DMEM, допълнен с 10% серум от новородено теле, 4 mM глутамин, пеницилин и стрептомицин; както и влажна инкубация при 37°C/7,5% CO₂. Особено важно е условията за отглеждане на клетки да осигурят времеви клетъчен цикъл в рамките на нормалния за използваните клетки или клетъчни линии.

1.7.1.3. Подготовка на култури

Клетки от замразени култури се посяват в средата за култивиране при подходяща плътност, и се прекултивират поне веднъж преди да се използват в фототоксичния тест *in vitro* 3T3 NRU.

За да изпълнят условията на теста за фототоксичност, клетките се посяват в средата за отглеждане при плътност, която да не позволи сливане на материала към края на теста, т.е. при определяне на клетъчната жизнеспособност 48 часа след посяването им. За клетки Balb/c 3T3 се препоръчва култивиране в плаки от по 96 гнезда, при плътност 1×10⁴ клетки на гнездо.

За всяко едно проучвано химическо вещество клетките се посяват по един и същ начин в две отделни плаки с по 96 гнезда всяка, обработвани едновременно по време на цялата тест – процедура, при едни и същи условия за отглеждане, с изключение на периода от време, за който една от плаките е облъчвана (+ UVA/vis), а другата е държана на тъмно (- UVA/vis).

1.7.1.4. Метаболитно активиране

Докато употребата на метаболизиращи системи е основно изискване за всички тестове *in vitro* за предсказване наличието на генотоксичен или канцерогенен потенциал, от гледна точка на фототоксикологията досега няма познато химическо вещество, за което да е необходима метаболитна трансформация, която да му позволи да действа като фототоксин *in vivo* или *in vitro*. Поради това не е нито необходимо, нито научно обосновано, настоящият тест да бъде провеждан с участието на метаболитна активираща система.

1.7.1.5. Проучвано химическо вещество/подготовка

Проучваните химически вещества трябва да бъдат приготвени непосредствено преди употреба, освен ако данните за стабилност не показват, че съхранението им е надеждно и приемливо. Изисква се подготовка на веществата под червена светлина тогава, когато е възможна бърза фотодеградация.

Проучваните химически вещества следва да бъдат разтворени в буферирани солени разтвори, напр. балансирания солени разтвор на Earle (EBSS) или фосфатен буфер (PBS), които с цел да се избегне интерференция по време на облъчване, трябва да не съдържат белтъчни компоненти, както и абсорбиращи светлина рН индикаторни оцветители.

Проучваните химически вещества с ограничена разтворимост във вода следва да бъдат разтваряни в подходящи разтворители в желаната 100-кратно по-ниска крайна концентрация, а след това разредени 1:100 с буфериран солени разтвор. Ако се използва разтворител, той трябва да присъства в постоянна концентрация от 1%(v/v) във всички култури, т.е. както в отрицателните контроли, така и във всички концентрации на тестваното химическо вещество.

Препоръчваните разтворители са диметилсулфоксид (DMSO) и етанол (EtOH). Други разтворители с ниска цитотоксичност (напр. ацетон) са също подходящи, но следва да се преценят специфичните им особености, напр. реакция с проучваното химическо вещество, потискане на фототоксичния ефект, или свързване на радикали.

С цел увеличаване на разтворимостта може, при необходимост, да се използва центрофугиране и/или излагане на слънце и/или затопляне до температура 37°C.

1.7.1.6. UV облъчване (иррадиация)/подготовка

Светлинен източник: изборът на подходящ светлинен източник и подходящо филтриране са най-критичните фактори във фототоксичния тест. UVA и областите на видима светлина се асоциират обикновено с фоточувствителността (7) (10), докато UVB е с по-малка относителна стойност и директно цитотоксичен, увеличавайки своята цитотоксичност 1000 пъти от 313 до 280

nm(11). Критерите за избор на подходящ светлинен източник следва да включват като основно изискване следното: светлинният източник да излъчва дължина на вълната, абсорбирана от химическото вещество; дозата светлина (която може бъде постигната в разумно време) да е достатъчна, за да бъде регистрирана от добре познатите фотосинтезатори. Освен това, използваните дължини на вълната и дози не следва да оказват значителна вреда на експерименталната система, което се изразява в излъчването на топлина (вълни в инфрачервената област).

Симулацията на слънчева светлина със слънчеви симулатори се счита за оптимален светлинен източник. В тях се използват ксенонови и живачно-метални (поглъщащи) халогенни волтови дъги. Последните имат предимството да излъчват по-малко топлина и да са по-евтини, но генерираната от тях светлина не отговаря точно на слънчевата. Тъй като всички слънчеви симулатори излъчват значително количество UVB, те следва да имат подходящи филтри, които да подтиснат силно цитотоксичните UVB вълни.

При прилагането на теста за фототоксичност *ин витро* 3ТЗ NRU следва да се използва излъчващ спектър, несъдържащ USB вълни (в съотношение UVA:UVB = 1:20). Публикуван е пример на разпределението на спектралното излъчване на филтрирания слънчев симулатор, използван в изследването за стандартизация (узаконяване) на фототоксичния *ин витро* 3ТЗ NRU тест(3).

Дозиметрия: интензитетът на светлина (излъчването) следва да бъде редовно проверяван преди всеки тест за фототоксичност, като се използва подходящ широколентов UV измерител. UV-измерителят следва да бъде калибриран по отношение на източника на светлина. Действието на UV-измерителя следва да се провери, като за целта се препоръчва използването на втори, референтен UV-измерител от същия тип, калибриран по същия начин. Идеален за целта е спектрорадиометър, измерващ през по-големи интервали спектралното излъчване на филтриран светлинен източник и проверяващ калибрацията на широколентовия UV-измерител, но такива инструменти предполагат значителна квалификация на обслужващия ги персонал.

В изследването за стандартизация (узаконяване) е определена доза от 5 J/cm² (UVA), не-цитотоксична за Balb/c 3ТЗ клетки, и достатъчно способна да възбуди дори слаби фототоксични химически вещества. За да се постигне 5 J/cm² в период от 50 мин., излъчването следва да бъде настроено на 1,666 mW/cm². В случай, че се използва друга клетъчна линия или светлинен източник, UVA дозата би могла да се промени, като се използват съществуващите критерии за безвредност за клетките и достатъчност за откриване на стандартни фототоксини. Времето на светлинното облъчване се изчислява по следния начин:

$$t(\text{мин}) = \frac{\text{Доза на облъчване}(\text{J} / \text{cm}^2) \times 1000}{\text{Облъчване}(\text{mW} / \text{cm}^2) \times 60}, \quad (1\text{J} = 1\text{Wсек})$$

1.7.2. Условия за тестване

Максималната концентрация на проучвано химическо вещество не следва да надвишава 100 µg/ml, тъй като всички фототоксични химични вещества се откриват при по-ниски концентрации, докато при по-високи концентрации появата на невярно положителни (свръхпрогнозни) резултати нараства (13). Величината рН на най-високата концентрация на проучваното химическо вещество следва да бъде достатъчно задоволителна (област на рН: 6,5 – 7,8).

Обхвата на концентрации на проучваното химично вещество при наличието (+UVA) и липсата (-UVA) на светлина следва да бъде точно определена в предшестващи експерименти за неговото установяване. Обхвата и отрязъка на концентрацията в нейната последователност следва да бъдат така добре определени, че кривите на реакция спрямо концентрацията да се подкрепят в достатъчна степен от експерименталните данни. Препоръчва се използването на геометричните серийни концентрации (с постоянно съотношение на разреждане).

1.7.3. Процедура на тестване⁴

1.7.3.1. Първи ден

Приготвя се клетъчна суспензия от 1×10^5 клетки/ml в клетъчна култура и се разпределя в количества по 100 μ l само в периферните гнезда на 96-гнездовата микротитър на плака за тъканни култури (= празни проби). В оставащите гнезда се поставят по 100 μ l от клетъчната култура от 1×10^5 клетки/ml (= 1×10^4 клетки/гнездо). За всяко от тестваните химически вещества се подготвят две плаки: една за определяне на цитотоксичност(-UVA), а другата за определяне на фотоцитотоксичността(+UVA).

Клетките се инкубират в продължение на 24 часа (7,5% CO², 37 °C), докато се образува полусливащ се монослой. Този инкубационен период позволява на клетките възстановяване и придържане една към друга, както и експоненциален растеж.

1.7.3.2. Втори ден

След инкубация клетъчната култура се прехвърля и се промива два пъти с 150 μ l EBSS/PBS на гнездо. Добавя се 100 μ l от EBSS/PBS в подходяща концентрация на тестваното химическо вещество или разтворителя (отрицателна контрола). Прибавят се 8 различни концентрации на проучваното химическо вещество. Клетките с проучваното химическо вещество се инкубират на тъмно в продължение на 60 минути (7,5% CO², 37 °C).

За да се изпълни (+UVA) частта на изследването, клетките се ирадиират на стайна температура в продължение на 50 минути чрез през отвор на похлупак на 96-гнездовата плака с 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Извършва се вентилация с вентилатор с цел предотвратяване на кондензирането на вода под похлупака. Съхраняват се дублиращите гнезда(-UVA) на стайна температура в тъмна кутия в продължение на 50 минути(= UVA времето за експониране).

Проучваният разтвор се прелива и се промива два пъти с 150 μ l EBSS/PBS. EBSS/PBS се замества с клетъчна среда и се инкубира (7,5% CO₂, 37 °C) в продължение на една нощ (18-22) часа.

1.7.3.3. Трети ден

Микроскопска оценка

⁴ Допълнителни данни могат да се намерят в препратка 12.

Клетките се изследват под фазово-контрастен микроскоп. Записват се промените в морфологията на клетките, дължащи се на цитотоксични ефекти, предизвикани от проучваното химическо вещество. Тази проверка се препоръчва, за да се избегнат грешките от експеримента, но тези записи не се използват за оценка на цитотоксичността или фототоксичността.

Опит за поглъщане на неутрално червено (NR)

Клетките се измиват със 150 µl предварително затоплен EBSS/PBS. Миещият разтвор се отстранява с внимателно почукване. Добавят се 100 µl среда от неутрално червено и се инкубира при 37°C, във влажна атмосфера от 7,5% CO² в продължение на 3 часа.

След инкубацията неутрално червеното се отстранява от средата и клетките се измиват със 150 µl EBSS/PBS. Долива се EBSS/PBS и разпръсква изцяло. (Друга възможност: да се центрофугира на обратната плака.)

Добавят се точно 150 µl неутрално червено дезорбиран разтвор (прясно приготвени етанол/оцетна киселина).

Микротитърната плака се разклаща енергично, поставена върху вибрационен съд за микротитърни плаки в продължение на 10 минути, докато се отдели неутрално червеното от клетките и се образува хомогенен разтвор.

Измерва се оптичната плътност на екстракта на неутрално червеното при 540 nm в спектрометър, като се използват празни контроли за референтни стойности. Данните се запазват в подходящ файлов формат (напр. ASCII) за последващи анализи.

2. Данни

2.1. Качество и количество на данните

Данните следва да позволят да се направят еднозначен анализ на реакцията към концентрацията, получена при наличието и при липсата на UVA/vis ирадиация. В случай, че се открие цитотоксичност, както областта на концентрацията, така и отрязъците на индивидуалните концентрации следва да бъдат подредени по такъв начин, че да доведат до съвпадение на кривата с експерименталните данни. Имайки пред вид, че проучваното химическо вещество може да не бъде цитотоксично при експеримент на тъмно (-UVA) до определена граница на концентрация от 100 µg/ml, но високо цитотоксично при ирадиация (+UVA), тестваните области на концентрация и в двете части на експеримента (изпълнявайки изискването за достатъчно качество на данните) могат да се различават значително. Ако не бъде открита цитотоксичност и в двете части на експеримента (- UVA и +UVA), е достатъчно тестване с голяма разлика между единичните дози до най-високата концентрация.

За потвърждаването на ясен положителен резултат не се изисква повтаряне на експеримента. Освен това, не е необходимо потвърждаването на точни отрицателни резултати, в случай че проучваното химическо вещество е било тествано при достатъчно високи концентрации. В такива случаи е достатъчен

един главен експеримент, подкрепен от един или повече предварителни експерименти за установяване на обхвата.

Тестове с гранични резултати, близки до праговата линията на модела на прогнозиране, следва да бъдат повтаряни с цел потвърждаване.

В случай че е необходимо повтарянето се тестване, то промяната в условията на експеримента може да се окаже важна за постигане на ясен резултат. Главна променлива в този тест е подготовката на разтвори от проучваните химически вещества. От това следва, че промяната на тези условия (съпътстващ разтворител, пулверизация, акустичност) могат да се окажат най-уместни при повторението на един тест. Като алтернатива може да се вземе предвид промяната във времето на предварителната ирадиационна инкубация. За водно-нестабилни химически вещества може да се окаже подходящо едно по-кратко време.

2.2. Третиране на резултати

При възможност се определя концентрация на проучваното химическо вещество, отразяваща 50% инхибиране на клетъчния NRU(EC_{50}). Това може да се направи, като се приложи коя да е подходяща нелинейна регресионна процедура (за предпочитане функция на Hill или логистична регресия) към данните за реакция спрямо концентрацията, или като се използват други възможни процедури(14). Тяхното качество следва да бъде внимателно проверено, преди използването на EC_{50} за по-нататъшни изчисления. Като алтернатива, могат да бъдат използвани графични методи за изчисляване на EC_{50} . В този случай се препоръчва използването на теорията на вероятностите(х-скала: $\log$, у-скала: вярност), като в много случаи функцията-отговор на концентрацията - остава почти линейна след тази трансформация.

2.3. Оценка на резултатите (модели на прогнозиране)

2.3.1. Модел на прогнозиране 1 : фактор на фотодразнимост (ФФД)

В случай, че едновременно при наличието (+UVA) и при липсата (-UVA) на светлина се получават завършени криви на реакция спрямо концентрацията, факторът на фотодразнимост (ФФД) се изчислява чрез следната формула:

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

При $\text{ФФД} < 5$ липсва фототоксичен потенциал, докато при $\text{ФФД} \geq 5$ е възможен фототоксичен потенциал.

В случай, че химическо вещество е цитотоксично само при +UVA, но не е цитотоксично при -UVA, ФФД не може да бъде изчислен, въпреки че това е резултат, който показва наличие на фототоксичен потенциал. В такива случаи "> ФФД" може да се изчисли, ако (-UV) цитотоксичният тест се извърши до най-високата пробна концентрация ($C_{\max}$) и тази стойност се използва за изчисление на "> ФФД";

$$(б) \quad \Phi\PhiД = \frac{C_{\max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

В случай, че само “> ΦΦД” може да бъде получено, то тогава която и да е стойност > 1 предвижда фототоксичен потенциал.

В случай, че стойностите на EC50(-UV) и EC50(+UV) не могат да бъдат изчислени поради факта, че химичното вещество не показва признаци на цитотоксичност до най-високата пробна концентрация, това потвърждава липса на фототоксичен потенциал. В такива случаи, формално “ΦΦД = *1” се използва за характеризиране на резултата;

$$(в) \quad \Phi\PhiД = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Ако може да бъде получено само “ΦΦД = *1”, това предсказва отсъствие на фототоксичен потенциал.

В случаите (б) и (в) концентрациите, постигнати в теста за фототоксичност *ин витро* ЗТЗ NRU, следва да бъдат внимателно преценени, когато се използват за предсказване на фототоксичния потенциал.

2.3.2. Модел на прогнозиране 2 : среден фото ефект (СФЕ)

Като друга възможност, може да бъде приложена нова версия на модела за прогнозиране на фототоксичния потенциал, която е разработена като са използвани данните на изследването за стандартизация на Европейската Асоциация по парфюмерия и козметика (EU/COLIPA) (15) и са тествани в опити на слъпо в следващо проучване върху *ин витро* фототоксичността на UV филтрирани химически вещества (13). Този модел преодолява ограниченията на ΦΦД модела в случаи, където EC₅₀ не може да бъде получено. Моделът използва “среден фото ефект” (СФЕ), измерване, което се основава на сравнение на цялостните криви на реакция спрямо концентрацията. За прилагане на модела на “среден фото ефект” е разработен специален компютърен софтуер в Хумболтовия университет (Берлин), който може да се получи безплатно.

2.4. Интерпретация на резултати

Положителен резултат в теста за фототоксичност *ин витро* ЗТЗ NRU (ΦΦД ≥ 5 или СФЕ ≥ 0,1) показва, че пробното вещество има фототоксичен потенциал. Ако този резултат е получен при концентрация под 10 µg/ml, проучваното химическо вещество се проявява и като фототоксин при различни експозиционни условия *ин vivo*. В случай, че се получи положителен резултат само при най-високите пробни концентрации от 100 µg/ml, може да се окаже необходимо тези данни да бъдат преценени от гледна точка на случайност или на фототоксичен потенциал. Те могат да включват данни, свързани с проникването, абсорбцията и възможното акумулиране на проучваното химическо вещество в кожата, или

тестването му в алтернативен тест за потвърждение, напр. използване на човешки *ин витро* модел на кожата.

Отрицателен резултат от проведен тест за фототоксичност *ин витро* 3T3 NRU (ФФД < 5 или СФЕ < 0,1), показва че пробното вещество не е фототоксично за културите от клетки на бозайници при условията на провеждане на теста. В случаите, където проучваните химически вещества са били тествани при най-високата концентрация от 100 µg/ml, отрицателният резултат показва, че те нямат фототоксичен потенциал и фототоксичността *ин vivo* може да се счита малко вероятна. В случаи, където са били получени идентични реакции на токсична концентрация (EC50 +UV и EC50-UV) при по-ниски концентрации, интерпретирането на данните следва да се извърши по същия начин. Обратно, ако не се докаже токсичност(+UV и -UV), и водноразтворимите концентрации са ограничени до стойности под 100 µg/ml, тогава съвместимостта на пробното вещество със изследването може да се постави под съмнение и следва да се предвиди едно изследване за потвърждение (напр. модел на кожата *ин витро*, или модел *екс vivo* или тест *ин vivo*).

3. Доклад

Доклад от теста

Докладът от теста трябва да включва следната информация:

Проучвано химическо вещество:

- идентифициращи данни и номер на CAS, ако е известен,
- физически свойства и липса на примеси,
- физико-химически свойства, свързани с провеждането на изследването,
- стабилност и фотостабилност, ако са известни.

Разтворител:

- обосновка за избора на разтворител,
- разтворимост на проучваното химическо вещество в разтворителя,
- процентно съдържание на разтворителя в използваните среди (EBSS или PBS).

Клетки:

- вид и източник на клетките,
- отсъствие на микоплазма,
- брой на клетъчните пасажки, ако е известен,
- UVA чувствителност на клетки, определена с апаратура за облъчване (иридиационна апаратура), използвана в тест за фототоксичност *ин витро* 3T3 NRU.

Условия за тестване(а) – инкубация преди или след обработването:

- вид и състав на клетъчната култура,
- условия за инкубация (концентрация на CO², температура, влажност)
- продължителност на инкубацията (предварително обработване, последващо обработване).
- *Условия за тестване(б) – обработване с химически вещества:*
- обосновка за избора на концентрации на тестваните химически вещества, използвани при наличието и липсата на UV/vis иридиация,

- в случай на ограничена разтворимост на проучваното химическо вещество и липса на цитотоксичност, обосновка за тестване на най-високата концентрация,
- вид и състав на използваната среда (буфериран разтвор на соли),
- продължителност на химическата обработка.

Условия за тестване(в) – облъчване (иридиация):

- обосновка за избор на използвания светлинен източник,
- спектрални характеристики на излъчване на светлинния източник,
- излъчващи/абсорбционни характеристики на използвания(те) филтър(и),
- характеристики на радиометъра и подробно определяне на неговата калибрация,
- разстояние на светлинния източник до системата за тестване,
- UVA иридиация при това разстояние, изразена в mW/cm^2 ,
- продължителност на UV/vis светлинно облъчване,
- UVA доза(иридиация x време), изразена в J/cm^2 ,
- едновременно отчитане на използваната температура при работа с клетъчните култури по време на облъчването(иридиацията), както и на температурата на средата за клетъчните култури, едновременно с това съхранявани на тъмно.

Условия за тестване(г) – NRU тест:

- състав на среда на неутрално червено,
- продължителност на инкубация на неутрално червено,
- условия за инкубация (концентрация на CO_2 , температура, влажност),
- условия за екстракция на неутрално червено (екстрахиращо вещество, продължителност),
- дължина на вълната, използвана при спектрометричното отчитане на оптичната плътност на неутрално червено,
- втора дължина на вълната (референтна), в случай, че се използва,
- съдържание на формуляра за спектрофотометрия, ако се използва.

Резултати:

- клетъчна жизнеспособност, получена при всяка концентрация на проучваното химическо вещество, изразена като процент от средна жизнеспособност на контролите,
- криви на реагиране на концентрацията,(тестване на концентрацията на химическото вещество спрямо относителната клетъчна жизнеспособност), получени в резултат на едновременно проведени +UVA и -UVA експерименти,
- анализ на данните от кривите на реагиране на концентрацията: ако е възможно: компютърна обработка/изчисление на EC_{50} (+UVA) и EC_{50} (-UVA),
- сравнение на две криви на реагиране на концентрацията, получени при наличието и липсата на UVA/vis иридиация, чрез изчисляване на фактора за фотодразнимост (ФФД), или чрез изчисление на средния фотоефект (СФЕ),
- класификация на фототоксичния потенциал,
- възприети критерии на тестване (а) – едновременно с отрицателна контрола:
 - абсолютна жизнеспособност(оптична плътност на екстракта на неутрално червено) на ирадиирани и неирадиирани клетки,
 - данни за отрицателната контрола от предишни изследвания, средна стойност и стандартно отклонение.
- възприети критерии на тестване (б) – едновременно с положителна контрола:
 - EC_{50} (+UVA) и EC_{50} (-UVA) и ФФД на положителната контрола,

- данни от предишни изследвания за положителната контрола: EC₅₀ (+UVA) и EC₅₀ (-UVA), средна стойност и стандартно отклонение.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

4. ЛИТЕРАТУРА

- (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 *ин витро* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology ин витро* 8, pp. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *ин витро* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, pp. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA .*Ин витро* phototoxicity. validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology ин витро* 12, pp. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *ин витро* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology ин витро* 7, pp. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, Research progress in organic, biological and medicinal chemistry Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *Ин витро* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, The science of photobiology, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *ин витро* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pp. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pp. 1825-1829.

- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project .Ин витро 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 Ин витро Phototoxicity Test, ATLA 26, pp. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, Journal of Biological Systems 3, pp. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *ин витро* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *ин vivo* phototoxicity of chemicals, ATLA 25, pp. 445-462.

ДОПЪЛНЕНИЕ

Място на 3T3 NRU (опит за поглъщане на неутрално червено) в последователния подход при изследване фототоксичността на химическите вещества

