

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2000/33/EB

2006/EES/58/34

frá 25. apríl 2000

um tuttugustu og sjöundu aðlögun að tækniframförum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna ⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 1999/33/EB ⁽²⁾, einkum 28. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er mælt fyrir um aðferðir til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif efna og efnablandna. Nauðsynlegt er að laga viðaukann að tækniframförum.
- 2) Samkvæmt 2. mgr. 7. gr. tilskipunar ráðsins 86/609/EBE frá 24. nóvember 1986 um samræmingu á ákvæðum í lögum og stjórnsýslufyrirmælum aðildarríkjanna um verndun dýra sem notuð eru í tilrauna- og vísindaskyni ⁽³⁾ skal ekki gera tilraun sem útheimtir notkun dýra ef beita má annarri hagkvæmri og hentugri aðferð, sem fullnægir vísindalegum kröfum, til að ná tilætluðum árangri.
- 3) Framkvæmdastjórnin áformar að taka tilteknar, nýjar prófunaraðferðir, sem útheimta ekki notkun dýra, upp í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE þannig að þær verði tiltækar til prófunar á efnum skv. 1. mgr. 3. gr. tilskipunar 67/548/EBE.
- 4) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit nefndar um aðlögun að tækniframförum á tilskipunum um að ryðja úr vegi tæknilegum hindrunum í viðskiptum með hættuleg efni og efnablöndur.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Textinn í I. og II. viðauka við þessa tilskipun bætist við B-hluta V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE.

2. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 1. október 2001. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessi ákvæði skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þau verða birt opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

2. Aðildarríkin skulu senda framkvæmdastjórninni helstu ákvæði úr landslögum, sem þau samþykkja um málefni sem tilskipun þessi nær til, og samsvörunartöflu milli þessarar tilskipunar og ákvæða landslaga sem samþykkt hafa verið.

3. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á þriðja degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 25. apríl 2000.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Margot WALLSTRÖM

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. EB L 136, 8.6.2000, bls. 90. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 59/2004 frá 26. apríl 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá *EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins* nr. 43, 26.8.2004, bls. 25.

(*) Samþykkt fyrir tuttugustu og sjöttu aðlögun.

⁽¹⁾ Stjtið. 196, 16.8.1967, bls. 1.

⁽²⁾ Stjtið. EB L 199, 30.7.1999, bls. 57.

⁽³⁾ Stjtið. EB L 358, 18.12.1986, bls. 1.

I. VIÐAUKI

„B.40. HÚÐÆTING

1. AÐFERÐ

1.1. Inngangur

Evrópumiðstöð um fullgildingu nýrra aðferða (ECVAM, hjá Sameiginlegri rannsóknarmiðstöð framkvæmdastjórnar Evrópubandalaganna) (1., 2. og 3. heimild) hefur lýst tvær prófanir í glasi á húðætandi áhrifum vísindalega fullgildar: mælingu á rafviðnámi yfir rottuhúð (transcutaneous) og prófun þar sem líkan af mannshúð er notað. Fullgildingarrannsókn Evrópumiðstöðvar um fullgildingu nýrra aðferða sýndi fram á að með báðum prófunum var hægt að greina á áreiðanlegan hátt á milli þekktra, húðætandi efna og efna sem ekki eru húðætandi. Enn fremur gerir aðferðarlýsing prófunar, sem byggist á líkani af mannshúð, kleift að greina rétt á milli mismikilla, ætandi áhrifa (þekkt efni sem hafa alvarleg, húðætandi áhrif, H35, og önnur húðætandi efni, H34) (2. heimild). Lýsing og aðferðir eru gefnar fyrir báðar prófanir; val á prófun er háð sérkröfum og óskum notandans.

Sjá einnig B-hluta í almennum inngangi.

1.2. Skilgreiningar

Húðæting: varanleg vefjaskemmd í húð eftir að prófunarefni hefur verið borið á hana.

1.3. Viðmiðunarefni

Engin tilgreind en sjá liði 1.5.3.4 og 1.7.2.3.

1.4. Meginregla prófunaraðferðarinnar — mæling á rafviðnámi í rottuhúð

Prófunarefnið er látið liggja í allt að 24 klst. á húðþekju flipa sem teknir eru úr húð ungra rottna sem hafa verið aflífaðar á mannúðlegan hátt. Ætandi efni eru sanngreind út frá hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmaþvirkni hennar en þetta mælist sem lækkun á eðlislegu rafviðnámi húðar niður fyrir viðmiðunarmörk (5 kΩ) (4. og 5. heimild). Ertandi efni og efni, sem eru ekki ertandi, minnka ekki rafviðnám húðar niður fyrir viðmiðunarmörkin. Þegar um er að ræða yfirborðsvirk efni og hlutlaus, lífræn efni (sjá skilgreiningar í 6. heimild) má bæta áfanga með leysilítarbindingu við prófunaraðferðina til að fækka falsjákvæðum niðurstöðum sem fást með þessum tegundum efna sérstaklega (2. og 7. heimild).

1.5. Lýsing á prófunaraðferðinni — mæling á rafviðnámi í rottuhúð

1.5.1. Dýr

Húðfliparnir eru fengnir úr ungum (20–23 daga gömlum) rottum (Wistar-stofni eða sambærilegum stofni). Hár á baki og síðum er fjarlægð gætlega með litlum hárklippum fyrir dýr. Dýrin eru síðan þvegin vandlega meðan viðkomandi líkamshluti er baðaður í sýklalyfjalaun (sem inniheldur t.d. streptómýsín, penisillín, klóramfenikól og amfóterísín í styrk sem nægir til að hindra bakteríuvöxt). Dýrin eru þvegin aftur með sýklalyfjalaun á þriðja eða fjórða degi eftir fyrsta þvott og skulu notuð við prófanir innan þriggja daga (dýrin skulu ekki vera eldri en 31 dags þegar húðfliparnir eru teknir).

1.5.2. Taka húðflipa

Dýrin eru aflífuð á mannúðlegan hátt. Því næst er húðin flegin af baki hvers dýrs og öll umframfita fjarlægð af henni. Skinnið er lagt fyrir endann á pólýtetraflúretýlenpípu og tryggt að húðþekjan sé í snertingu við pípu. Passandi „O“-laga gúmmíhring er þrýst yfir endann á pípunni til að húðin haldist á sínum stað og umframvefur er skorinn burt. Mál pípunnar og „O“-hringsins eru gefin á mynd 1. Síðan er þétt með vaselíni á milli „O“-gúmmíhringsins og endans á pólýtetraflúretýlenpípunni. Pípunni er haldið uppi með fjaðurklemmu inni í viðtakahólfi sem inniheldur magnesíumsúlfatlaun (154 mM) (mynd 2).

1.5.3. Prófunaraðferð

1.5.3.1. Prófunarefnið sett á

Fljótandi prófunarefni (150 µl) eru sett á yfirborð húðþekjunnar inni í pípunni (mynd 2). Þegar efni í föstu formi eru prófuð er nægilegt magn fasta efnisins sett á flipann til að tryggja að allt yfirborð húðþekjunnar sé þakið. Afjónuðu vatni (150 µl) er síðan hellt á fasta efnið og pípan hrist varlega. Prófunarefnið skulu vera í eins mikilli snertingu við húðina eins og hægt er. Fyrir sum prófunarefni í föstu formi næst það með því að hita efnið upp í 30 °C til að bræða það eða með því að mala það til að mynda kyrrni eða duft.

Þrjú húðflípar eru notaðir fyrir hvert prófunarefni. Prófunarefni eru látin liggja á í 24 klst. (sjá einnig lið 1.5.3.4). Prófunarefnið er fjarlægð með því að skola það af undir kranavatsnbunu við allt að 30 °C þar til búið er að fjarlægja allt efni sem hægt er. Hægt er að auðvelda fjarlægingu prófunarefna, sem hafa storknað í pípunni, með því að skola þau undir heitri vatnsbunu við u.þ.b. 30 °C.

1.5.3.2. Mælingar á rafviðnámi í húð

Rafviðnám í húð er mælt með sérstökum viðnámsmæli (databridge) með lágrri spennu og riðstraumi (t.d. AIM 401 eða 6401 eða sambærilegri gerð). Fyrir mælingu á rafviðnámi er yfirborðsspenna húðarinnar minnkuð með því að þekja húðþekjuna með nægilegu magni af 70% etanóli. Eftir nokkrar sekúndur er etanólið fjarlægð með því að hvolfa pípunni og vefurinn er síðan vatnaður með því að bæta við 3 ml af magnesíumsúlfatlausn (154 mM). Rafskaut viðnámsmælisins eru sett hvort sínum megin á húðflípann svo að hægt sé að mæla viðnámið sem kΩ á húðflípa (mynd 2). Á mynd 1 má sjá mál rafskautanna og lengd þess hluta rafskautsins sem er undir krókóðilaklemmunum. Klemman á innri (breiða) rafskautinu er látin hvíla á pólýtetraflúretýlenpípunni meðan á viðnámsmælingunum stendur til að tryggja að lengd þess hluta rafskautsins, sem er ofan í magnesíumsúlfatlausninni, haldist óbreytt. Ytra (mjóa) rafskautinu er komið fyrir inni í viðtakahólfinu þannig að það hvíli á botni hólsins. Fjarlægðinni milli neðsta hluta fjaðurklemunnar og neðri brúnar pólýtetraflúretýlenpípunnar skal haldið stöðugri (mynd 1) þar eð þessi fjarlægð hefur áhrif á mæligildi viðnámsins.

Athugið að ef mæligildi viðnámsins er hærra en 20 kΩ kann það að vera vegna prófunarefnisins sem þekur húðþekju húðflípann. Reyna má að fjarlægja þetta þekjandi efni t.d. með því að halda fyrir pólýtetraflúretýlenpípana með hanskaklæddum þumalfingri og hrista hana í u.þ.b. 10 sekúndur; magnesíumsúlfatlausninni er síðan fleygt og viðnámsmælingin endurtekin með nýju magnesíumsúlfati.

Meðaltal niðurstaðna úr mælingum á rafviðnámi yfir húð er tekið gilt með því skilyrði að gildi úr samskeiða, jákvæða og neikvæða samanburðinum séu innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina. Efnin, sem mælt er með að séu notuð við samanburð, og tilheyrandi, viðurkennd viðnámsmörk fyrir aðferðirnar og tækið, sem er lýst, eru:

Samanburður	Efni	Viðnámsmörk (kΩ)
Jákvæður	10 M saltsýra (36%)	0,5–1,0
Neikvæður	Eimað vatn	10–25

1.5.3.3. Aðlöguð aðferð fyrir yfirborðsvirk efni og hlutlaus, lífræn efni

Ef gildi fyrir rafviðnám yfir húð, þegar um er að ræða prófunarefni sem eru annaðhvort yfirborðsvirk efni eða hlutlaus, lífræn efni, eru lægri eða jafnt og 5 kΩ er hægt að meta hversu djúpt leysilítur þrengir sér í vefina. Með þessari aðferð má ákvarða hvort um er að ræða falsjákvæðar niðurstöður (2).

1.5.3.3.1. Leysilíturinn súlforhódamín B settur á og fjarlægður

Eftir fyrstu meðferð með prófunarefninu eru 150 µl af 10% lausn (massi miðað við rúmmál) leysilítarins súlforhódamíns B í eimuðu vatni látnir liggja á húðþekju hvers húðflípa í 2 klst. Húðflíparnar eru síðan skolaðir undir kranavatsnbunu við allt að herbergishita í u.þ.b. 10 sekúndur til að fjarlægja umframmagn leysilítar eða óbundinn leysilít. Hver húðflípa er tekinn gætilega af pólýtetraflúretýlenpípunni og settur í hettuglas (t.d. 20 ml glas til sindurmælinga) sem inniheldur afjónað vatn (8 ml). Hettuglösín eru hrist varlega í 5 mínútur til að fjarlægja umframmagn leysilítar eða óbundinn leysilít. Þetta skolunarferli er síðan endurtekið og húðflíparnar því næst fjarlægðir og settir í hettuglös með 5 ml af 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfati í eimuðu vatni, og hafðir í hitaskáp yfir nótt við 60 °C. Eftir þetta er hver húðflípa fjarlægður og honum fleygt og lausnin, sem eftir er, skilin í skilvindu í 8 mínútur við 21 °C (hlutfallslegur miðflóttakraftur ~ 175). Þá er 1 ml sýnis af flötinu þynntur í rúmmálshlutfallinu 1 á móti 5 (þ.e. 1 ml + 4 ml) með 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfats í eimuðu vatni. Ljósþéttni lausnarinnar er mæld við u.þ.b. 565 nm.

1.5.3.3.2. Útreikningur á magni leysilítar

Magn leysilítarins súlforhódamíns B í hverjum flípa er reiknað út frá ljósþéttigildum (móleðlis-gleypnistuðullinn fyrir leysilítinn súlforhódamín B við 565 nm = $8,7 \times 10^4$, mólmassi = 580). Magn leysilítarins súlforhódamíns B er ákvarðað fyrir hvern húðflípa og meðalmagn leysilítar er síðan reiknað fyrir endurteknu prófanirnar. Meðaltal niðurstaðna fyrir bindingu leysilítar er tekið gilt með því skilyrði að gildi úr samskeiða samanburðinum séu innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina. Í eftirfarandi töflu er tillaga um ásættanleg viðmiðunarmörk fyrir magn leysilítar í samanburðinum fyrir aðferðirnar og búnaðinn sem er lýst:

Samanburður	Efni	Viðmiðunarmörk fyrir magn leysilítar (µg/flípa)
Jákvæður	10 M saltsýra (36%)	40–100
Neikvæður	Eimað vatn	15–35

1.5.3.4. Frekari upplýsingar

Prófunarefnið má einnig setja á húðflípana í styttri tíma (t.d. 2 klst.) til að komast að því hvaða efni eru mjög ætandi. Í fullgildingarrannsókninni kom þó í ljós að eftir að prófunarefnið höfðu legið á húðflípunum í 2 klst., var hugsanleg, ætandi verkun nokkurra þeirra ofmetin við mælinguna á rafviðnámi í húð (2. heimild) þótt rannsóknin hafi leitt til réttar sanngreiningar á ætandi efnunum og efnunum, sem eru ekki ætandi, eftir að þau höfðu verið í snertingu við húðina í 24 klst.

Eiginleikar og mál prófunarbúnaðarins og tilraunaaðferðin, sem er notuð, geta haft áhrif á gildin sem fást fyrir rafviðnám yfir húð. Viðmiðunarmörkin 5 kΩ fyrir ætandi áhrif voru ákvörðuð út frá gögnum sem aflað var með þeim tiltekna búnaði og verklagi sem er lýst í þessari aðferð. Mismunandi viðmiðunarmörk og samanburðargildi kunna að eiga við ef aðstæðum við prófun er breytt verulega. Af þessum sökum er mælt með því að aðferðirnar og gildi viðmiðunarmarkanna fyrir viðnámið séu kvörðuð með því að prófa röð viðmiðunarstaðla sem eru valdir úr efnunum sem notuð eru í fullgildingarrannsókninni (3. heimild).

1.6. Meginregla prófunaraðferðarinnar — ákvörðun með líkani af mannhúð

Prófunarefnið er látið liggja staðbundið í allt að 4 klst á þrívíðu líkani af mannhúð sem er endurgerð húðþekju með starfhæfu hornlagi. Ætandi efni eru sanngreind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna (eins og má ákvarða t.d. með því nota mælingu á minnkun MTT (3-[4,5-dímetyl]þíasól-2-ýl]-2,5-dífenýltetrasólíumbromíðs)) niður fyrir skilgreind viðmiðunarmörk eftir váhrif frá efnunum í tiltekinn tíma. Meginregla ákvörðunarinnar er í samræmi við þá tilgátu að þau efni, sem hafa ætandi áhrif, geti þrengt sér inn í hornlagið (með flæði eða við rof) og eru nægilega frumueitrandi til að valda frumudauða í frumulögnum sem eru þar undir.

1.7. Lýsing á prófunaraðferðinni — ákvörðun með líkani af mannhúð

1.7.1. Líkөн af mannhúð

Líkөн af mannhúð geta verið af mismunandi uppruna en skulu þó uppfylla ákveðin skilyrði. Líkanið skal vera með starfandi hornlagi og lagi af lifandi frumum undir hornlaginu. Tálmað virkni hornlagsins skal vera fullnægjandi. Unnt er að staðfesta fullnægjandi tálmað virkni með því að sýna fram á viðnám líkansins gegn frumueiturhrifum eftir að efni, sem vitað er að eru frumueitrandi en smjúga venjulega ekki gegnum hornlagið, hafa verið borin á. Sýna skal fram á að líkanið gefi samanburðarnákvæmar niðurstöður í endurteknum tilraunum við skilgreindar tilraunaaðstæður.

Lífvænleiki lifandi frumna í líkaninu skal vera svo mikill að unnt sé að greina með vissu milli jákvæðu og neikvæðu samanburðarefnanna. Lífvænleiki frumna (t.d. eins og hann er mældur út frá MTT-minnkun, þ.e. ljóspéttnigildi) eftir váhrif frá neikvæða samanburðarefninu, skal vera innan viðtekinna viðmiðunarmarkanna fyrir þetta tiltekna líkan. Á sama hátt skulu gildi fyrir lífvænleika frumna með jákvæða samanburðarefninu (í hlutfalli við gildi fyrir neikvæða samanburðarefni) vera innan tiltekinna viðmiðunarmarkanna. Mikilvægast er að spálíkanið, sem er notað, uppfylli kröfur alþjóðlega fullgildingarstaðalsins (2. heimild).

1.7.2. Prófunaraðferð

1.7.2.1. Prófunarefnið sett á

Þegar um er að ræða fljótandi efni skal bera nægilegt magn af prófunarefninu á húðina til að þekja hana (25 µl/cm² að lágmarki). Þegar um er að ræða efni í föstu formi skal setja svo mikið af prófunarefninu á húðina að það þeki hana alla og síðan skal væta efnið til að tryggja að það komist vel í snertingu við húðina; föst efni skulu mulin í duft áður en þau eru sett á, ef við á. Sú aðferð, sem er notuð til að setja efni á, skal vera fullnægjandi fyrir margvíslegar tegundir efna (2. heimild). Í lok váhrifatímans skal skola prófunarefnið vandlega af yfirborði húðarinnar með saltlausn.

1.7.2.2. Mælingar á lífvænleika frumna

Unnt er að nota allar meginreglur, fullgiltar aðferðir til að mæla lífvænleika frumna. Sú mæling, sem er oftast notuð, er mæling á MTT-minnkun sem hefur reynst gefa nákvæmar og samanburðarnákvæmar niðurstöður á ýmsum rannsóknarstofum (2. heimild). Húðflípan er settur í 0,3 mg/ml MTT-lausn við 20–28 °C í 3 klst. Blátt formasan, sem fellur út, er síðan dregið út (leysiefnaútdráttur) og styrkur þess er mældur með því að ákvarða ljóspéttnigildi við bylgjulengd á bilinu 545–595 nm.

1.7.2.3. Frekari upplýsingar

Niðurstöður varðandi lífvænleika frumna ráðast að miklu leyti af því húðlíkani, sem er notað, og hversu nákvæmlega er farið eftir aðferðarlýsingunni varðandi váhrífátíma, skolun o.þ.h. Mælt er með því að aðferðirnar og spálíkanið séu kvörðuð með því að prófa röð viðmiðunarstaðla sem eru valdir úr efnunum sem notuð eru í fullgildingarrannsókn Evrópumíðstöðvar um fullgildingu nýrra aðferða (ECVAM) (3. heimild). Nauðsynlegt er að aðferðin, sem er notuð, gefi samanburðarnákvæmar niðurstöður á hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum fyrir margvísleg efni, í samræmi við alþjóðlega staðla. Aðferðin skal a.m.k. uppfylla viðmiðanir fyrir vísindalega fullgildingu eins og skilgreint er hér að framan (2. heimild) og niðurstöður slíkrar fullgildingarrannsóknar skulu hafa verið birtar í jafningjarýndu vísindatímariti.

2. GÖGN

2.1. Úrvinnsla niðurstaðna

2.1.1. Mæling á rafviðnámi yfir rottuhúð

Setja skal viðnámsgildi ($k\Omega$) prófunarefnisins og jákvæðra og neikvæðra samanburðarefna og allra staðlaðra viðmiðunarefna fram í töfluformi, þ.m.t. gögn um samhliða/endurteknar tilraunir, meðalgildi og tilheyrandi flokkun.

2.1.2. Ákvörðun með líkani af mannshúð

Setja skal ljóspéttngildi og gögn um reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir prófunarefnið, jákvæð og neikvæð samanburðarefni og öll stöðluð viðmiðunarefni fram í töfluformi, þ.m.t. gögn um samhliða/endurteknar tilraunir, meðalgildi og tilheyrandi flokkun.

2.2. Mat og túlkun á niðurstöðum

2.2.1. Ákvörðun á rafviðnámi yfir rottuhúð

Prófunarefnið er ekki ætandi ef meðalgildi fyrir rafviðnám yfir húð, sem fæst fyrir prófunarefnið, er hærra en 5 $k\Omega$. Prófunarefnið er ætandi ef gildi fyrir rafviðnám yfir húð er 5 $k\Omega$ eða minna og prófunarefnið er ekki yfirborðsvirkt efni eða hlutlaust, lífrænt efni.

Ef gildi fyrir rafviðnám yfir húð fyrir yfirborðsvirk efni eða hlutlaus, lífræn efni eru jöfn eða lægri en 5 $k\Omega$ er unnt að rannsaka hversu djúpt leysilítur gengur niður í vefinn. Prófunarefnið er sannjálkvætt og þar af leiðandi ætandi ef meðalmagn leysilítar í húðflípa er meira en eða jafnt og meðalmagn leysilítar í húðflípa í samskeiða, jákvæða samanburðinum með 36% HCl. Prófunarefnið er falsjálkvætt efni og þar af leiðandi ekki ætandi ef meðalmagn leysilítar í flípa er minna en meðalmagn leysilítar í flípa í samskeiða, jákvæða samanburðinum með 36% HCl.

2.2.2. Ákvörðun með líkani af mannshúð

Ljóspéttngildið í neikvæða samanburðinum svarar til 100% lífvænleika frumna og því er unnt að nota ljóspéttngildin, sem fást fyrir hvert prófunarsýni, til að reikna út hundraðshluta lífvænleika miðað við þennan neikvæða samanburð. Markgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika frumna, sem greinir á milli ætandi prófunarefna og prófunarefna, sem eru ekki ætandi (eða greinir á milli mismunandi flokka ætandi efna), skal vera skilgreint á skýran hátt í spálíkaninu áður en aðferðin fær fullgildingu og fullgildingarrannsóknin, sem síðan er gerð, skal sýna fram á að markgildið sé við hæfi (2. heimild).

3. SKÝRSLUGJÖF

Prófunarskýrsla

Í prófunarskýrslunni skulu a.m.k. vera eftirtaldar upplýsingar:

Prófunarefni:

- gögn til sanngreiningar, eðliseiginleikar og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar. Leggja skal fram svipaðar upplýsingar um viðmiðunarefni ef þau eru notuð.

Aðstæður við prófun:

- upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð,
- lýsing á öllum breytingum, sem kunna að vera gerðar, og rök fyrir þeim.

Niðurstöður:

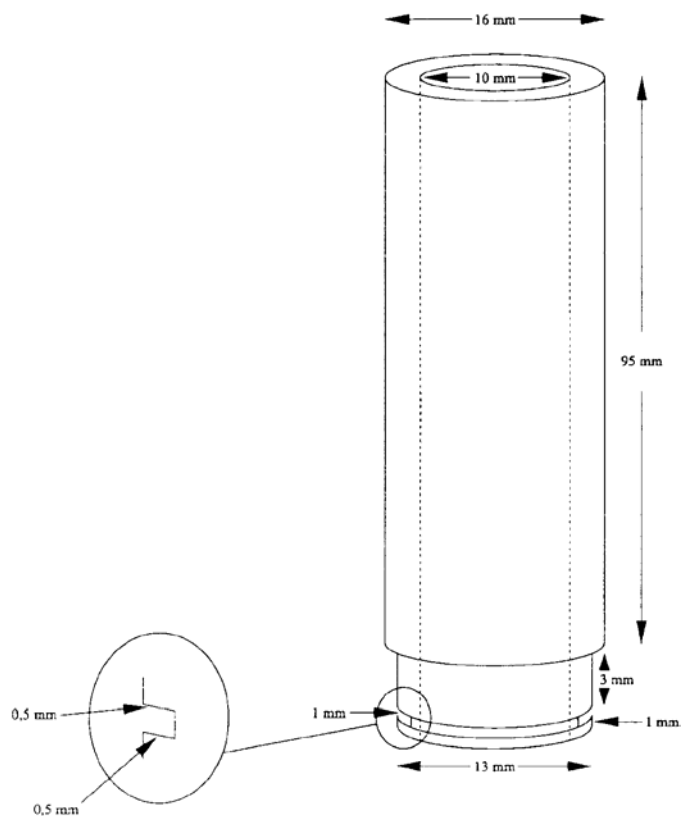
- töflur yfir viðnámsgildi (ákvörðun á rafviðnámi yfir húð) eða hundraðshlutagildi lífvænleika frumna (ákvörðun með líkani af mannhúð) fyrir prófunarefnið, jákvæðan og neikvæðan samanburð og öll stöðluð viðmiðunarefni, þ.m.t. gögn um samhliða/endurteknar tilraunir og meðalgildi,
- lýsing á öllum öðrum áhrifum sem verður vart.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar.**Ályktanir.***4. HEIMILDASKRÁ**

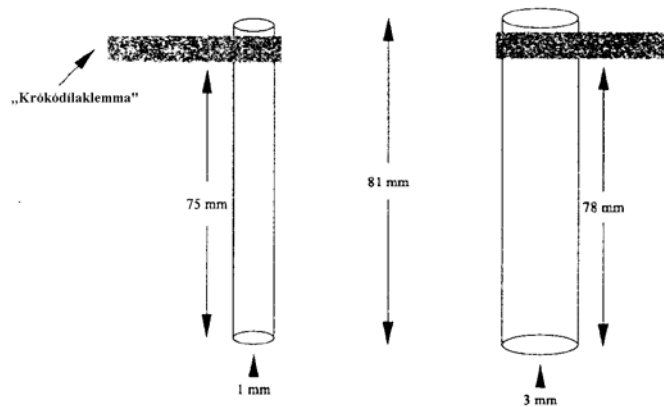
- 1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, bls. 275-280.
- 2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and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

Mynd 1

Mál pólýtetraflúretýlenpíunnar

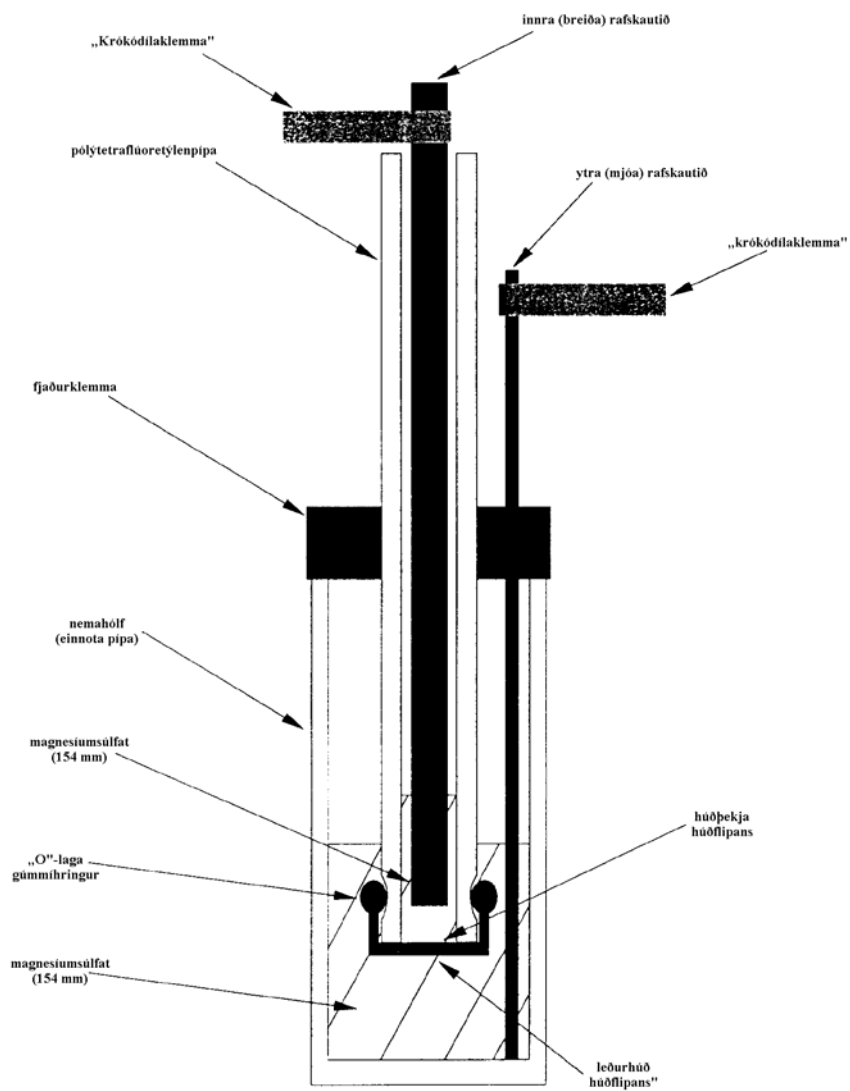


„Mál rafskautanna“



Mynd 2

Búnaður fyrir mælingu á rafviðnámi yfir rottuhúð



II. VIÐAUKI

„B.41. LJÓSEITURHRIF — 3T3 NRU-LJÓSEITURHRIFAPRÓFUN Í GLASI

1. AÐFERÐ

1.1. Inngangur

Ljóseiturhrif eru skilgreind sem eiturhrifasvörun, sem kemur fram eftir að húðin hefur orðið fyrir váhrifum frá tilteknum efnum í fyrsta sinn og þar á eftir fyrir váhrifum frá ljósi, eða eiturhrifasvörun sem er framkölluð á svipaðan hátt með geislun á húð eftir að efni hefur verið gefið á kerfistengdan hátt.

Tilgangur með öflun upplýsinga, sem fást úr 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi, er að sanngreina ljóseiturhrifagetu prófunarefnisins, þ.e. hvort hætta stafi af prófunarefni, í tengslum við váhrif útfjólublás ljóss (UV) og sýnilegs ljóss, eða ekki.

Þar eð eiturefnafræðilegur endapunktur prófunarinnar í glasi er ákvörðun á ljóseiturhrifum á frumur, sem eru framkölluð með samanlagðri verkun efnis og ljóss, er með prófuninni unnt að sanngreina efnasambönd, sem valda ljóseiturhrifum í lífi, eftir að þau hafa verið gefin kerfistengt og þau borin á húðina, ásamt efnasamböndum sem gegna hlutverki ljósertandi efna eftir að þau hafa verið sett staðbundið á húðina.

3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófunin í glasi var þróuð og fullgilt í sameiginlegu verkefni ESB og Evrópusamtaka ilmvatns- og snyrtivöruframleiðenda (COLIPA) frá 1992-1997 (1., 2. og 3. heimild) til að eiga kost á fullgildri prófun í glasi sem mótvægi við hinar margvíslegu prófanir í lífi sem eru í notkun. Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar árið 1996 var mælt með því að nota stigskipta prófun í glasi við mat á ljóseiturhrifum (4. heimild).

Niðurstöður úr 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi voru bornar saman við bráð ljóseiturhrif/ljósertandi áhrif í prófunum í lífi á dýrum og mönnum og hefur prófunin reynst hafa mjög mikið spágildi varðandi þessi áhrif. Markmiðið með prófuninni er ekki að spá fyrir um önnur skaðleg áhrif sem kunna að verða af samanlagðri verkun efnis og ljóss, t.d. ljóserfðaeiturhrif, ljósofnæmi og krabbameinsvaldandi áhrif ljóss, þótt mörg efni með þessa tilteknu eiginleika sýni jákvæða svörun í 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi. Prófunin er heldur ekki ætluð til að meta ljóseiturhrifamát.

Raðprófunaraðferð til að meta ljóseiturhrif efna er sett fram í viðbætinum.

1.2. Skilgreiningar

Ágeislunarstyrkur: styrkur útfjólublás (UV) eða sýnilegs ljóss sem fellur á yfirborð, mældur í W/m^2 eða mW/cm^2 .

Skammtur ljóss: magn (= styrkur \times tími) útfjólublárrar eða sýnilegrar geislunar sem fellur á yfirborð, gefið upp í júlum (= $W \times s$) á hvern yfirborðsflöt, t.d. J/m^2 eða J/cm^2 .

Bylgjulengdarbil útfjólublás ljóss: merkingarnar, sem Alþjóðaljósráðið mælir með, er sem hér segir: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) og UVC (100–280 nm). Aðrar merkingar eru einnig notaðar: skipting milli UVB og UVA er oft höfð við 320 nm og skipta má UVA í UV-A1 og UV-A2 með skiptingu við u.þ.b. 340 nm.

Lífvænleiki frumna: færíbreyta sem mælir heildarvirkni frumuhóps (t.d. upptöku hins mikilvæga hlutlaus, rauða leysilítar í leysibólur frumna) en heildarvirknin svarar til heildarfjölda og/eða lífsþróttar frumnanna og er háð endapunktinum, sem mælist, og prófunarsniðinu sem er notað.

Hlutfallslegur lífvænleiki frumna: lífvænleiki frumna er gefinn upp miðað við neikvæðan samanburð (leysir) sem hefur verið viðhafður allt prófunarferlið (annaðhvort með (+) UV eða án (–) UV) þar sem prófunarefni hefur ekki verið notað.

Spálíkan: reiknirit sem notað er til að umbreyta niðurstöðum eiturhrifaprófunar í spá um hugsanlega eiturverkun. Í núverandi viðmiðunarreglum er hægt að nota PIF (ljósertandi þátt) og MPE (meðaláhrif ljóss) til að umbreyta niðurstöðum 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófunarinnar í glasi í spá um ljóseiturhrifagetu.

PIF (ljósertandi þáttur): þáttur sem er fenginn með samanburðarmælingum á tveimur frumueitrandi styrkstigum (EC₅₀) prófunarefnisins, sem gefa sömu áhrif, sem fást með (+ UV) og án (– UV) ágeislunar, sem er ekki frumueitrandi, með UVA/sýnilegu ljósi.

MPE (meðaláhrif ljóss): ný mælistærð sem byggist á stærðfræðilegri greiningu á heildarlögun tveggja ferla fyrir styrkháða svörun sem fást með (+ UV) og án (– UV) ágeislunar, sem er ekki frumueitrandi, með UVA/sýnilegu ljósi.

Ljóseiturhrif: bráð eiturhrifasvörun, sem kemur fram eftir að húðin hefur orðið fyrir váhrifum frá tilteknum efnum í fyrsta sinn og þar á eftir fyrir váhrifum frá ljósi, eða bráð eiturhrifasvörun sem er framkölluð á svipaðan hátt með geislun á húð eftir að efni hefur verið gefið kerfistengt.

Ljóserting: undirhugtak hugtaksins „ljóseiturhrif“ sem er aðeins notað til að lýsa ljóseiturhrifasvörun húðarinnar eftir váhrif frá efnum (gefin staðbundið eða um munn). Slík ljóseiturhrifasvörun leiðir alltaf til ósértækra frumuskemmda (sem svipar til sólbruna).

Ljósofnaemi: áunnin ónæmissvörun sem kemur ekki fram eftir fyrstu meðferð með efni og ljósi og eins eða tveggja vikna örvunartímabil þarf að líða áður en hægt er að sýna fram á svörun í húð.

Ljóserfðaeiturhrif: erfðaeiturhrifasvörun sem kemur fram sem erfðafræðilegur endapunktur eftir að frumurnar hafa orðið fyrir váhrifum frá skammti af útfjólubláu/sýnilegu ljósi, sem er ekki erfðaeiturvirkur, og frá efni sem er ekki erfðaeiturvirk.

Krabbameinsvaldandi áhrif ljóss: krabbameinsvaldandi áhrif sem eru framkölluð með endurtekinni meðhöndlun með ljósi og efni. Hugtakið „krabbameinshvetjandi áhrif ljóss“ er notað ef æxlismyndun, sem er framkölluð með útfjólubláu ljósi, er aukin með notkun tiltekins efnis.

1.3. Viðmiðunarefni

Fyrir utan efnið klórprómasín, sem er notað til jákvæðs samanburðar og skal prófa samskeiða í hverri ákvörðun, er mælt með því að notað sé hlutmengi efnanna, sem eru notuð í samanburðarrannsóknnum milli rannsóknarstofa, sem viðmiðunarefni í núverandi prófun til að koma nýju 3T3 NRU-ljóseiturhrifa-prófuninni á fót (1., 3. og 13. heimild).

1.4. Fyrstu umfjöllunaratriði

Komið hefur í ljós að mörg efni framkalla ljóseiturhrif (5., 6., 7. og 8. heimild). Eina sameiginlega einkenni þeirra er að þau geta gleypst ljósorku á bylgjusviði sólarljóss. Samkvæmt fyrsta lögmáli ljósefnafræðinnar (lögmál Grothaus-Drapers) geta ljósefnahvörf ekki orðið fyrir en nógu margir ljósskammtar hafa ísogast. Því skal ákvarða gleypnirof prófunarefnisins m.t.t. útfjólublás/sýnilegs ljóss áður en hugað er að líffræðilegri prófun samkvæmt núverandi viðmiðunarreglu (t.d. skv. 101. viðmiðunarreglu Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófanir). Ef móleðlisgleypnistuðullinn/mólgleypnistuðullinn er minni en 10 lítrar \times $\text{mól}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ hefur efnið ekki ljósefnahvarfagetu og því þarf ekki að prófa það með 3T3 NRU-ljóseiturhrifa-prófuninni í glasi eða annarri líffræðilegri prófun á skaðlegum, ljósefnafræðilegum áhrifum (viðbætur).

1.5. Grundvöllur prófunaraðferðar

Sanngreind hafa verið fjögur ferli þar sem ljósgleypni (efnafræðilegs) lithóps getur leitt til ljóseiturhrifasvörunar (7. heimild). Öll ferlin leiða til frumuskemmda. Því er 3T3 NRU-ljóseiturhrifa-prófunin í glasi byggð á samanburði á frumueiturhrifum efnis þegar það er prófað með og án skammts af UVA/sýnilegu ljósi sem er ekki frumueitrandi. Frumueiturhrif í þessari prófun eru gefin upp sem styrkháð minnkun á upptöku mikilvæga leysilítarins NR (NR: hlutlaus, rauður leysilítur (9)) 24 klst. eftir meðhöndlun með prófunarefninu og ágeislun.

Balb/c 3T3 frumur eru hafðar í ræktun í 24 klst. til að mynda einlög. Tveir 96-brunna bakkar fyrir hvert prófunarefni eru síðan hafðir við stýrð skilyrði með átta mismunandi styrkstig efnisins í 1 klst. Því næst fær annar bakkanna skammt af UVA/sýnilegu ljósi, sem er ekki frumueitrandi og nemur 5 J/cm² UVA (+ UV-tilraun), en hinn bakkinn er hafður í myrkri (– UV-tilraun). Ræktunaræti er svo sett á báða bakkana í staðinn fyrir meðhöndlunarætið og eftir 24 klst. til viðbótar við stýrð skilyrði er lífvænleiki frumna ákvarðaður út frá upptöku hlutlauss, rauðs lítar (NRU) í 3 klst. Hlutfallslegur lífvænleiki frumna, sem er gefinn upp sem hundradshluti af ómeðhöndluðum, neikvæðum samanburði, er reiknaður út fyrir hvern prófunarstyrkleikana átta. Til að spá fyrir um ljóseiturhrifa-getu er borin saman sú styrkháða svörun sem fæst með (+ UV) og sú sem fæst án (– UV) ágeislunar, yfirleitt á styrkstiginu EC₅₀, sem er styrkurinn sem hamlar lífvænleika frumna um 50% miðað við ómeðhöndlaðan samanburð.

1.6. Gæðaviðmiðanir

UVA-næmi frumna, rannsóknarsöguleg gögn: kanna skal næmi frumna fyrir UVA reglulega. Frumum er sáð með sama þéttleika og í 3T3 NRU-ljóseiturhrifa-prófuninni í glasi, þær geislaðar næsta dag með UVA-skömmtum frá 1–9 J/cm² og lífvænleiki frumna ákvarðaður degi síðar með NRU-greiningu. Frumur uppfylla gæðaviðmiðanir ef lífvænleiki þeirra eftir ágeislun með 5 J/cm² UVA er a.m.k. 80% af lífvænleika samanburðarins sem var hafður í myrkri. Við mesta UVA-skammt, sem nemur 9 J/cm², skal lífvænleiki ekki vera minni en 50% af lífvænleika samanburðarins sem var hafður í myrkri. Þetta eftirlit skal endurtekið við u.þ.b. tíundu hverja endursáningu frumna.

UVA-næmi neikvæðra samanburðarfrumna, núverandi prófun: prófunin uppfyllir gæðaviðmiðanir ef neikvæður samanburður (frumur í jafnaðri saltlausn samkvæmt Earl (Earl's balanced salt solution (EBSS)) með eða án 1% dímetýlsúlfoxíðs (DMSO) eða 1% etanóls (EtOH)), í + UVA-tilrauninni sýnir lífvænleika sem er ekki minni en 80% af lífvænleika frumna sem eru ekki geislaðar í sama leysi í samskeiða tilraun í myrkri (– UVA).

Lífvænleiki í neikvæða samanburðinum: algild ljóspéttni ($OD_{540\text{ NRU}}$), sem mælist í NR-útdrætti neikvæða samanburðarins segir til um hvort þær 1×10^4 frumur, sem sáð var í hvern brunn, hafi vaxið á venjulegum tvöföldunartíma á dögnum tveimur sem prófunin fór fram. Prófun uppfyllir samþykktarviðmiðanir ef meðaltal $OD_{540\text{ NRU}}$ hjá ómeðhöndluðum samanburði er $\geq 0,2$.

Jákvæður samanburður: samskeiða hverri 3T3 NRU-ljóseiturrifaprófun í glasi skal fara fram prófun á þekktu efni sem veldur ljóseiturrifum. Klórprómasín var notað við jákvæða samanburðinn í fullgildingarrannsókn ESB og Evrópusamtaka ilmvatns- og snyrtivöruframleiðenda (COLIPA) og er því mælt með því. Fyrir klórprómasín, sem er prófað eftir staðlaðri aðferðalýsingu með 3T3 NRU-ljóseiturrifa-prófuninni í glasi, voru eftirfarandi samþykktarviðmiðanir fyrir prófun skilgreindar: geislað klórprómasín (+ UVA): $EC_{50} = 0,1$ til $2,0 \mu\text{g/ml}$, ógeislað klórprómasín (– UVA): $EC_{50} = 7,0$ til $90,0 \mu\text{g/ml}$. Ljósertandi þátturinn (PIF), þ.e. færsla EC_{50} , skal vera a.m.k. 6.

Önnur þekkt efni sem valda ljóseiturrifum og henta fyrir efnaflokk eða leysnieiginleika prófunar-efnisins, sem metið er, má nota sem samskeiða, jákvæð samanburðarefni í stað klórprómasíns. Í slíkum tilvikum skal styðjast við rannsóknarsöguleg gögn til að skilgreina gildisbil EC_{50} og ljósertandi þáttarins (PIF) eða meðaláhrifa ljóss (MPE) með fullnægjandi hætti sem samþykktarviðmiðanir fyrir prófunina.

1.7. Lýsing á prófunaraðferðinni

1.7.1. Undirbúningur

1.7.1.1. Frumur

Stöðug trefjakímfrumulína úr mús — Balb/c 3T3, klón 31 — annaðhvort úr ATCC eða úr ECACC, var notuð í fullgildingarrannsókninni og því er mælt með henni. Nota má með góðum árangri aðrar frumur eða frumulínur með sömu aðferðalýsingu fyrir prófun, ef ræktunarskilyrðin eru löguð að sérþörfum frumnanna, en sýna verður fram á jafngildi þeirra.

Fylgjast skal reglulega með frumunum og ganga úr skugga um að ekki sé um berfrymingasmit að ræða en aðeins skal nota ósmítaðar frumur.

Þar sem UVA-næmi frumna getur aukist við hverja endursáningu skal nota Balb/c 3T3 frumur með sem lægstu umsáningsartölu, helst lægri en 100. Mikilvægt er að fylgjast reglulega með UVA-næmi Balb/c 3T3 frumna samkvæmt gæðastýringaraðferðinni sem lýst er í þessum viðmiðunareglum.

1.7.1.2. Æti og ræktunarskilyrði

Viðeigandi ræktunaræti skal notað fyrir reglulega endursáningu frumna og á meðan á prófunarferlinu stendur og ræktunarskilyrði skulu vera við hæfi. Fyrir Balb/c 3T3 frumur er notað DMEM, sem er með 10% sermi úr nýfæddum kálfum, 4 mM glútamíni, penisillíni og streptómýsini, og ræktun með rakagjöf fer fram við $37^\circ\text{C} / 7,5\% \text{CO}_2$. Það er sérstaklega mikilvægt að frumuræktunarskilyrði tryggi að tímalengd frumuhrings sé innan eðlilegra marka, samkvæmt rannsóknarsögulegum gögnum, fyrir frumum eða frumulínuna sem er notuð.

1.7.1.3. Undirbúningur rækta

Frumum úr frosnum geymslustofnum er sáð í ræktunaræti með viðeigandi þéttleika og afræktað a.m.k. einu sinni áður en þær eru notaðar í 3T3 NRU-ljóseiturrifa-prófuninni í glasi.

Í ljóseiturrifa-prófuninni er frumunum sáð í ræktunaræti með það miklum þéttleika að ræktunin hefur ekki náð samrennsli við lok prófunarinnar, þ.e. þegar lífvænleiki frumna er ákvarðaður 48 klst. eftir að frumunum var sáð. Fyrir Balb/c 3T3 frumur, sem ræktaðar eru í 96-brunna bökkum, er mælt með þéttleikanum 1×10^4 frumur í hvern brunn.

Fyrir hvert prófunarefni er frumunum sáð á sama hátt í tvo aðskilda 96-brunna bakka sem síðan eru látnir fara samskeiða í gegnum allt prófunarferlið við sömu ræktunarskilyrði, að undanskildu tímabilinu sem annar bakinn er geislaður (+ UVA/sýnilegt ljós) og hinn er hafður í myrkri (– UVA/sýnilegt ljós).

1.7.1.4. Efnaskiptavirkni

Þótt almenn krafa sé um notkun efnaskiptakerfa við allar prófanir í glasi, til að spá fyrir um hugsanleg erfðaeiturhrif og krabbameinsvaldandi áhrif, hefur hingað til ekki þekkt í ljóseiteurefnafræðinni það efni sem útheimtir efnaskiptaumbreytingar svo að efnið virki sem ljóseiteurefni í lífi eða í glasi. Því er hvorki talið nauðsynlegt né vísindalega réttlætlegt að þessi prófun sé framkvæmd með kerfi fyrir efnaskiptavirkjun.

1.7.1.5. Prófunarefni/undirbúningur

Prófunarefni skulu vera nýlögð rétt fyrir notkun nema gögn um stöðugleika sýni fram á að efni þoli slíka geymslu. Tilreiðsla í rauðu ljósi kann að vera nauðsynleg ef líklegt er að hröð ljóssundrun eigi sér stað.

Prófunarefni skulu leyst upp í jöfnuðum saltlausnum, t.d. jafnaðri saltlausn samkvæmt Earl (EBSS) eða fosfatjafnaðri saltlausn (PBS), sem verða að vera án prótínefnisþátta og ljósgleypnilita, sem segja til um sýrustig, til að koma í veg fyrir truflun meðan á ágeisluninni stendur.

Prófunarefni með takmarkaða leysni í vatni skulu leyst upp í heppilegum leysum með hundraðföldum þeim endanlega styrk, sem sóst er eftir, og síðan þynnt 1:100 með jöfnuðu saltlausninni. Ef leysir er notaður skal rúmmál hans einskorðast við 1% (rúmmálshlutfall) í öllum ræktum, þ.e. í neikvæða samanburðinum sem og í öllum styrkleikum prófunarefnisins.

Mælt er með því að nota dímetýlsúlfoxíð (DMSO) og etanól (EtOH) sem leysa. Aðrir leysar með lítill frumueiturhrif (t.d. asetón) kunna að vera heppilegir en ákveðna eiginleika þeirra þarf að meta vandlega, t.d. efnahvörf við prófunarefnið, deyfingu ljóseiturhrifa og stoðeindabindandi eiginleika.

Nota má iðublöndun, hátiðnihljóssundrun og/eða hitun í 37 °C til að auðvelda leysni ef nauðsyn krefur.

1.7.1.6. Útfjólublá ágeislun/undirbúningur

Ljósgefi: val á viðeigandi ljósgjafa og viðeigandi síun skiptir höfuðmáli við ljóseiturhrifaprófun. UVA-svæði og sýnileg svæði tengjast venjulega ljósnæmingu (7. og 10 heimild) en hins vegar skiptir UVB minna máli og er strax mjög frumueitrandi og frumueiturhrif þess aukast allt að þúsundfalt frá 313 til 280 nm (11. heimild). Viðmiðanir fyrir val á viðeigandi ljósgjafa skulu fela í sér þær grunnkröfur að ljósgjafinn sendi frá sér bylgjulengdir, sem prófunarefnið gleypir í sig, og að ljósskammturinn (sem næst innan hæfilegra tímamarka) sé nægilega mikill til að hægt sé að greina þekkt ljósnæma. Enn fremur skulu bylgjulengdir og skammtar, sem notaðir eru, ekki vera óþarflega skaðlegir prófunarkerfinu, þ.m.t. varmaútgæslun (á innrauðu sviði).

Lampar, sem líkja eftir sólarljósi, þykja ákjósanlegasti ljósgjafinn. Bæði xenón-bogar og kvikasilfursmálmhaliðbogar (með íbætiefnum) eru notaðir í sólarhermunum. Þeir síðarnefndu hafa þann kost að láta frá sér minni varma og eru ódýrari en þeir líkja ekki fullkomlega eftir sólarljósi. Þar sem allir sólarhermar gefa frá sér umtalsvert magn af UVB skulu notaðar viðeigandi síur til að draga úr hinum miklu frumueiturhrifum UVB-bylgjulengdanna.

Fyrir 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófunina skal nota ágeislunarróf sem er nánast án UVB í tíðnirófi (UVA:UVB ~ 1:20). Dæmi hafa verið birt um röfdreifingu ágeislunarstyrks í síaða sólarherminum sem notaður er í fullgildingarrannsókninni á 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi (3).

Skammtamælingar: kanna skal reglulega styrk ljóss (ágeislunarstyrk) fyrir hverja ljóseiturhrifaprófun með því að nota viðeigandi útblámamæli með breiðu mælisviði. Útblámamælirinn skal hafa verið kvarðaður við ljósgjafann. Kanna skal nothæfi útblámamælisins og er mælt með því að notaður sé annar útblámamælir af sömu gerð og með sömu kvörðun til viðmiðunar. Æskilegast er að nota öðru hverju geislarófmæli til að rófmæla ágeislunarstyrk síaða ljósgjafans og til að kanna kvörðun útblámamælisins með breiða mælisviðinu, en menn með viðeigandi þjálfun verða að fara með slík tæki.

Í fullgildingarrannsókninni reyndist skammtur, sem nemur 5 J/cm² (UVA), ekki hafa eiturrhrif á Balb/c 3T3 frumur og vera nægilega öflugur til að örva efni sem valda aðeins vægum ljóseiturhrifum. Til að ná 5 J/cm² á 50 mínútna tímabili skal stilla ágeislunarstyrkinn á 1,666 mW/cm². Ef önnur frumulína eða annar ljósgjafi er notaður getur þurft að breyta UVA-skammtinum örlítið með því að styðjast við þær viðmiðanir að hann sé ekki skaðlegur frumunum og að hann sé nægilega mikill til að greina venjuleg ljóseiturefni. Tímalengd ljósváhrifa er reiknuð á eftirfarandi hátt:

$$t(\text{mín}) = \frac{\text{Skammtur ágeislunarstyrks (J/cm}^2) \times 1000}{\text{Ágeislunarstyrkur (mW/cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sek})$$

1.7.2. Aðstæður við prófun

Hámarksstyrkur prófunarefnis skal ekki vera meiri en 100 µg/ml, þar eð öll efni með ljóseiturverkun greindust við minni styrk, en við meiri styrk eykst tíðni falsjávæðra niðurstaðna (13. heimild). Sýrustig (pH) mesta styrks prófunarefnisins skal vera fullnægjandi (pH-gildi: 6,5–7,8).

Styrksvið efnis, sem er prófað með (+ UVA) og án (- UVA) ljóss, skal hafa verið ákvarðað á fullnægjandi hátt í undirbúningstilraunum. Svið og bil milli mismunandi styrkleika skulu stillt þannig að ferlar fyrir styrkháða svörum séu nægilega studdir tilraunagögnum. Styrkleikaraðirnar, sem eru notaðar, skulu vera jafnhlutfalla (með fóstum þynningarstuðli).

1.7.3. *Prófunaraðferð* ⁽¹⁾

1.7.3.1. Fyrsti dagur

Útbúa skal frumulausn með 1×10^5 frumur/ml í ræktunaræti og setja 100 µl ræktunaræti eingöngu í ystu brunna 96-brunna örtitrunarbakka fyrir vefjaræktun (= núlllausn). Í hina brunna skal setja 100 µl af frumulausn með 1×10^5 frumur/ml (= 1×10^4 frumur á brunn). Útbúa skal tvo bakka fyrir hvert prófunarefni: annan til að ákvarða frumueiturhrif (- UVA) og hinn til að ákvarða ljóseiturhrif á frumur (+ UVA).

Frumurnar eru ræktaðar í 24 klst. (7,5% CO₂, 37 °C) þar til þær mynda hálfamsfellt einlag. Ræktun í þennan tíma gerir frumunum kleift að ná sér og ná að loða hver við aðra og þær geta vaxið með veldisfalli.

1.7.3.2. Annar dagur

Eftir ræktunartímann er ræktunarætinu hellt af frumunum og þær þvegnar tvisvar með 150 µl EBSS/PBS á hvern brunn. Bæta skal 100 µl af EBSS/PBS við með viðeigandi styrk prófunarefnis eða eingöngu leysi (neikvæður samanburður). Átta mismunandi styrkleikar prófunarefnisins eru notaðir. Frumurnar eru ræktaðar með prófunarefninu í myrki í 60 mínútur (7,5% CO₂, 37 °C).

Til að framkvæma (+ UVA) hluta greiningarinnar skal geisla frumurnar í 50 mínútur við herbergishita í gegnum lokið á 96-brunna bakkanum með 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Loftræst er með viftu til að koma í veg fyrir H₂O þéttingu undir lokinu. Hinir bakkarnir (- UVA) eru hafðir við herbergishita í myrki í 50 mínútur (= UVA-váhrifátími).

Prófunarefninu er hellt af og bakkarnir þvegnir tvisvar sinnum með 150 µl EBSS/PBS. Ræktunaræti er sett í staðinn fyrir EBSS/PBS og ræktað (7,5% CO₂, 37 °C) yfir nótt (18–22 klst.).

1.7.3.3. Þriðji dagur

Smásjárrannsókn

Frumurnar eru rannsakaðar í fasasmásjá. Breytingar á formgerð frumnanna vegna frumueitrandi áhrifa prófunarefnisins eru skráðar. Mælt er með þessari athugun til að útiloka skekkjur í tilrauninni en þessar skráningar eru ekki notaðar við mat á frumueiturhrifum eða ljóseiturhrifum.

Prófun á upptöku hlutlauss, rauðs litar.

Frumurnar eru þvegnar með 150 µl forhituðu EBSS/PBS. Þvottalausnin er fjarlægð með því að banka varlega í bakkann. Bæta skal 100 µl NR-æti við og bakkarnir eru síðan hafðir við 37 °C í rakabættu andrúmslofti með 7,5% CO₂ í 3 klst.

Því næst er NR-ætið fjarlæggt og frumurnar þvegnar með 150 µl EBSS/PBS. EBSS/PBS er hellt af og þurrkað með þerripappír. (Annar kostur er að setja bakkann á hvolf í skilvindu.)

Nákvæmlega 150 µl NR-afsogslausn (með nýlögðu etanóli/ediksýru) er bætt við.

Örtitrunarbakkinn er hristur rösklega á hristara fyrir örtitrunarbakka í 10 mínútur þar til NR hefur verið dreginn út úr frumunum og myndað einsleita lausn.

Ljósþétti NR-útdráttarinn er mæld við 540 nm í litrófsmæli og núlllausn er notuð sem viðmið. Gögnin eru vistuð með viðeigandi skrársniði (t.d. ASCII) fyrir síðari greiningar.

⁽¹⁾ Viðbótarupplýsingar er að finna í 12. heimild.

2. GÖGN

2.1. Gæði og magn gagna

Með gögnunum skal vera hægt að greina markvisst þá styrkháðu svörun sem fæst með og án UVA/sýnilegrar ágeislunar. Ef frumueiturhrif koma fram skal tilgreina mesta og minnsta styrkleika, sem prófaður er, þannig að ferillinn samræmist tilraunagögnunum. Sökum þess að möguleiki er á því að prófunarefnið sé ekki frumueitrandi allt að skilgreindum styrkmörkum, sem eru 100 µg/ml í tilrauninni í myrkri (– UVA), en að það sé mjög frumueitrandi þegar það er geislað (+ UVA) getur verið að styrksviðin, sem prófa skal í báðum hlutum tilraunarinnar, þurfi að vera ólík að stærðargráðu til að uppfylla skilyrði um viðunandi gæði gagna. Ef frumueiturhrif koma fram í hvorugum hlutum tilraunarinnar (– UVA og + UVA) nægir að framkvæma prófunina með miklu bili milli stakra skammta allt að mesta styrk.

Ekki er gerð krafa um að skýrar, jákvæðar niðurstöður séu sannprófaðar með því að endurtaka tilraunina. Ekki þarf heldur að sannprófa skýrar, neikvæðar niðurstöður að því tilskildu að prófunarefnið hafi verið prófað í nægilega miklum styrk. Í slíkum tilvikum er nægilegt að framkvæma eina aðaltilraun ásamt einni eða fleiri undirbúningstilraunum til að finna styrksvið.

Prófanir, sem gefa óvissar niðurstöður nálægt marklínu spálíkansins, skulu endurteknar til sannprófunar.

Ef nauðsynlegt er talið að endurtaka prófanir getur verið mikilvægt að hafa tilraunaaðstæður breytilegar til að fá skýrar niðurstöður. Ein aðalbreytan í þessari prófun er undirbúningur lausna með prófunarefninu. Breytingar á þessum aðstæðum (viðbótarleysiefni, mölun í duft, hátíðnihljóðsundrun) kunna þar af leiðandi að skipta mestu máli við endurtekningu prófunar. Annar kostur er að breyta ræktunartímanum fyrir ágeislun. Styttri tími kann að eiga við fyrir efni sem eru óstöðug í vatni.

2.2. Úrvinnsla niðurstaðna

Ef unnt er skal ákvarða styrk prófunarefnis sem endurspeglar 50% minnkun á upptöku NRU (EC_{50}) í frumum. Þetta má gera með því að beita viðeigandi, ólínulegri aðhvarfsaðferð (helst Hill-falli eða fjölpáttagreiningu (logistic regression)) á gögnin um styrkháða svörun eða með því að nota aðrar aðferðir við hæfi (14. heimild). Áður en EC_{50} er notað til frekari reikninga skal ganga úr skugga um réttmæti reikninganna. Einnig má nota myndrænar aðferðir til að reikna út EC_{50} . Í slíkum tilvikum er mælt með notkun líkindapappírs (x-ás: lygri, y-ás: probit) vegna þess að í mörgum tilvikum verður fall styrkháðrar svörunar næstum línulegt eftir þessa breytingu.

2.3. Mat á niðurstöðum (spálíkön)

2.3.1. Spálíkan, 1. útgáfa: ljósertandi þáttur (PIF)

Ef heilir ferlar fyrir styrkháða svörun fást með (+ UVA) og án (– UVA) ljóss er ljósertandi þátturinn (PIF) reiknaður samkvæmt eftirfarandi formúlu:

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

PIF < 5 segir fyrir um enga ljóseiturhrifagetu en PIF ≥ 5 segir fyrir um ljóseiturhrifagetu.

Ef efni er einungis frumueitrandi með UVA og ekki frumueitrandi þegar það er prófað án UVA er ekki unnt að reikna út PIF þótt slíkar niðurstöður gefi til kynna ljóseiturhrifagetu. Í slíkum tilvikum er hægt að reikna út „>PIF“ ef gerð er (– UV) prófun á frumueiturhrifum upp að mesta prófunarstyrk (C_{max}) og þetta gildi er notað til að reikna út „>PIF“,

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

Ef aðeins er hægt að fá „>PIF“ segja öll gildi > 1 fyrir um hugsanlega ljóseiturhrifagetu.

Ef hvorki er hægt að reikna út $EC_{50}(-UV)$ né $EC_{50}(+UV)$, vegna þess að viðkomandi efni sýnir engin frumueiturhrif upp að mesta prófunarstyrk, gefur það til kynna að ljóseiturhrifageta sé engin. Í slíkum tilvikum er notað formlegt „PIF = *1“ til að lýsa niðurstöðunum,

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

Ef aðeins er hægt að fá „PIF = *1“ segir það fyrir um að ljóseiturhrifageta er engin.

Í tilvikum b og c skal athuga vel þann styrk, sem fæst í 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi, þegar spáð er fyrir um hugsanlega ljóseiturhrifagetu.

2.3.2. Spálíkan, 2. útgáfa: MPE (meðaláhrif ljóss)

Annar kostur er að nota nýja útgáfu af spálíkaninu til að spá fyrir um ljóseiturhrifagetu en hún var þróuð með notkun gagna úr fullgildingarrannsókn ESB og Evrópusamtaka ilmvatns- og snyrtivöruframleiðenda (COLIPA) (15. heimild) og blindprófuð í síðari rannsókn á ljóseiturhrifum útblámasíuefna í glasi (13. heimild). Með þessu spálíkani er má sneiða hjá takmörkunum PIF-likansins í þeim tilvikum þegar ekki er hægt að fá EC₅₀. Með líkaninu er notast við „meðaláhrif ljóss“ (MPE), sem er mælikvarði sem byggist á samanburði á heilum ferlum fyrir styrkháða svörun. Fyrir beitingu MPE-likansins var þróaður við Humboldt háskólann í Berlín sérstakur tölvuhugbúnaður, sem fæst ókeypis.

2.4. Túlkun niðurstaðna

Jákvæðar niðurstöður í 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi (PIF ≥ 5 eða MPE ≥ 0,1) gefa til kynna að prófunarefnið hafi ljóseiturhrifagetu. Ef þessar niðurstöður fást með styrk sem er undir 10 µg/ml er einnig líklegt að prófunarefnið virki sem ljóseiturefni, einnig við ýmsar váhrifaadstæður í lífi. Ef jákvæðar niðurstöður fást aðeins með mesta prófunarstyrk, sem er 100 µg/ml, getur þurft að kanna fleiri atriði til að meta hættu eða ljóseiturhrifamátt. Þessi atriði geta m.a. verið gögn um gegnþrengingu, gleypni og hugsanlega uppsöfnun efnisins í húð eða prófun á efninu með annars konar staðfestingarprófun, t.d. með því að nota líkan af mannhúð í glasi.

Neikvæðar niðurstöður úr 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi (PIF < 5 eða MPE < 0,1) gefa til kynna að prófunarefnið hafi ekki verkað sem ljóseiturefni á ræktuðu spendýrafrumurnar við þær aðstæður sem voru notaðar. Í þeim tilvikum þar sem unnt var að prófa efnið upp að mesta styrk, sem er 100 µg/ml, gefa neikvæðar niðurstöður til kynna að efnið geti ekki valdið ljóseiturhrifum og telja má að ljóseiturhrif í lífi séu ólíkleg. Í þeim tilvikum þegar nákvæmlega eins styrkháð eitursvörun (EC₅₀ + UV og EC₅₀ – UV) fæst með minni styrk er túlkun á gögnum sú sama. Ef ekki er hægt að sýna fram á eiturrhrif (+ UV og – UV) og ef vatnsleysni takmarkar styrk við gildi sem eru undir 100 µg/ml má hins vegar draga í efa að greiningin henti fyrir prófunarefnið og skal þá kanna möguleikann á staðfestingarprófun (t.d. með því að nota líkan af húð í glasi eða líkan af húð utan lífs eða prófun í lífi).

3. SKÝRSLUGJÖF

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- gögn um sanngreiningu og CAS-númer, liggja þær upplýsingar fyrir,
- eðliseiginleikar og hreinleiki,
- eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem tengjast framkvæmd þessarar rannsóknar,
- stöðugleiki og stöðugleiki í ljósi, liggja þær upplýsingar fyrir.

Leysir:

- rök fyrir vali á leysi,
- leysni prófunarefnisins í þessum leysi,
- hlutfall leysis í meðhöndlunarmiðlinum (EBSS eða PBS).

Frumur:

- gerð og uppruni frumna,
- án berfryminga,
- fjöldi endursáninga frumna, liggja þær upplýsingar fyrir,
- UVA-næmi frumna sem notaðar eru í 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi, ákvarðað með ágeislunarbúnaði.

Aðstæður við prófun (a) — ræktun fyrir og eftir meðhöndlun:

- gerð og samsetning ræktunarætis,
- stýrð skilyrði (styrkur CO₂, hitastig, rakastig),
- ræktunartími (fyrir meðhöndlun, eftir meðhöndlun).

Aðstæður við prófun (b) — meðhöndlun með efninu:

- rök fyrir vali á þeim styrkleikum prófunarefnisins sem eru notaðir bæði með og án UV/sýnilegrar ágeislunar,
- rök fyrir mesta styrk, sem er prófaður, ef um er að ræða prófunarefni með takmarkaða leysni og engin frumveiturhrif,
- gerð og samsetning meðhöndlunarætisins (jöfnuð saltlausn),
- tímalengd meðhöndlunar með efninu.

Aðstæður við prófun (c) — ágeislun:

- rök fyrir vali á ljósgjafanum sem er notaður,
- eiginleikar ljósgjafans m.t.t. tíðnirófs ágeislunarstyrks,
- gegnumferðar-/gleypnieiginleikar síunnar eða síanna sem eru notaðar,
- eiginleikar geislunarmælisins og upplýsingar um kvörðun hans,
- fjarlægð ljósgjafans frá prófunarkerfinu,
- UVA-ágeislunarstyrkur í þessari fjarlægð, gefinn upp í mW/cm^2 ,
- lengd lýsingar með UV/sýnilegu ljósi,
- UVA-skammtur (ágeislunarstyrkur \times tími), gefinn upp í J/cm^2 ,
- hitastig í frumuræktum meðan á ágeislun stendur og hitastig fyrir samskeiða frumuræktir í myrkri.

Aðstæður við prófun (d) — NRU-prófun:

- samsetning NR-miðils,
- tímalengd ræktunar með NR,
- skilyrði við ræktun (styrkur CO_2 , hitastig, rakastig),
- skilyrði við NR-útdrátt (útdráttarleysir, tímalengd),
- bylgjulengd sem er notuð fyrir litrófsmælingu á ljóspéttni NR,
- önnur bylgjulengd (viðmiðun), ef hún er notuð,
- núlllausn fyrir litrófsmæli, ef hún er notuð.

Niðurstöður:

- lífvænleiki frumna við hvern styrkleika prófunarefnisins, gefinn upp sem hundraðshluti meðallífvænleika í samanburðarprófunum,
- ferlar fyrir styrkháða svörun, (styrkur prófunarefnis á móti hlutfallslegum lífvænleika frumna), sem fást í samskeiða + UVA- og – UVA-tilraunum,
- gagnagreining á ferlum fyrir styrkháða svörun: útreikningur á EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA), ef unnt er,
- samanburður á ferlunum tveimur fyrir styrkháða svörun, sem fást með og án UVA/sýnilegrar ágeislunar, annaðhvort með því að reikna út ljósertandi þáttinn (PIF) eða með því að reikna út meðaláhrif ljóss (MPE),
- flokkun hugsanlegrar ljóseiturhrifagetu,
- samþykktarviðmiðanir fyrir prófun (a) — samskeiða, neikvæður samanburður:
 - algildur lífvænleiki (ljóspéttni NR-útdráttar) ágeislaðra og ógeislaðra frumna,
 - rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, meðalfrávik og staðalfrávik.
- samþykktarviðmiðanir fyrir prófun (b) — samskeiða, jákvæður samanburður:
 - EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA) og PIF jákvæðs samanburðarefnis,
 - rannsóknarsöguleg gögn um jákvætt samanburðarefni: EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA) og PIF, meðalfrávik og staðalfrávik.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar.**Ályktanir.*

4.

HEIMILDASKRÁ

- 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. og 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, bls. 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. nóvember 1997, *ATLA* 26, bls. 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. og 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, bls. 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, bls. 95–102.
- 6) Santamaria, L. og Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry*, 3. bindi, 1. hluti, North Holland Publishing Co, Amsterdam, bls. XI–XXXV.
- 7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Saporá, O. og Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, bls. 314–348.
- 8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, ritstj. K.C Smith, Plenum Press, New York, 2. útgáfa, bls. 79–110.
- 9) Borenfreund, E. og Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, bls. 119–124.
- 10) Lambert L. A, Warner W.G. og Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, ritstýrt af FN Marzulli og HI Maibach, gefið út af Taylor & Francis, Washington DC, 5. útgáfa, bls. 515–530.
- 11) Tyrrell R.M. og 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, bls. 1825–1829.
- 12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, samið 23. desember 1997 af M. Liebsch og samþykkt 6. mars 1998 af stjórnarhópi verkefnis ESB og COLIPA „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. og 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, bls. 679–708.
- 14) Holzhütter, H.G. og Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, bls. 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, bls. 445–462.

Viðbætur

Hlutverk 3T3 NRU-ljóseiturhrifaprófunar í raðprófun á ljóseiturhrifum efna

