

KOMMISJONSDIREKTIV 2000/33/EF

2006/EØS/58/34

av 25. april 2000

om 27. tilpasning til den tekniske utvikling av rådsdirektiv 67/548/EØF om tilnærming av lover og forskrifter om klassifisering, emballering og merking av farlige stoffer(*)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP
HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP
HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 67/548/EØF av 27. juni 1967 om tilnærming av lover og forskrifter om klassifisering, emballering og merking av farlige stoffer(1), sist endret ved europaparlaments- og rådsdirektiv 1999/33/EF(2), særlig artikkel 28, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Vedlegg V til direktiv 67/548/EØF fastsetter metoder for bestemmelse av stoffers og stoffblandingers fysisk-kjemiske egenskaper, toksisitet og økotoksitet. Det er nødvendig å tilpasse nevnte vedlegg til den tekniske utvikling.
- 2) I henhold til artikkel 7 nr. 2 i rådsdirektiv 86/609/EØF av 24. november 1986 om tilnærming av medlemsstatenes lover og forskrifter om vern av forsøksdyr og dyr til andre vitenskapelige formål⁽³⁾ skal et forsøk ikke utføres dersom det på en rimelig og praktisk måte er mulig å oppnå det ønskede resultat ved hjelp av en annen vitenskapelig tilfredsstillende metode som ikke medfører bruk av dyr.
- 3) Kommisjonen akter å innføre alternative forsøksmetoder som ikke innebærer bruk av dyr, i vedlegg V til direktiv 67/548/EØF, slik at metodene kan benyttes ved prøving av kjemikalier i henhold til artikkel 3 nr. 1 i direktiv 67/548/EØF.
- 4) Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Komiteen for tilpasning til den tekniske utvikling av direktiver om fjerning av tekniske handelshindringer på området farlige stoffer og stoffblandinger —

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

Artikkel 1

Vedlegg I og II til dette direktiv tilføyes til del B i vedlegg V til direktiv 67/548/EØF.

Artikkel 2

1. Medlemsstatene skal innen 1. oktober 2001 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

2. Medlemsstatene skal oversende Kommisjonen teksten til de viktigste internrettslige bestemmelser som de vedtar på det området dette direktiv omhandler og en sammenligningstabell som viser sammenhengen mellom dette direktiv og de vedtatte nasjonale bestemmelser.

Artikkel 3

Dette direktiv trer i kraft den tredje dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fellesskaps Tidende*.

Artikkel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 25. april 2000.

For Kommisjonen
Margot WALLSTRÖM
Medlem av Kommisjonen

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 136 av 8.6.2000, s. 90, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 59/2004 av 26. april 2004 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se EØS-tillegget til Den europeiske unions tidende nr. 43 av 26.8.2004, s. 25.

(*) Vedtatt før 26. tilpasning.

(1) EFT 196 av 16.8.1967, s. 1.

(2) EFT L 199 av 30.7.1999, s. 57.

(3) EFT L 358 av 18.12.1986, s. 1.

VEDLEGG I

«B.40 HUDETSSENDE VIRKNING

1. **METODE**1.1. **Innledning**

Det europeiske senter for validering av alternative metoder (ECVAM, Det felles forsknings-senter, Europakommisjonen) har anerkjent to *in vitro*-forsøk for hudetsende virkning som vitenskapelig validert: Måling av transkutan elektrisk motstand (TER) i rottehud og et forsøk der det benyttes en menneskehudmodell (1) (2) (3). ECVAM-valideringsstudien har vist at begge forsøkene var pålitelige med hensyn til å skille mellom stoffer med og uten hudetsende virkning. Forsøksprotokollen basert på menneskehudmodellen gjorde det dessuten mulig å skille korrekt mellom grader av etsende virkning (stoffer med kjent alvorlig hudetsende virkning, R35, og andre hudetsende stoffer, R34) (2). Beskrivelser og framgangsmåte er angitt for begge disse forsøkene. Valg av forsøk avhenger av brukerens spesielle krav og preferanser.

Se også den generelle innledningen til del B.

1.2. **Definisjoner**

Hudetsende virkning: Irreversible vevsskader i huden som følge av anbringelse av forsøksmateriale.

1.3. **Referansestoffer**

Ingen er angitt, men se nr. 1.5.3.4 og 1.7.2.3.

1.4. **Prinsipp for forsøksmetoden — TER-forsøk med rottehud**

Forsøksmaterialet legges på i opptil 24 timer på epidermis av hudlapper tatt fra huden på humant avlivede unge rotter. Etsende materialer identifiseres ved sin evne til å framkalle skader på stratum corneum og redusere dets barrierefunksjon, noe som kan måles som en reduksjon av naturlig TER under terskelverdien (5 k Ω) (4) (5). Irriterende og ikke-irriterende materialer reduserer ikke TER under terskelverdien. Et fargebindingstrinn kan legges inn i forsøket for overflateaktive stoffer og nøytrale organiske stoffer (se definisjoner i henvisning (6)) for å redusere antallet falskt positive resultater som naturlig forekommer med disse kjemiske stoffene (2) (7).

1.5. **Beskrivelse av forsøksmetoden — TER-forsøk med rottehud**1.5.1. *Dyr*

Til tilberedning av hudlappene benyttes unge (20-23 dager gamle) rotter (Wistar eller lignende stamme). Hår fra rygg og flanke fjernes omhyggelig med en liten dyresaks. Dyrene vaskes deretter omhyggelig, idet området nedsenkes i antibiotisk løsning (for eksempel med streptomycin, penicillin, kloramfenikol og amfotericin i konsentrasjoner som er tilstrekkelige til å hindre bakterievekst). Dyrene vaskes igjen med antibiotika tredje og fjerde dag etter første vask, og brukes innen tre dager (dyrene må ikke være eldre enn 31 dager for tilberedning av hudlapper).

1.5.2. *Tilberedning av hudlapper*

Dyrene avlives humannt. Rygg huden på hvert dyr fjernes og renses for overflødig fett ved forsiktig avskrelling. Huden anbringes på enden av et PTFE-rør (polytetrafluoretylen), idet det sikres at epidermis er i kontakt med røret. En tett omsluttende O-ring av gummi festes rundt enden av røret for å holde huden på plass, og overflødig vev klippes av. Dimensjonene til røret og O-ringen er vist i figur 1. O-ringen forsegles til enden av røret med vaselin. Røret holdes fast av en fjærklemme i et reseptorkammer som inneholder magnesiumsulfatløsning (154 mM) (figur 2).

1.5.3. *Framgangsmåte*1.5.3.1. *Anbringelse av forsøksmaterialet*

Flytende forsøksstoffer (150 μ l) legges på epidermis inne i røret (figur 2). Ved forsøk med faste stoffer anbringes en tilstrekkelig mengde av stoffet på hudlappen til å sikre at hele overflaten er dekket av stoffet. Avionisert vann (150 μ l) tilføyes deretter stoffet, og rørene ristes forsiktig. Forsøksstoffene skal ha størst mulig kontakt med huden. For enkelte faste stoffer oppnås dette ved oppvarming til 30 °C, slik at forsøksstoffet smelter, eller ved maling til et kornet materiale eller pulver.

Tre hudlapper benyttes for hvert forsøksstoff. Forsøksstoffene legges på i 24 timer (se også nr. 1.5.3.4). Forsøksstoffet fjernes ved skylling under rennende vann som holder høyst 30 °C, til det ikke er mulig å fjerne mer materiale. Fjerningen av forsøksstoff som er stivnet i røret, går lettere ved skylling med en vannstråle med temperatur ca. 30 °C.

1.5.3.2. TER - målinger

TER måles ved hjelp av en vekselstrømmålebro med lav spenning (f.eks. AIM 401 eller 6401, eller tilsvarende). Før den elektriske motstanden måles, reduseres overflatespenningen i huden ved tilførsel av en tilstrekkelig mengde 70 % etanol til å dekke epidermis. Etter noen få sekunder fjernes etanolen ved at røret snus opp-ned, og vevet fuktes ved tilsetning av 3 ml magnesiumsulfatløsning (154 mM). Målebroens elektroder plasseres på hver side av hudlappen for å måle motstanden i kΩ/hudlapp (figur 2). Elektrodedimensjonene og lengden av elektrodene under krokodilleklemmene er vist i figur 1. Den indre (tykke) krokodilleklemmen hviler på toppen av PTFE-røret under motstandsmålingen for å sikre at lengden av elektroden som er nedsenket i magnesiumsulfatløsningen, er konstant. Den ytre (tynne) elektroden plasseres inne i reseptorkammeret slik at det hviler på bunnen av kammeret. Avstanden mellom bunnen av fjærklemmen og bunnen av PTFE-røret holdes konstant (figur 1), siden denne avstanden påvirker den målte motstandsverdien.

Merk at dersom motstandsverdien er større enn 20 kΩ, kan dette skyldes at forsøksstoffet ligger som et belegg på hudlappens epidermis. Dette laget kan forsøkes fjernet, for eksempel ved at PTFE-røret forsegles med en tommelfinger i en gummihanske og ristes i ca. 10 sekunder; magnesiumsulfatløsningen kasseres, og motstandsmålingen gjentas med ny magnesiumsulfatløsning.

Gjennomsnittsverdiene av TER-resultatene godtas, forutsatt at samtidige positive og negative kontrollverdier er innenfor akseptable grenser for metoden. Følgende kontrollstoffer og akseptable motstandsintervaller foreslås for metodikken og utstyret som er beskrevet her:

Kontroll	Stoff	Motstandsintervall (kΩ)
Positiv	10 M saltsyre (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Destillert vann	10-25

1.5.3.3. Framgangsmåte tilpasset overflateaktive og nøytrale organiske stoffer

Dersom TER-verdiene for forsøksstoffer som er enten overflateaktive eller nøytrale organiske stoffer, er mindre enn eller lik 5 kΩ, kan en evaluering av fargegjennomtrengningen i vevet foretas. Dette kan avgjøre om resultatene er falskt positive (2).

1.5.3.3.1. Pålegging og fjerning av sulforodamin B-fargestoff

Etter behandling med forsøksstoffet legges 150 µl av en 10 % (vekt/volum) løsning av sulforhodamin B-fargestoff i destillert vann på hver hudlapps epidermis i to timer. Hudlappene skylles deretter i ca. 10 sekunder under rennende vann som holder høyst romtemperatur, for å fjerne eventuelt overflødig/ubundet fargestoff. Hver hudlapp fjernes forsiktig fra PTFE-røret og anbringes i en preparatflaske (f.eks. en 20 ml glasscintillasjonsflaske) med avionisert vann (8 ml). Flaskene ristes forsiktig i fem minutter for å fjerne eventuelt overflødig/ubundet fargestoff. Denne skylleprosessen gjentas, hvoretter hudlappene fjernes og anbringes i preparatflasker med 5 ml 30 % (vekt/volum) natriumdodecylsulfat (SDS) i destillert vann og inkuberes ved 60 °C over natten. Etter inkubasjonen fjernes og kasseres hver hudlapp, og resten av løsningen sentrifugeres i 8 minutter ved 21 °C (relativ sentrifugalkraft ~ 175). En 1 ml prøve av supernatanten fortynnes 1:5 (volum/volum) (1 ml + 4 ml) med 30 % (vekt/volum) SDS i destillert vann. Løsningens optiske tetthet (OD) måles ved ca. 565 nm.

1.5.3.3.2. Beregning av fargeinnhold

Innholdet av sulforodamin B-fargestoff per hudlapp beregnes ut fra OD-verdiene (sulforodamin Bs molare ekstinksjonskoeffisient ved 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvekt = 580). Innholdet av sulforodamin B-fargestoff bestemmes for hver hudlapp og gjennomsnittsverdien beregnes. Gjennomsnittsverdiene for fargebinding godtas dersom de samtidig oppnådde kontrollverdiene er innenfor et akseptabelt intervall for metoden. Følgende akseptable fargestoffintervaller foreslås for kontrollstoffene for metodikken og utstyret som er beskrevet her:

Kontroll	Stoff	Motstandsintervall (µg/lapp)
Positiv	10 M saltsyre (36 %)	40-100
Negativ	Destillert vann	15-35

1.5.3.4. Tilleggsopplysninger

Forsøksstoffene kan også anbringes på hudlapper for kortere tidsrom (f.eks. to timer) for å identifisere materialer som er sterkt etsende. I valideringsstudien ble imidlertid TER-forsøket funnet å overvurdere det etsende potensialet til flere kjemiske stoffer etter anbringelse på hudlappene i to timer (2), selv om den etter anbringelse i 24 timer korrekt kunne identifisere etsende og ikke-etsende stoffer.

Forsøksutstyrets egenskaper og dimensjoner og den anvendte forsøksmetoden kan påvirke de beregnede TER-verdiene. Terskelverdien for etsing, 5 kΩ, ble fastsatt på grunnlag av data oppnådd med det bestemte utstyret og framgangsmåten beskrevet i denne metoden. Forskjellige terskel- og kontrollverdier kan bli aktuelle dersom forsøksvilkårene endres vesentlig. Det anbefales derfor at metodikken og motstandsterskelen kalibreres ved prøving av en rekke referansestandarder valgt blant de kjemiske stoffene som er brukt i valideringsstudien (3).

1.6. Prinsipp for forsøksmetoden — Forsøksmodell med menneskehud

Forsøksmaterialet pålegges lokalt i opptil 4 timer på en tredimensjonal menneskehudmodell som består av en rekonstruert epidermis med et funksjonelt stratum corneum. Etsende materialer identifiseres ved sin evne til å redusere cellenes levedyktighet (f.eks. påvist ved hjelp av MTT-reduksjonsprøven) under fastsatte terskelverdier for bestemte eksponeringstider. Forsøksprinsippet er i samsvar med hypotesen om at kjemikalier som er etsende, er i stand til å trenge gjennom stratum corneum (ved diffusjon og erosjon) og er tilstrekkelig cytotoksiske til å framkalle celledød i de underliggende cellelagene.

1.7. Beskrivelse av forsøksmetoden — Forsøksmodell med menneskehud

1.7.1. Modeller med menneskehud

Modeller med menneskehud kan stamme fra forskjellige kilder, men de må oppfylle visse kriterier. Modellen må ha et funksjonelt stratum corneum med et underliggende lag av levende celler. Dette kan påvises ved hjelp av modellens motstandskraft mot cytotoxisitet etter anbringelse av stoffer som man vet er cytotoksiske mot celler, men som vanligvis ikke trenger gjennom stratum corneum. Modellen skal gi resultater som er reproduserbare under fastsatte forsøksvilkår.

Levedyktigheten til de levende cellene i modellen må være tilstrekkelig høy til at det kan skilles klart mellom positive og negative kontrollstoffer. Cellenes levedyktighet (for eksempel målt ved mengden av MTT-reduksjon, dvs. en OD-verdi) etter eksponering for negativt kontrollstoff må være innenfor akseptable grenser for den aktuelle modellen. Likeledes må verdiene for cellenes levedyktighet med positivt kontrollstoff (i forhold til dem for negativ kontroll) være innenfor de oppgitte grenser. Det viktigste er at det må være påvist at beregningsmodellen som benyttes, overholder den internasjonale valideringsstandard (2).

1.7.2. Framgangsmåte

1.7.2.1. Anbringelse av forsøksmaterialet

For flytende stoffer anbringes tilstrekkelig forsøksstoff til at hudoverflaten dekkes (minst 25 µl/cm²). For faste stoffer anbringes tilstrekkelig forsøksstoff til at hudoverflaten dekkes, og det fuktes for å sikre god kontakt med huden. Om nødvendig males faste stoffer til et pulver før anbringelse. Anbringelsesmetoden må være påvist egnet til en rekke forskjellige kjemikalier (2). Ved slutten av eksponeringen vaskes forsøksmaterialet omhyggelig av hudoverflaten med saltløsning.

1.7.2.2. Måling av cellenes levedyktighet

Enhver anerkjent kvantitativ metode for måling av cellenes levedyktighet kan benyttes. Den hyppigst benyttede metode er MTT-reduksjon, som har vist seg å gi nøyaktige og reproduserbare resultater i forskjellige laboratorier (2). Hudlappen plasseres i en MTT-løsning på 0,3 mg/ml ved 20-28 °C i tre timer. Det ufelte blå formazanet ekstraheres (løsemiddelekstraksjon) og formazankonsentrasjonen måles ved bestemmelse av OD ved en bølgelengde mellom 545 og 595 nm.

1.7.2.3. Tilleggsopplysninger

Den anvendte hudmodellen og en nøyaktig protokoll over eksponeringstid osv. har stor innflytelse på måleresultatene for cellenes levedyktighet. Det anbefales at metodikken og beregningsmodellen kalibreres ved prøving av en rekke referansestandarder valgt blant de kjemiske stoffene brukt i ECVAM-valideringsstudien (3). Det er av avgjørende betydning at den anvendte metoden er påvist å gi reproducerbare resultater innen og mellom forskjellige laboratorier for en rekke forskjellige kjemikalier, i samsvar med internasjonale standarder (2), og resultatene av en slik valideringsstudie skal være offentliggjort i et vitenskapelig tidsskrift med fagfellevurdering.

2. DATA

2.1. Behandling av resultatene

2.1.1. TER-forsøk med rottehud

Motstandsverdiene ($k\Omega$) for forsøksmaterialet, positive og negative kontroller og alle standard referanse kjemikalier skal presenteres i tabellform, herunder data for flergangsbestemmelser/gjentatte forsøk, gjennomsnittsverdier og avledet klassifikasjon.

2.1.2. Forsøksmodell med menneskehud

OD-verdier og beregnede prosentverdier for cellenes levedyktighet, positive og negative kontroller og alle standard referanse kjemikalier skal presenteres i tabellform, herunder data for flergangsbestemmelser/gjentatte forsøk, gjennomsnittsverdier og avledet klassifikasjon.

2.2. Evaluering og tolkning av resultatene

2.2.1. TER-forsøk med rottehud

Dersom den gjennomsnittlige TER-verdien for forsøksstoffet er større enn 5 $k\Omega$, er stoffet ikke etsende. Dersom TER-verdien er mindre enn eller lik 5 $k\Omega$ og forsøksstoffet ikke er et overflateaktivt eller nøytralt organisk stoff, er stoffet etsende.

For overflateaktive eller nøytrale organiske stoffer som gir TER-verdier mindre enn eller lik 5 $k\Omega$, kan stoffets fargegjennomtrenning undersøkes. Dersom gjennomsnittlig fargestoffinnhold i hudlappen er større enn eller lik gjennomsnittlig fargestoffinnhold i hudlappen for positiv kontroll med 36 % HCl, er prøvestoffet sant positivt og dermed etsende. Dersom gjennomsnittlig fargestoffinnhold i hudlappen er mindre enn gjennomsnittlig fargestoffinnhold i hudlappen for positiv kontroll med 36 % HCl, er forsøksstoffet falskt positivt og dermed ikke etsende.

2.2.2. Forsøksmodell med menneskehud

OD-verdien for negativ kontroll representerer 100 % levedyktighet for cellene. Dermed kan OD-verdiene for hver prøve fra forsøk brukes til å beregne prosentvis levedyktighet i forhold til den negative kontrollen. Den prosentvise terskelverdien mellom etsende og ikke-etsende forsøksstoffer (eller for å skille mellom forskjellige kategorier av etsende virkning) må være klart definert i beregningsmodellen før metoden valideres, og senere valideringsstudier må vise at terskelverdien er hensiktsmessig (2).

3. FRAMLEGGING AV RESULTATER

Forsøksrapport

Forsøksrapporten skal minst inneholde følgende opplysninger:

Forsøksstoff:

- identifikasjonsdata, fysisk art, og om relevant, fysisk-kjemiske egenskaper. Tilsvarende opplysninger skal angis for eventuelle referansestoffer.

Forsøksvilkår:

- nærmere beskrivelse av framgangsmåten,
- beskrivelse av og begrunnelse for eventuelle endringer.

Resultater:

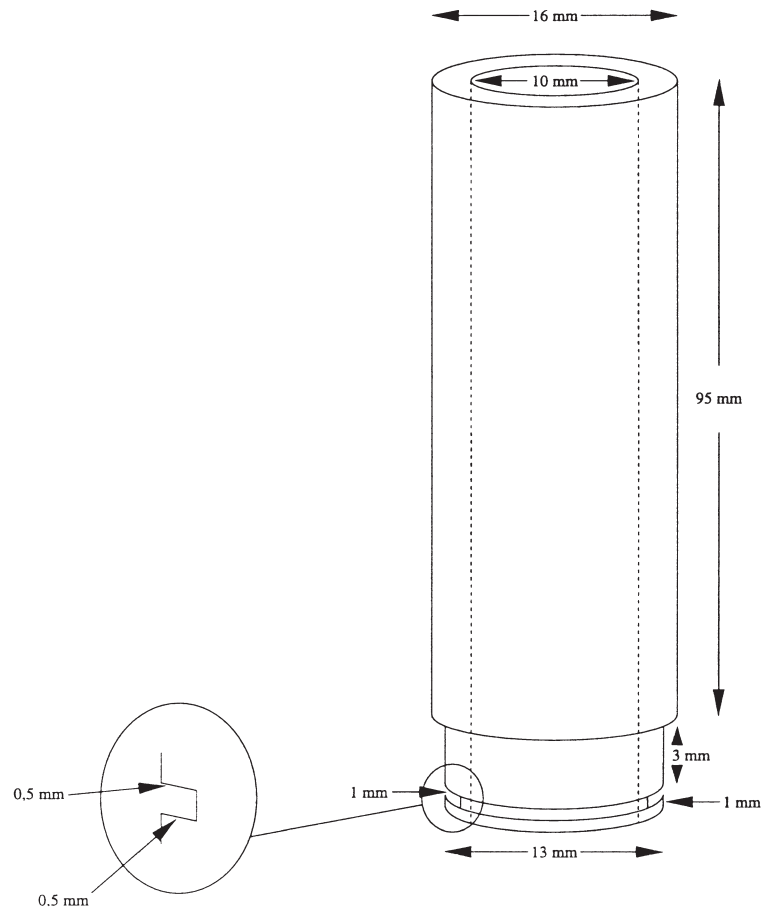
- presentasjon i tabellform av motstandsverdiene (TER-verdiene) eller cellenes prosentvise levedyktighet (forsøksmodell med menneskehud) for forsøksmaterialet, positive og negative kontroller og alle standard referansekjemikalier, herunder data for flergangsbestemmelser/gjentatte forsøk og gjennomsnittsverdier,
- beskrivelse av eventuelle andre observerte virkninger.

*Drøfting av resultatene**Konklusjoner***4. HENVISNINGER**

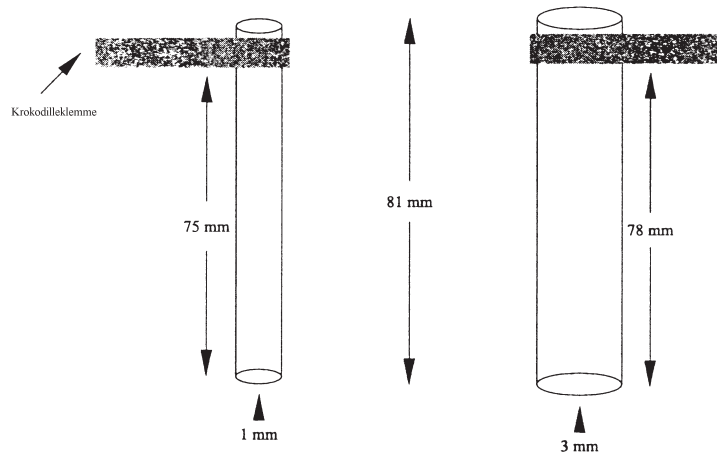
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, pp.275-280.
- (2) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balis, M., Botbam, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results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

Figur 1

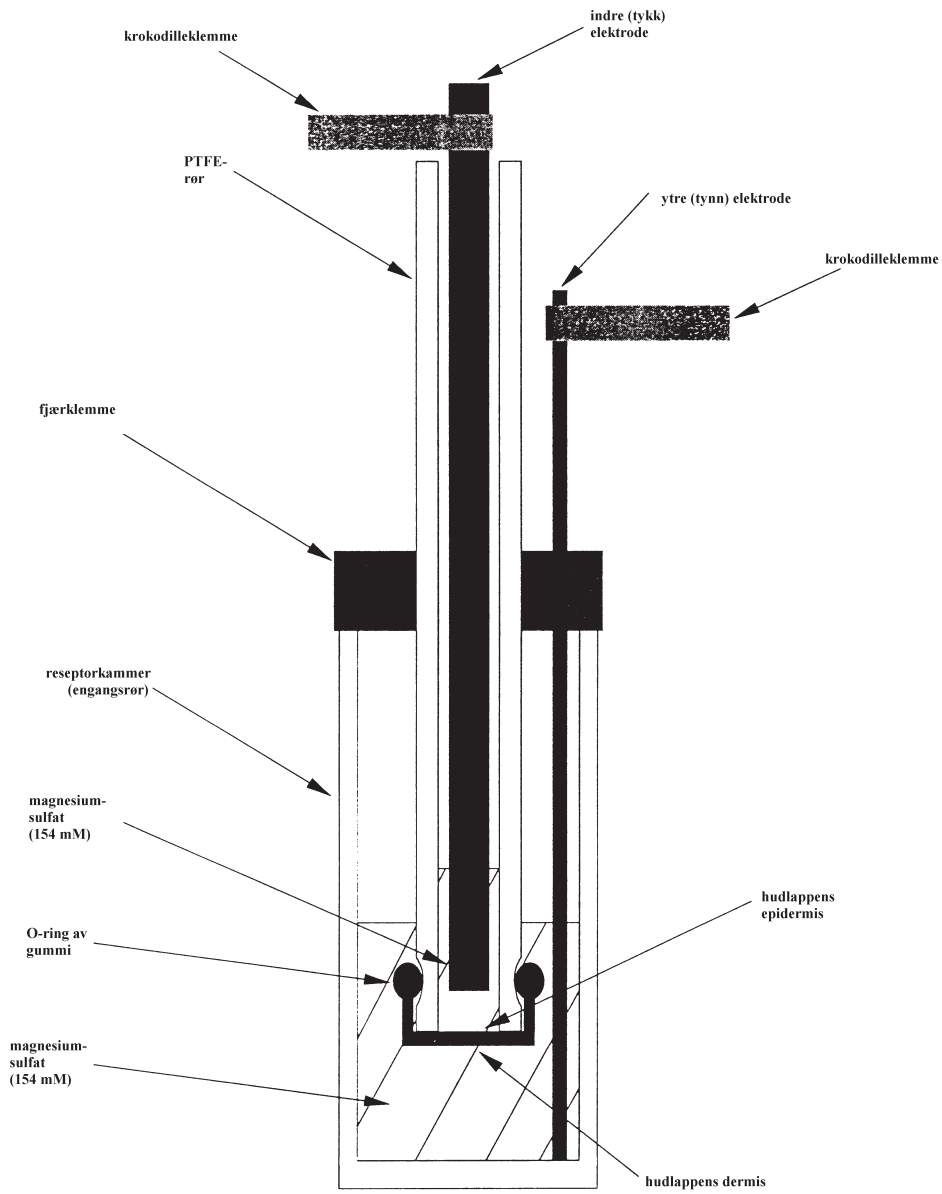
PTFE-rorets dimensjoner



Elektrodedimensjoner



Figur 2
Utstyr for TER-forsøk med rottehud



VEDLEGG II

«B.41. FOTOTOKSISITET — IN VITRO-3T3 NRU-FOTOTOKSISITETSFORSLØK

1. **METODE**1.1. **Innledning**

Fototoksitet defineres som en toksisk respons som framkalles på huden etter første eksponering for visse kjemikalier og påfølgende eksponering for lys, eller som framkalles ved bestråling av hud etter systemisk tilførsel av en kjemikalie.

Opplysninger utledet av *in vitro*-3T3 NRU-fototoksitetsforsøket bidrar til identifikasjon av et forsøksstoff's fototoksiske potensial, dvs. tilstedeværelse eller fravær av mulige farer ved forsøksstoffet i forbindelse med UV-lys og synlig lys.

Siden det toksikologiske endepunktet for *in vitro*-forsøket er bestemmelse av fototoksitet induert av den kombinerte virkningen av kjemikalie og lys, kan bestanddeler som er fototoksiske *in vivo* etter systematisk anbringelse og fordeling på huden, og bestanddeler som opptrer som fotoirriterende etter lokal anbringelse på huden, identifiseres ved hjelp av forsøket.

In vitro-3T3 NRU-fototoksitetsforsøket ble utviklet og validert i et felles EU/COLIPA-prosjekt i 1992-1997 (1) (2) (3) med sikte på å etablere et alternativ til de forskjellige *in vivo*-forsøkene som var i bruk. I 1996 anbefalte en OECD-arbeidsgruppe bruk av en rekke *in vitro*-forsøk til vurdering av fototoksitet (4).

Resultater fra *in vitro*-3T3 NRU-fototoksitetsforsøket ble sammenlignet med akutte fototoksitets-/fotoirritasjonsvirkninger *in vivo* på dyr og mennesker, og forsøket har vist seg å være utmerket til å forutsi disse virkningene. Forsøket er ikke ment å forutsi andre skadelige virkninger som kan oppstå som følge av kombinasjonen av kjemikalie og lys, f.eks. fotogenotoksitet, fotoallergi eller fotokarsinogenitet, selv om mange kjemikalier med nevnte egenskaper vil reagere positivt på *in vitro*-3T3 NRU-fototoksitetsforsøket. Forsøket er for øvrig ikke ment for vurdering av fototoksisk styrke.

En sekvensiell framgangsmåte for forsøk med kjemikaliers fototoksitet er beskrevet i tillegget.

1.2. **Definisjoner**

Strålingsintensitet: Intensiteten av ultrafiolett (UV) eller synlig lys på en overflate, målt i W/m² eller mW/cm².⁴

Lysdose: Mengden (= intensitet × tid) av ultrafiolett (UV) eller synlig lys på en overflate, uttrykt i joule (= W × s) per overflateareal, f.eks. J/m² eller J/cm².

Bølgelengde for UV-lys: Betegnelser anbefalt av CIE (Commission internationale de l'éclairage, Den internasjonale kommisjon for belysning) er: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Andre betegnelser benyttes også: Grensen mellom UVB og UVA settes ofte ved 320 nm, og UVA kan inndeles i UV-A1 og UV-A2 med et skille ved ca. 340 nm.

Cellenes levedyktighet: Parameter som måler cellepopulasjonens samlede aktivitet (f.eks. opptak av det viktige fargestoffet nøytralrødt i cellenes lysosomer) som, avhengig av målemetoden og forsøkets utforming, korrelerer med cellenes samlede antall og/eller levedyktighet.

Cellenes relative levedyktighet: Cellenes levedyktighet uttrykt ut fra negativkontroller (løsemiddel) som har gjennomgått hele forsøksprosedyren (enten + UV eller - UV), men ikke blitt behandlet med forsøksstoff.

Beregningsmodell: En algoritme som brukes til å overføre resultatene av et toksisitetforsøk til beregning av toksisk potensial. I disse retningslinjene kan PIF og MPE benyttes til å overføre resultatene fra *in vitro*-3T3 NRU-fototoksitetsforsøket til beregning av fototoksisk potensial.

PIF (fotoirritasjonsfaktor): En faktor som beregnes ved sammenligning av to like effektive cytotoxiske konsentrasjoner (EC₅₀) av forsøksstoffet uten (- UV) og med (+ UV) ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synlig lys.

MPE (gjennomsnittlig fotoeffekt): En ny måleenhet utledet ved matematisk analyse av den fullstendige konsentrasjon/respons-kurven registrert uten (- UV) og med (+ UV) ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synlig lys.

Fototoksisitet: En akutt toksisk respons som framkalles på huden etter første eksponering for visse kjemikalier og påfølgende eksponering for lys, eller som framkalles ved bestråling av hud etter systemisk tilførsel av en kjemikalie.

Fotoirritasjon: En underkategori av «fototoksisitet» som beskriver bare de fototoksiske reaksjoner som framkalles på huden etter eksponering for kjemikalier (lokalt eller oralt). Disse fototoksiske reaksjonene fører alltid til ikke-spesifikke celleødeleggelser (minner om solbrenthet).

Fotoallergi: En ervervet immunologisk reaktivitet som ikke forekommer ved første behandling med kjemikalie og lys, men der hudens reaktivitet først kan påvises etter en induksjonstid på 1-2 uker.

Fotogenotoksisitet: En genotoksisk respons observert ved et genetisk endepunkt etter at celler eksponeres for en ikke-genotoksisk dose av UV/synlig lys og en ikke-genotoksisk kjemikalie.

Fotokarsinogenitet: Kreftframkallende virkning framkalt ved gjentatt eksponering for lys og kjemikalie. Uttrykket «fotokokarsinogenese» benyttes dersom UV-indusert tumorigenese forsterkes av en kjemikalie.

1.3. Referansestoffer

Foruten kjemikalien klorpromazin som positiv kontroll, som prøves samtidig i hvert forsøk, anbefales det med sikte på nyetablering av 3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket at det som referanse kjemikalier benyttes et utvalg av kjemikaliene som benyttes i ringforsøk med dette forsøket (1) (3) (13).

1.4. Innledende merknader

Mange typer kjemikalier er rapportert å gi fototoksiske virkninger (5) (6) (7) (8). Det eneste fellestrekket er deres evne til å absorbere lysenergi fra sollys. Ifølge fotokjemiens første lov (Grotthaus-Drapers lov) krever fotoreaksjon tilstrekkelig absorpsjon av lyskvanter. Før et biologisk forsøk etter disse retningslinjene kan utføres, må derfor kjemikalienes absorpsjonsspektrum for UV/synlig lys bestemmes (f.eks. etter OECD-retningslinje 101). Dersom den molare ekstinksjons-/absorpsjonskoeffisienten er mindre enn $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, har kjemikalien intet fotoreaktivt potensial, og det er unødvendig å utføre *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket eller andre biologiske forsøk for fotokjemiske skadevirkninger (tillegg).

1.5. Prinsipp for forsøksmetoden

Det er påvist fire mekanismer der absorpsjon av lys ved en (kjemisk) kromofor kan framkalle en fototoksisk respons (7). De fører alle til celleødeleggelse. *In vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket er derfor basert på sammenligning av en kjemikalies cytotoksisitet ved forsøk med og uten eksponering for en ikke-cytotoksisk dose av UVA/synlig lys. Cytotoksisitet uttrykkes i dette forsøket som en konsentrasjonsavhengig reduksjon av opptaket av det viktige fargestoffet nøytralrødt (NR) (9) 24 timer etter behandling med forsøksstoff og bestråling.

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så det dannes ettlags cellekultur. To 96-brønners plater per forsøksstoff preinkuberes deretter med åtte forskjellige konsentrasjoner av kjemikalien i en time. Deretter eksponeres den ene av platene for en ikke-cytotoksisk dose med UVA/synlig lys på 5 J/cm^2 UVA (+ UV-forsøk), mens den andre oppbevares mørkt (- UV-forsøk). På begge platene erstattes deretter behandlingsmediet med dyrkingsmediet, og etter 24 timers inkubasjon bestemmes cellenes levedyktighet ved NRU-opptak (nøytralrødt) i tre timer. Cellenes relative levedyktighet, uttrykt som en prosentdel av ubehandlede negative kontroller, beregnes for hver av de åtte forsøkskonsentrasjonene. Ved vurdering av fototoksisk potensial sammenlignes den konsentrasjonsavhengige responsen med (+ UV) og uten (- UV) bestråling, vanligvis på EC_{50} -nivået, dvs. ved den konsentrasjon som nedsetter cellenes levedyktighet med 50 % i forhold til ubehandlede kontroller.

1.6. Kvalitetskriterier

Cellenes UVA-følsomhet, historiske data: Cellenes følsomhet for UVA bør kontrolleres regelmessig. Cellene sås med samme tetthet som i *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket, bestråles påfølgende dag med UVA-doser på $1-9 \text{ J/cm}^2$, og cellenes levedyktighet bestemmes en dag senere ved NRU-forsøket. Cellene oppfyller kvalitetskriteriene dersom levedyktigheten etter bestråling med 5 J/cm^2 er minst 80 % av levedyktigheten til kontrollcellene som er oppbevart mørkt. Ved høyeste dose på 9 J/cm^2 UVA skal levedyktigheten være minst 50 % av den til kontrollcellene som er oppbevart mørkt. Denne kontrollen gjentas ved ca. hver 10. cellegenerasjon.

UVA-følsomheten til cellene for negativkontroll, foreliggende forsøk: Forsøket oppfyller kvalitetskriteriene dersom negativkontrollene (cellene i Earls balanserte saltløsning — Earl's Balanced Salt Solution [EBSS] med eller uten 1 % dimetylsulfoksid [DMSO] eller 1 % etanol [EtOH]) i + UVA-forsøket viser en levedyktighet på minst 80 % av levedyktigheten for de ikke-bestrålte cellene i samme løsemiddel i forsøket foretatt i mørke samtidig (- UVA).

Negativkontrollenes levedyktighet: Den absolutte optiske tettheten ($OD_{540\text{ NRU}}$) målt i NR-ekstrakten til negativkontrollene angir om de 1×10^4 cellene sådd per brønn har vokst med normal fordoblingstid i forsøket to døgn. Et forsøk oppfyller kriteriene dersom gjennomsnittlig $OD_{540\text{ NRU}}$ for ubehandlede kontrollceller er $\geq 0,2$.

Positiv kontroll: En kjent fototoksisk kjemikalie skal prøves samtidig med hvert *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøk. Klorpromazin (CPZ) ble brukt som positivkontrollstoff i EU/COLIPA-valideringsstudien, og anbefales derfor. For CPZ prøvd med standardprotokollen i de to *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøkene ble følgende forsøkskriterier fastsat: CPZ bestrålt (+ UVA): $EC_{50} = 0,1-2,0 \mu\text{g/ml}$, CPZ ikke-bestrålt (- UVA): $EC_{50} = 7,0-90,0 \mu\text{g/ml}$. Fotoirritasjonsfaktoren (PIF), dvs. endringen av EC_{50} , bør være minst 6.

Andre kjente fototoksiske kjemikalier som passer til den kjemiske klassen eller løselighetsegenskapene til forsøksstoffene som evalueres, kan benyttes til samtidige positivkontroller i stedet for CPZ. I så fall skal intervallet til EC_{50} -verdiene og PIF eller MPE (gjennomsnittlig fotoeffekt) være riktig definert som akseptkriterier for forsøket, ut fra historiske data.

1.7. Beskrivelse av forsøksmetoden

1.7.1. Forberedelser

1.7.1.1. Celler

En permanent musefibroblastcellelinje — Balb/c 3T3, klon 31 — enten fra ATCC (American Type Culture Collection) eller fra ECACC (European Collection of Cell Cultures) — ble brukt i valideringsstudien, og anbefales derfor. Andre celler eller cellelinjer kan med hell brukes med samme forsøksprotokoll dersom dyrkingsvilkårene tilpasses til cellenes bestemte behov, men likeverdigheten må påvises.

Cellene må regelmessig kontrolleres for fravær av mykoplasmakontaminering, og kan brukes bare dersom resultatet av kontrollen er tilfredsstillende.

Siden cellenes UVA-følsomhet kan øke med antallet cellegenerasjoner, bør Balb/c 3T3-cellene med lavest mulig antall benyttes, fortrinnsvis under 100. Det er viktig at UVA-følsomheten til Balb/c 3T3-cellene kontrolleres regelmessig etter den framgangsmåten for kvalitetskontroll som er beskrevet i disse retningslinjene.

1.7.1.2. Medier og dyrkingsvilkår

Egnede dyrkingsmedier og inkubasjonsvilkår benyttes til rutinedyrking av celler og under forsøket. For Balb/c 3T3-cellene er det DMEM supplert med 10 % serum fra nyfødte kalver, 4 mM glutamin, penicillin og streptomycin samt inkubasjon ved $37^\circ\text{C} / 7,5\% \text{CO}_2$. Det er spesielt viktig at celledyrkingsvilkårene at tiden for cellesyklus er innenfor det normale for de anvendte cellene eller cellelinjene.

1.7.1.3. Tilberedning av kulturer

Nedfryste celler sås i et dyrkingsmedium med passende tetthet og subkultur anlagt minst én gang før *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket.

For fototoksisitetsforsøket sås cellene i et dyrkingsmedium med en slik tetthet at cellekulturene ikke har nådd konfluens ved avslutningen av forsøket, dvs. når cellenes levedyktighet bestemmes 48 timer etter cellesåingen. For Balb/c 3T3-celler dyrket i 96-brønners plater er anbefalt celletetthet 1×10^4 celler per brønn.

For hvert forsøksstoff sås cellene identisk på to forskjellige 96-brønners plater som deretter gjennomgår forsøket samtidig under identiske dyrkingsvilkår, bortsett fra det tidsrommet da den ene av platene bestråles (+ UVA/synlig lys) mens den andre oppbevares i mørke (- UVA/synlig lys).

1.7.1.4. Stoffskifteaktivering

Mens bruk av stoffskifteaktiverende systemer vanligvis er nødvendig for alle *in vitro*-forsøk for beregning av genotoksisk og kreftframkallende potensial, kjenner man for fototoksisitet ingen kjemikalie som krever stoffskifteomdanning for at kjemikalien skal fungere som et fototoksin *in vivo* eller *in vitro*. Det er dermed verken nødvendig eller vitenskapelig påkrevd å gjennomføre forsøket med et stoffskifteaktiverende system.

1.7.1.5. Forsøksstoff/tilberedning

Forsøksstoffene skal være ferskt tilberedt umiddelbart før bruk, med mindre stabilitetsdata påviser at oppbevaring kan godtas. Tilberedning under rødt lys kan være nødvendig dersom hurtig fotokjemisk nedbryting kan finne sted.

Forsøksstoffene oppløses i saltbufferløsning, f.eks. Earls balanserte saltløsning — (EBSS, Earl's Balanced Salt Solution) eller fosfatbufret saltløsning (PBS, Phosphate Buffered Saline), som for å unngå interferens under bestrålingen må være fri for proteinbestanddel og lysabsorberende pH-indikatorfarger.

Forsøksstoffer med begrenset vannløselighet oppløses i egnede løsemidler, i en konsentrasjon som er 100 ganger høyere enn den ønskede, som deretter fortynnes til 1:100 med den bufrede saltløsningen. Dersom det benyttes et løsemiddel, skal det finnes i et konstant volum på 1 % (v/v) i alle kulturer, dvs. i negativkontrollene så vel som i samtlige konsentrasjoner av forsøkskjemikalien.

Anbefalte løsemidler er dimetylsulfoksid (DMSO) og etanol (EtOH). Andre løsemidler med lav cytotoxiskitet (som aceton) kan være egnet, men de bør vurderes nøye for bestemte egenskaper, f.eks. mulighetene for reaksjon med forsøksstoffet, demping av fototoksisk virkning eller evnen til å binde radikaler.

Vortex-blanding og/eller behandling i sonikator og/eller oppvarming til 37 °C kan om nødvendig benyttes for å øke løseligheten.

1.7.1.6. UV-bestråling/tilberedning

Lyskilde: Valget av egnet lyskilde og egnede filter er den mest avgjørende faktoren for fototoksisitetsforsøket. UVA og synlig lys forbindes vanligvis med fotosensibilisering (7) (10), mens UVB er mindre relevant og er svært cytotoxisk, idet det øker cytotoxiskiteten 1 000 ganger mellom 313 og 280 nm (11). Blant kriteriene for valg av egnet lyskilde er det viktig at lyskilden avgir bølgelengder som absorberes av forsøksstoffet, og at lysdosen (som kan oppnås innen rimelig tid) er tilstrekkelig til å påvise kjente fotosensibiliserende stoffer. Dessuten skal de anvendte bølgelengdene og dosene, herunder varmeavgivelse (infrarødt lys), ikke være unødvendig skadelig for forsøksystemet.

Simulering av sollys med solsimulatorer anses som den optimale lyskilde. Både xenonbuer og (doped) kvikksølvmetallhalogenidbuer brukes i solsimulatorer. Sistnevnte har den fordel at de avgir mindre varme og er rimeligere, men den gir ikke en fullstendig etterligning av sollys. Siden alle solsimulatorer avgir betydelige mengder UVB, bør de utstyres med egnede filtre for å dempe de svært cytotoxiske UVB-bølgelengdene.

For *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket bør et bestrålingsspektrum som er praktisk talt fritt for UVB benyttes (UVA:UVB ~ 1:20). Et eksempel på den spektrale strålingsfordelingen til den filtrerte solsimulatoren som er benyttet i valideringsstudien til *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket, er offentliggjort (3).

Dosimetri: Strålingsintensiteten (irradians) skal kontrolleres regelmessig før hvert fototoksisitetsforsøk ved hjelp av et egnet bredbånds-UV-meter. UV-meteret skal være kalibrert for lyskilden. UV-meterets ytelse skal være kontrollert, og til dette anbefales et ekstra referanse-UV-meter av samme type og kalibrering. Ideelt skal det ved større intervaller benyttes et spektrometer til å måle spektral strålingsintensitet til den filtrerte lyskilden og kontrollere kalibreringen til bredbånds-UV-meteret, men slike instrumenter krever kyndig behandling av særlig opplærte personer.

En dose på 5 J/cm² (UVA) ble i valideringsstudien konstatert ikke å være cytotoxisk for Balb/c 3T3-celler og tilstrekkelig kraftig til å aktivere selv svakt fototoksiske kjemikalier. For å oppnå 5 J/cm² på 50 minutter måtte strålingsintensiteten justeres til 1,666 mW/cm². Dersom en annen cellelinje eller en annen lyslinje benyttes, er det mulig at UVA-dosen må tilpasses noe, slik at den ikke er skadelig for cellene, men fortsatt er tilstrekkelig til å påvise standard fototoksiner. Lyseeksponeringstiden beregnes som følger:

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

1.7.2. Forsøksvilkår

Den høyeste konsentrasjonen av en kjemikalie som prøves, skal ikke overstige 100 µg/ml, idet alle fototoksiske kjemikalier er påvist ved lavere konsentrasjoner, mens høyere konsentrasjoner har en tendens til å gi flere falskt positive resultater (13). pH til forsøksstoffets høyeste konsentrasjon skal være tilfredsstillende (6,5-7,8).

Konsentrasjonsområdene for en kjemikalie prøvd med (+ UVA) og uten (- UVA) lys bør fastsettes i et forutgående forsøk. Område og intervaller til en konsentrasjonsrekke skal justeres slik at konsentrasjon/respons-kurvene blir tilstrekkelig underbygd av måldata. Geometriske konsentrasjonsrekker (med konstant uttynningsfaktor) bør benyttes.

1.7.3. Framgangsmåte⁽⁴⁾

1.7.3.1. Første dag

En cellesuspensjon tilberedes av 1×10^5 celler/ml i et dyrkingsmedium, og 100 µl dyrkingsmedium anbringes i de ytre brønnene på en 96-brønners mikrolittplate for vevskultur (=blindprøver). I resten av brønnene pipetteres 100 µl av en cellesuspensjon med 1×10^5 celler/ml (= 1×10^4 celler/brønn). For hvert forsøksstoff tilberedes to plater: Én for bestemmelse av cytotoxisitet (- UVA) og én for bestemmelse av fotocytotoxisitet (+ UVA).

Cellene inkuberes i 24 timer (7,5 % CO₂, 37 °C) til de danner et halvveis sammenflytende enkeltlag. Denne inkubasjonstiden gjør det mulig for cellene å regenerere og feste seg og å vokse eksponensielt.

1.7.3.2. Annen dag

Etter inkubasjonen dekanteres dyrkingsmediet fra cellene, og det vaskes to ganger med 150 µl EBSS/PBS per brønn. Det tilsettes 100 µl EBSS/PBS med passende konsentrasjon av forsøksstoffet eller bare løsemiddel (negativ kontroll). Det benyttes åtte forskjellige konsentrasjoner av forsøksstoffet. Cellene inkuberes med forsøksstoffet i mørke i 60 minutter (7,5 % CO₂, 37 °C).

Under + UVA-forsøket bestråles cellene ved romtemperatur i 50 minutter gjennom lokket på 96-brønnersplaten med 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Ventilering med vifte forhindrer H₂O-kondens under lokket. Duplikatplatene (- UVA) oppbevares i mørke ved romtemperatur i 50 minutter (= UVA-eksponeringstiden).

Forsøksløsningen dekanteres, og vaskes to ganger med 150 µl EBSS/PBS. EBSS/PBS erstattes med dyrkingsmedium, og det inkuberes (7,5 % CO₂, 37 °C) over natten (18-22 timer).

1.7.3.3. Tredje dag

Mikroskopevaluering

Cellene undersøkes under et fasekontrastmikroskop. Endringer i cellenes morfologi på grunn av cytotoxiske virkninger fra forsøksstoffet registreres. Denne kontrollen anbefales for å utelukke feil i forsøket, men registreringene benyttes ikke til evaluering av cytotoxisitet eller fototoxisitet.

Cellenes opptak av nøytralrødt

Cellene vaskes med 150 µl forhåndsvarmet EBSS/PBS. Vaskeløsningen fjernes med lett banking. 100 µl NR-medium tilsettes og inkuberes ved 37 °C i fuktig atmosfære med 7,5 % CO₂ i tre timer.

Etter inkubasjonen fjernes NR-mediet, og cellene vaskes med 150 µl EBSS/PBS. EBSS/PBS dekanteres og fjernes helt. (Den snudde platen kan eventuelt sentrifugeres.)

Det tilsettes nøyaktig 150 µl NR-desorpsjonsløsning (nytilberedt etanol/eddiksyre).

Mikrolittplaten ristes hurtig på et risteapparat for mikrolittplater i ti minutter, til NR er ekstrahert fra cellene og har dannet en homogen løsning.

Den optiske tettheten til NR-ekstrakten måles ved 540 nm i et spektrofotometer, med negativkontroller som referanse. Dataene lagres i et passende filformat (f.eks. ASCII) for senere analyse.

⁽⁴⁾ Nærmere opplysninger finnes i henvisning 12.

2. DATA

2.1. Dataenes kvalitet og kvantitet

Dataene bør gi muligheter for en meningsfull analyse av konsentrasjon/respons-kurven registrert med og uten UVA/synlig lys. Dersom cytotoxisitet påvises, skal både konsentrasjonsområdet og intervallet mellom enkeltkonsentrasjonene presenteres på en slik måte at det kan avsettes en kurve for måledataene. Siden det er en mulighet for at forsøksstoffet ikke er cytotoxisk opp til grensekonsentrasjonen på 100 µg/ml i forsøket i mørke (- UVA), men er svært cytotoxisk ved bestråling (+ UVA), kan det være nødvendig å undersøke det aktuelle stoffet i forskjellige fortynningsrekker i de to systemene for å sikre tilstrekkelig datakvalitet. Dersom det ikke påvises cytotoxisitet i noen av de to forsøkene (- UVA og + UVA), er det tilstrekkelig med store intervaller mellom enkeltdosene opp til høyeste konsentrasjon.

Det er ikke nødvendig med verifisering med nye forsøk dersom resultatet er klart positivt. Videre er det nødvendig med verifisering av klart negative resultater dersom forsøksstoffet er undersøkt ved tilstrekkelig høye konsentrasjoner. I slike tilfeller holder det med ett hovedforsøk støttet av ett eller flere forberedende forsøk for å finne konsentrasjoner.

Forsøk med resultater nær grenseverdien for beregningsmodellen skal gjentas for verifisering.

Dersom det er nødvendig å gjenta forsøk, kan variasjoner i forsøksvilkår være viktige for å oppnå et klart resultat. En viktig variabel i dette forsøket er tilberedningen av løsninger av forsøksstoffet. Variasjon i disse vilkårene (annet løsemiddel, finmaling, behandling i sonikator) kan altså være særdeles relevant ved gjentakelsen av et forsøk. Eventuelt kan variasjon av inkubasjonstiden før bestråling vurderes. Kortere tid kan være aktuelt for stoffer som er ustabile i vann.

2.2. Behandling av resultatene

Om mulig bestemmes konsentrasjonen av et forsøksstoff som representerer 50 % hemming av celle-NRU (EC₅₀). Dette kan gjøres ved å bruke en passende ikke-lineær regresjonsprosedyre (fortrinnsvis en Hill-funksjon eller logistisk regresjon) på konsentrasjon/respons-dataene. Før EC₅₀ benyttes til videre beregninger, skal kvaliteten på kurvetilpasningen kontrolleres. Alternativt kan metoder for grafisk tilpasning brukes til beregning av EC₅₀. I så fall anbefales bruk av logaritmisk sannsynlighetspapir (x-akse: log, y-akse: probit), siden konsentrasjon/respons-kurven i mange tilfeller blir tilnærmet lineær etter denne transformasjonen.

2.3. Evaluering av resultatene (beregningsmodeller)

2.3.1. Beregningsmodell 1: Fotoirritasjonsfaktor (PIF)

Dersom det oppnås fullstendige konsentrasjon/respons-kurver både med lys (+ UVA) og uten lys (- UVA), beregnes fotoirritasjonsfaktoren (PIF) etter følgende formel:

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

PIF < 5 indikerer ingen fototoxisitet, mens PIF ≥ 5 indikerer fototoxisk potensial.

Dersom en kjemikalie bare er cytotoxisk + UVA og ikke cytotoxisk - UVA, kan ikke PIF beregnes, selv om dette er et resultat som indikerer fototoxisk potensial. I slike tilfeller kan «> PIF» beregnes dersom (- UV)-cytotoxisitetsforsøket utføres opp til høyeste forsøkskonsentrasjon (C_{max}) og denne verdien brukes til beregning av «> PIF»:

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

Dersom bare «> PIF» kan oppnås, indikerer enhver verdi > 1 fototoxisk potensial.

Dersom verken EC₅₀ (- UV) eller EC₅₀ (+ UV) kan beregnes fordi en kjemikalie ikke utviser cytotoxisitet opp til høyeste forsøkskonsentrasjon, indikerer det intet fototoxisk potensial. I slike tilfeller brukes et formelt «PIF = *1» for å karakterisere resultatet:

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

Dersom bare et «PIF = *1» kan oppnås, indikerer det intet fototoksisk potensial.

I tilfelle (b) og (c) bør konsentrasjonene oppnådd i *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket vurderes nøye ved beregning av fototoksisk potensial.

2.3.2. Beregningsmodell 2: Gjennomsnittlig fotoeffekt (MPE)

Som alternativ kan en ny versjon av modellen for beregning av fototoksisk potensial benyttes; den er utviklet ved hjelp av data fra EU/COLIPA-valideringsstudien (15) og blindprøvd i en påfølgende *in vitro*-undersøkelse av UV-filterkjemikaliers fototoksisitet (13). Denne modellen har ikke begrensningene ved PIF-modellen i tilfeller der EC₅₀ ikke kan beregnes. Modellen benytter «gjennomsnittlig fotoeffekt» (MPE), en måleverdi som bygger på sammenligning av de fullstendige konsentrasjon/respons-kurvene. For bruk av MPE-modellen ble det utviklet egen programvare ved Humboldt-universitetet (Berlin) som kan fås gratis.

2.4. Tolking av resultatene

Et positivt resultat i *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket (PIF ≥ 5 eller MPE ≥ 0,1) indikerer at forsøksstoffet har fototoksisk potensial.

Dersom dette resultatet oppnås ved konsentrasjoner under 10 µg/ml, er det også sannsynlig at forsøksstoffet er fototoksisk under forskjellige lyseksposeringsvilkår *in vivo*. Dersom et positivt resultat oppnås bare ved den høyeste konsentrasjonen på 100 µg/ml, kan det være nødvendig med flere beregninger for å vurdere stoffets fareegenskaper og fototoksiske potensial. Dette kan omfatte data for gjennomtrengning, absorpsjon og mulig akkumulering av stoffet i huden, eller bruk av alternativt forsøk for å fastslå stoffets egenskaper, f.eks. med en *in vitro*-modell med menneskehud.

Et negativt resultat i *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket (PIF < 5 eller MPE < 0,1) indikerer at forsøksstoffet ikke er fototoksisk for pattedyrceller dyrket under de angitte vilkårene. I tilfeller der stoffet kan testes opp til høyeste konsentrasjon på 100 µg/ml, indikerer et negativt resultat at stoffet ikke har fototoksisk potensial, og fototoksisitet *in vivo* er usannsynlig. I tilfeller der identiske konsentrasjon-/toksisitetsrespons (EC₅₀ + UV og EC₅₀ - UV) oppnås ved lavere konsentrasjoner, blir tolkningen av dataene den samme. Dersom det derimot ikke påvises toksisitet (+ UV og - UV) og vannløseligheten har begrenset konsentrasjonene til under 100 µg/ml, kan det stilles spørsmålsteget ved forsøkets egnethet for det aktuelle stoffet, og bekreftende forsøk bør vurderes (f.eks. bruk av en *in vitro*-hudmodell eller en *ex vivo*-hudmodell).

3. FRAMLEGGING AV RESULTATER

Forsøksrapport

Forsøksrapporten skal inneholde følgende opplysninger:

Forsøksstoff:

- identifikasjonsdata og CAS-nummer, om kjent,
- fysisk art og renhet,
- fysisk-kjemiske egenskaper som er relevante for studien,
- stabilitet og fotostabilitet, om kjent.

Løsemiddel:

- begrunnelse for valg av løsemiddel,
- forsøksstoffets løselighet i løsemiddelet,
- prosentdel av løsemiddel i behandlingsmediet (EBSS eller PBS).

Celler:

- cellenes type og opprinnelse,
- fravær av mykoplasma,
- antall cellegenerasjoner, om kjent,
- cellenes UVA-følsomhet, bestemt med strålingsutstyret brukt i *in vitro*-3T3 NRU-fototoksisitetsforsøket.

Forsøksvilkår (a) — inkubasjon før og etter behandling:

- dyrkingsmediets type og sammensetning,
- inkubasjonsvilkår (CO₂-konsentrasjon, temperatur, fuktighet),
- inkubasjonens varighet (før og etter behandling).

Forsøksvilkår (b) — behandling med kjemikalien:

- begrunnelse for valg av konsentrasjoner av forsøksstoffet både med og uten bestråling av UV/synlig lys,
- ved begrenset løselighet for forsøksstoffet og fravær av fototoksisitet: Begrunnelse for høyeste anvendte konsentrasjon,
- behandlingsmediets type og sammensetning (saltbufferløsning),
- varigheten av den kjemiske behandlingen.

Forsøksvilkår (c) — bestråling:

- begrunnelse for valg av lyskilde,
- lyskildens spektrale strålingsegenskaper,
- filterets transmisjons-/absorpsjonsegenskaper,
- radiometerets egenskaper og opplysninger om kalibreringen,
- lyskildens avstand fra forsøkssystemet,
- UVA-strålingsintensitet for den aktuelle avstanden, uttrykt i mW/cm^2 ,
- varigheten av eksponeringen for UV/synlig lys,
- UVA-dose (strålingsintensitet \times tid), uttrykt i J/cm^2 ,
- temperaturen i cellekulturen under bestrålingen og i den tilsvarende cellekulturen samtidig oppbevart i mørke.

Forsøksvilkår (d) — NRU-forsøk:

- NR-mediets sammensetning,
- NR-inkubasjonens varighet,
- inkubasjonsvilkår (CO_2 -konsentrasjon, temperatur, fuktighet),
- vilkår for NR-ekstraksjon (ekstraksjonsmiddel, varighet),
- bølgelengde brukt til spektrofotometriavlesning av optisk tetthet for NR,
- eventuell referansebølgelengde,
- innhold i eventuell spektrofotometrisk referanse (blindprøve).

Resultater:

- cellenes levedyktighet for hver konsentrasjon av forsøksstoffet, uttrykt som prosent for gjennomsnittlig levedyktighet for kontrollene,
- konsentrasjon/respons-kurver (forsøksstoffkonsentrasjon mot cellenes relative levedyktighet), oppnådd i samtidige forsøk + UVA – UVA
- dataanalyse av konsentrasjon/respons-kurver: Om mulig beregning av EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA),
- sammenligning av de to konsentrasjon/respons-kurvene, oppnådd med og uten bestråling med UVA/synlig lys, enten ved beregning av fotoirritasjonsfaktoren (PIF) eller ved beregning av gjennomsnittlig fotoeffekt (MPE),
- klassifisering av fototoksisk potensial,
- kriterier for å godta forsøket (a) — samtidig negativ kontroll:
 - absolutt levedyktighet (NR-ekstraktens optiske tetthet) for bestrålte og ikke-bestrålte celler,
 - historiske data for negativ kontroll, gjennomsnittsverdier og standardavvik,
- kriterier for å godta forsøket (b) — samtidig positiv kontroll:
 - EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA) og PIF for positivkontrollkjemikalien,
 - historiske data for positivkontrollkjemikalien: EC_{50} (+ UVA) og EC_{50} (– UVA) og PIF, gjennomsnittsverdier og standardavvik.

*Drøfting av resultatene**Konklusjoner*

4. HENVISNINGER

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

Tillegg
3T3 NRU-fototoksisitetsforsøkets rolle i en sekvensiell framgangsmåte for prøving av kjemikaliers fototoksisitet

