

B.69 PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RhCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST [23](#)

Die vollständige Beschreibung dieser Prüfmethode wurde gestrichen.
Die gleichwertige internationale Prüfmethode ist in Teil 0 [Tabelle 2](#) aufgeführt.

Azug aus: Verordnung (EU) 2019/1390 der Kommission vom 31. Juli 2019 zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 492 (2017). Als *schwere Augenschädigung* werden nach dem Global harmonisierten System (UN GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (1) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ⁽¹⁾ das Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder schwerwiegende Verschlechterungen des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges bezeichnet, die innerhalb von 21 Tagen nach Applikation nicht vollständig reversibel sind. Ebenfalls nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung bezeichnet *Augenreizung* das Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Prüfchemikalien, die schwere Augenschädigungen auslösen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 eingestuft. Chemikalien die Augenreizungen hervorrufen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 eingestuft. Prüfchemikalien, die nicht als augenreizende oder schwer augenschädigende Stoffe eingestuft werden, sind als Stoffe definiert, bei denen die Kriterien für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (2A oder 2B) nicht erfüllt sind, d. h. sie werden als Stoffe der UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung bezeichnet.
2. Zur Beurteilung von schweren Augenschädigungen bzw. Augenreizungen wurden bislang in der Regel Labortiere verwendet (PM B.5 (2)). Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (39) erfolgen.
3. Die Prüfmethode beschreibt ein *In-vitro*-Verfahren zur Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Für diese Prüfmethode wird rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel (RhCE) verwendet, das die histologischen, morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften des menschlichen Hornhautepithels weitgehend widerspiegelt. Vier weitere *In-vitro*-Prüfmethoden wurden validiert, als wissenschaftlich fundiert bewertet und als PM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) und B.68 (6) zur Bewertung der Endpunkte für schwere Augenschädigungen bzw. für Augenreizungen beim Menschen angenommen.
4. Bei dieser Prüfmethode kommen zwei validierte im Handel erhältliche RhCE-Modelle zum Einsatz. Zur Beurteilung von Augenreizungen / schweren Augenschädigungen anhand des EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) und des SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT) wurden Validierungsstudien durchgeführt (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Bei diesen Prüfungen wurden jeweils im Handel erhältliche RhCE-Gewebemodelle als Prüfsystem verwendet. Diese Prüfungen werden im Folgenden die validierten Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) genannt. Aufgrund dieser Validierungsstudien und nach dem unabhängigen Peer-Review dieser Studien (9) (12) wurde festgestellt, dass Chemikalien (Stoffe und Gemische), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend bzw. schwer augenschädigend nach dem UN GHS erfordern, mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT korrekt ermittelt werden. Daher wurden diese Prüfungen für diesen Zweck als wissenschaftlich fundiert empfohlen (13).
5. Gegenwärtig herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Draize-Augentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne *In-vitro*-Prüfmethode ersetzt werden kann (2) (14), die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen ist es jedoch möglich, den Draize-Augentest durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethode im Rahmen (gestufter) Prüfstrategien (z. B. des Bottom-up- oder des Top-down-Ansatzes) vollständig zu ersetzen (15). Der Bottom-up-Ansatz (15) wird verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie Augenreizungen nicht in einem Umfang auslöst, der eine Einstufung erfordern würde. Umgekehrt wird der Top-down-Ansatz (15) verwendet, wenn nach den vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie schwere Augenschädigungen hervorrufft. Der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT werden empfohlen, um im Rahmen einer Prüfstrategie (z. B. des von Scott u. a. empfohlenen Bottom-up- oder Top-down-Ansatzes) etwa in einem ersten Schritt bei einem Bottom-up-Ansatz oder

⁽¹⁾ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

in einem der letzten Schritte bei einem Top-down-Ansatz ohne weitere Prüfung Chemikalien zu ermitteln, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN-GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Keine Einstufung) (15). Zur Unterscheidung zwischen der UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (schwere Augenschädigung) und der UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 (Augenreizung) sind der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT jedoch nicht vorgesehen. Diese Unterscheidung muss in einem weiteren Schritt einer Prüfstrategie vorgenommen werden (15). Eine Prüfchemikalie, bei der die Durchführung des EpiOcular™ EIT oder SkinEthic™ HCE EIT zur Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend als erforderlich betrachtet wird, muss daher einer weiteren Untersuchung (*in vitro* und/oder *in vivo*) unterzogen werden (z. B. durch die PM B.47, B.48, B.61 oder B.68), um zu einem endgültigen Ergebnis (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung, UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) zu gelangen.

6. Diese Prüfmethode beschreibt das Verfahren zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer mit der MTT-Prüfung (16) (Nummer 21) gemessenen Fähigkeit, bei einem RhCE-Gewebemodell eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die Viabilität des RhCE-Gewebes nach Behandlung mit einer Prüfchemikalie wird im Vergleich zu Geweben ermittelt, die mit dem Negativkontrollstoff behandelt wurde (Viabilität in %). Nach dieser Viabilität wird das Augengefährdungspotenzial der Prüfchemikalie angegeben.
7. Verfügbare Leistungsstandards (17) erleichtern die Validierung neuer oder modifizierter *In-vitro*-Prüfungen unter Verwendung von RhCE ähnlich dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT nach den Grundsätzen von OECD Guidance Document Nr. 34 (18) und ermöglichen eine frühzeitige Änderung der OECD TG 492 zur entsprechenden Berücksichtigung. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur für Prüfungen garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Prüfungen von der OECD überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

8. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

9. Diese Prüfmethode beruht auf im Handel erhältlichen dreidimensionalen RhCE-Gewebemodellen, die entweder mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (d. h. EpiOcular™ OCL-200) oder mit humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen (d. h. SkinEthic™ HCE/S) hergestellt wurden. Die RhCE-Gewebemodelle EpiOcular™ OCL-200 und SkinEthic™ HCE/S spiegeln das dreidimensionale *In-vivo*-Hornhaut-Epithelgewebe wider und werden aus Zellen der zu untersuchenden Spezies hergestellt (19) (20). Mit den Prüfungen werden die Zytotoxizität infolge der Durchdringung der Hornhaut durch die Chemikalien und die Induzierung von Zell- und Gewebeschäden direkt gemessen. Die gemessene zytotoxische Reaktion gibt dann Aufschluss über den Gesamtumfang der *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen auftreten (Nummer 20). Der Zytotoxizität kommt jedoch eine wichtige, wenn nicht gar die entscheidende, grundlegende Bedeutung bei der Ermittlung des Gesamtumfangs der schweren Augenschädigungen bzw. der Augenreizungen aufgrund der Wirkung einer Chemikalie zu, die sich unabhängig von den Gewebeschädigungen zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen *in vivo* in einer Hornhauttrübung, einer Iritis, einer Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußert.
10. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierungsstudie wurden vielfältige Chemikalien sowie zahlreiche unterschiedliche Chemikaliertypen, Chemikalienklassen, Molekulargewichte, log-P-Werte, chemische Strukturen usw. berücksichtigt. Die Validierungsdatenbank für den EpiOcular™ EIT enthielt insgesamt 113 Chemikalien, darunter 95 verschiedene organische Funktionsgruppen entsprechend einer Analyse mit der QSAR-Toolbox der OECD (8). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 3 Homopolymere, 5 Copolymere und 10 Quasipolymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 113 Prüfchemikalien wie folgt: 13 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 15 Feststoffe der Kategorie 1, 6 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 7 Flüssigkeiten der Kategorie 2B, 7 Feststoffe der Kategorie 2B, 27 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 28 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (8). Die Validierungsdatenbank für den SkinEthic™ HCE EIT enthielt insgesamt 200 Chemikalien, darunter 165 verschiedene organische Funktionsgruppen (8) (10) (11). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 10 Polymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 200 Prüfchemikalien wie folgt: 27 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 24 Feststoffe der Kategorie 1, 19 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 9 Flüssigkeiten der 2B, 8 Feststoffe der Kategorie 2B, 50 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 53 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (10) (11).

11. Diese Prüfmethode ist bei Stoffen und Gemischen sowie bei Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffen und Wachsen anwendbar. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig sein, Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. In den Validierungsstudien wurden keine Gase und Aerosole bewertet. Obwohl deren Prüfung mit der RhCE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.
12. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan (natürlich oder nach einer Behandlung), und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Gewebeviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur. Die Art der möglicherweise erforderlichen geeigneten Kontrollen hängt von der Art der durch die Prüfchemikalie ausgelösten Interferenzen und vom Verfahren zur Quantifizierung von MTT-Formazan ab (Nummern 36-42).
13. Die Ergebnisse von Vorvalidierungsstudien (21) (22) und von umfassenden Validierungsstudien (8) (10) (11) haben gezeigt, dass sowohl der EpiOcular™ EIT als auch der SkinEthic™ HCE EIT auch in Labors durchgeführt werden können, die noch nicht über Erfahrungen mit der Durchführung dieser Assays verfügen, und dass die Ergebnisse sowohl innerhalb der Labors als auch zwischen den Labors reproduzierbar sind. Diesen Studien zufolge liegt die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim EpiOcular™ EIT mit Daten zu 113 Chemikalien bei 95 % (innerhalb von Labors) bzw. 93 % (zwischen Labors). Die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim SkinEthic™ HCE EIT mit Daten zu 120 Chemikalien beträgt 92 % (innerhalb von Labors) bzw. 95 % (zwischen Labors).
14. Der EpiOcular™ EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (8) ergeben sich für den EpiOcular™ EIT eine Gesamtgenauigkeit von 80 % (bei 112 Chemikalien), eine Sensitivität von 96 % (bei 57 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 4 % (bei 57 Chemikalien), eine Spezifität von 63 % (bei 55 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 37 % (bei 55 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. In einer Studie, in der 97 flüssige agrochemische Zubereitungen mit dem EpiOcular™ EIT geprüft wurden, wurde für diese Art von Gemischen eine ähnliche Leistungsfähigkeit der Prüfmethode festgestellt wie in der Validierungsstudie (23). Die 97 Zubereitungen verteilten sich wie folgt: 21 Kategorie 1, 19 Kategorie 2A, 14 Kategorie 2B und 43 Keine Einstufung bei Einstufung nach dem UN GHS bezogen auf Referenzdaten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14). Folgende Werte wurden ermittelt: Gesamtgenauigkeit 82 % (97 Zubereitungen), Sensitivität 91 % (54 Zubereitungen), Falsch-negativ-Rate 9 % (54 Zubereitungen), Spezifität 72 % (43 Zubereitungen) und Falsch-positiv-Rate 28 % (43 Zubereitungen) (23).
15. Der SkinEthic™ HCE EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (10) (11) ergeben sich für den SkinEthic™ HCE EIT eine Gesamtgenauigkeit von 84 % (bei 200 Chemikalien), eine Sensitivität von 95 % (bei 97 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 5 % (bei 97 Chemikalien), eine Spezifität von 72 % (bei 103 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 28 % (bei 103 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung.
16. Die mit beiden RhCE-Prüfungen mit Stoffen oder Gemischen ermittelten Falsch-negativ-Raten liegen bei 12 % der Gesamtwahrscheinlichkeit, dass Chemikalien im *In-vivo*-Draize-Augentest bei wiederholten Prüfungen entweder als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder als UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ermittelt werden; dies ist auf die prüfungsimmanente Variabilität der Methode zurückzuführen (24). Die mit beiden RhCE-Prüfmethoden sowohl bei Stoffen als auch bei Gemischen ermittelten Falsch-positiv-Raten sind bei dieser Prüfmethode nicht kritisch, da alle Prüfchemikalien, für die sich eine Gewebeviabilität von kleiner oder gleich den festgelegten Grenzwerten ergibt (Nummer 44), je nach den rechtlichen Anforderungen im Rahmen einer sequenziellen Prüfstrategie nach einem

evidenzbasierten Ansatz weiteren *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. als letzte Möglichkeit Kaninchentests unterzogen werden müssen. Diese Prüfmethoden können für alle Arten von Chemikalien eingesetzt werden, wobei ein Negativergebnis als Indikator dafür akzeptiert werden sollte, dass die betreffenden Chemikalien nicht als augenreizend oder schwer augenschädigend einzustufen sind (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird.

17. Eine Einschränkung besteht bei dieser Prüfmethode darin, dass nicht zwischen Augenreizungen / reversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 2) und schweren Augenschädigungen / irreversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 1) im Sinne des UN GHS und der CLP-Verordnung und nicht zwischen einer augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2A) und einer schwach augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2B) im Sinne des UN GHS unterschieden werden kann (1). Um diese Unterscheidungen vornehmen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit anderen *In-vitro*-Prüfmethoden vorgenommen werden.
18. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was geprüft wird, (2) und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der RhCE-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

19. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf zwei dreidimensionale RhE-Modelle appliziert. Nach der Exposition und der Inkubation im Anschluss an die Behandlung wird die Gewebeviabilität gemessen. Die RhCE-Gewebe werden aus primären humanen epidermalen Keratinozyten oder humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen rekonstruiert, die mehrere Tage bis zur Bildung eines geschichteten Plattenepithels mit ausgeprägter Differenzierung kultiviert wurden, das das menschliche Hornhaut-Epithel widerspiegelt. Das RhCE-Gewebemodell des EpiOcular™ EIT besteht aus mindestens drei lebensfähigen Zellschichten mit nicht verhornter Oberfläche mit hornhautartiger Struktur entsprechend der *In-vivo*-Struktur. Das RhCE-Gewebemodell des SkinEthic™ HCE EIT umfasst mindestens vier lebensfähige Zellschichten mit säulenartigen Basalzellen, Flügelzellen (Übergangszellen) und oberflächlichen Plattenepithelzellen ähnlich dem normalen menschlichen Hornhaut-Epithel (20) (26).
20. Chemisch induzierte Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen, die sich *in vivo* vorwiegend in einer Hornhauttrübung, Iritis, Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußern, sind auf eine Kaskade von Ereignissen zurückzuführen, an deren Beginn das Eindringen der Chemikalien in die Hornhaut und/oder die Bindehaut und die Schädigung von Zellen stehen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen entstehen, darunter eine Lyse der Zellmembran (z. B. durch Tenside oder organische Lösungsmittel), die Koagulation von Makromolekülen (insbesondere Proteinen) (z. B. durch Tenside, organische Lösungsmittel, Laugen und Säuren), die Verseifung von Lipiden (z. B. durch Laugen) und Alkylierungen oder sonstige kovalente Wechselwirkungen mit Makromolekülen (z. B. durch Bleichmittel, Peroxide und Alkylierungsmittel) (15) (27) (28). Allerdings wurde nicht nachgewiesen, dass die Zytotoxizität unabhängig von den der Gewebeschädigung zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen eine wichtige, wenn nicht die primäre, ursächliche Rolle bei der Ermittlung der Gesamtreaktion im Hinblick auf Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen durch eine Chemikalie spielt (29) (30). Das Potenzial einer Chemikalie, eine Augenreizung oder eine schwere Augenschädigung zu verursachen, hängt vom Umfang der Ausgangsverletzung (31) ab, der mit dem Umfang, in dem Zellen absterben, (29) und mit dem Umfang der anschließenden Reaktionen und der endgültigen Ergebnisse (32) korreliert. Leichte Reizungen betreffen daher gewöhnlich nur das oberflächliche Hornhaut-Epithel, geringe und mäßige Reizungen schädigen hauptsächlich das Epithel und das oberflächliche Stroma, und schwere Reizungen führen zu Schädigungen des Epithels, des tiefen Stromas und gelegentlich des Hornhaut-Endothels (30) (33). Die Messung der Viabilität des RhCE-Gewebemodells nach der oberflächlichen Applikation einer Prüfchemikalie zur Ermittlung von Chemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), beruht auf der Annahme, dass alle Chemikalien, die Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen verursachen, im Hornhaut-Epithel und/oder in der Bindehaut eine zytotoxische Wirkung induzieren.

(2) Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung der OECD überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie“ zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten OCED-Prüfrichtlinien einheitlicher verwendet werden solle.

21. Die Viabilität des RhCE-Gewebes wird gewöhnlich anhand der durch die lebensfähigen Zellen des Gewebes bewirkten Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen MTT-Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (16). Chemikalien, bei denen eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Kategorie Keine Einstufung), sind die Chemikalien, bei denen die Viabilität des Gewebes eine festgelegte Grenze nicht unterschreitet (d. h. Gewebeviabilität > 60 % beim EpiOcular™ EIT und beim SkinEthic™ HCE EITL⁽³⁾ und > 50 % beim SkinEthic™ HCE EITS⁽⁴⁾) (Nummer 44).

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

22. Vor der routinemäßigen Durchführung von RhCE-Prüfungen für rechtliche Zwecke sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der 15 in Tabelle 1 genannten Chemikalien nachweisen. Diese Chemikalien wurden unter den in den Validierungsstudien der VRM verwendeten Chemikalien ausgewählt (8) (10) (11). Die Auswahl beinhaltet nach Möglichkeit Chemikalien, die (i) verschiedene Aggregatzustände abdecken, (ii) das gesamte Spektrum an *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen nach hochwertigen Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugen-Referenztests (PM B.5) (2) (14) sowie nach dem UN GHS (d. h. Kategorien 1, 2A, 2B und Keine Einstufung) (1) und nach der CLP-Verordnung (d. h. Kategorien 1 oder 2 bzw. Keine Einstufung) abdecken, (iii) die verschiedenen *In-vivo*-Einstufungsparameter abdecken (24) (25), (iv) repräsentativ für die in der Validierungsstudie verwendeten Chemikalienklassen sind (8) (10) (11), (v) organische Funktionsgruppen gut und umfassend repräsentieren (8) (10) (11), (vi) gut definierte chemische Strukturen aufweisen (8) (10) (11), (vii) farblich und/oder direkte MTT-Reduktionsmittel sind, (viii) bei der Validierung zu reproduzierbaren Ergebnissen geführt haben, (ix) mit RhCE-Prüfmethoden in den jeweiligen Validierungsstudien korrekt vorhergesagt wurden, (x) das gesamte Spektrum an *In-vitro*-Reaktionen abdecken, das mit hochwertigen RhCE-Prüfmethoden ermittelt wurde (Viabilität 0-100 %), (xi) im Handel erhältlich sind und (xii) nicht mit untragbar hohen Beschaffungs- und/oder Entsorgungskosten verbunden sind. Wenn eine genannte Chemikalie nicht erhältlich ist oder aus sonstigen berechtigten Gründen nicht verwendet werden kann, kann eine andere Chemikalie eingesetzt werden, die die oben beschriebenen Anforderungen erfüllt (z. B. eine bei der Validierung der VRM verwendete Chemikalie). Solche Abweichungen sollten nur in gerechtfertigten Fällen vorkommen.

Tabelle 1

Liste der Leistungschemikalien

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ⁽¹⁾	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ⁽²⁾	Viabilität VRM 2 (%) ⁽³⁾	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbintertf.
<i>In-vivo</i>-Kategorie 1⁽⁴⁾								
Methylmercaptoacetat (Methylthioglykolat)	2365-48-2	Carbonsäureester, Thioalkohol	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Keine Vorhersage möglich	J (stark)	N
Hydroxyethylacrylat	818-61-1	Acrylat, Alkohol	L	7,5 ± 4,7 ⁽⁵⁾	1,6 ± 1,0	Keine Vorhersage möglich	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Alkohol	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxocarbonsäure	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
<i>In-vivo</i>-Kategorie 2A⁽⁴⁾								
2,4,11,13-Tetraazatetradecan-diiimidamid, N,N"-Bis(4-Chlorphenyl)-3,12-diiminodi-D-gluconat (20 %, wässrig) ⁽⁶⁾	18472-51-0	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Dihydroxyl-Gruppe, Guanidin	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Keine Vorhersage möglich	N	J (schwach)

⁽³⁾ EITL: SkinEthic™ HCE EIT bei Flüssigkeiten.

⁽⁴⁾ EITS: SkinEthic™ HCE EIT bei Feststoffen.

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ⁽¹⁾	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ⁽²⁾	Viabilität VRM 2 (%) ⁽³⁾	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterrf.
Natriumbenzoat	532-32-1	Aryl, Carboxylsäure	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N

In-vivo-Kategorie 2B ⁽⁴⁾

Diethyltoluamid	134-62-3	Benzamid	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Keine Vorhersage möglich	N	N
2,2-Dimethyl-3-methylenbicyclo[2.2.1]-heptan;	79-92-5	Alkan, verzweigt mit tertiärem Kohlenstoff; Alken; Bicycloheptan; Kohlenstoffzyklen mit Brückenbindung; Cycloalkan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Keine Vorhersage möglich	N	N

In Vivo Keine Einstufung ⁽⁴⁾

1-Ethyl-3-methylimidazoliummethylsulfat	342573-75-5	Alkoxy, Ammoniumsalz, Aryl; Imidazol, Sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Keine Einst.	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy, Ether	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Keine Einst.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxy, Benzodioxol, Benzyl, Ether	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Keine Einst.	N	N
Polyethylenglycol (PEG-40) hydriertes Rizinusöl	61788-85-0	Acylal, Alkohol, Allyl, Ether	Viskose Flüssigkeit	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Keine Einst.	N	N
1-(4-Chlorphenyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-harnstoff	101-20-2	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Harnstoffderivate	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Keine Einst.	N	N
2,2'-Methylen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)	103597-45-1	Alkan verzweigt mit quartärem Kohlenstoff, kondensierte carbocyclische aromatische Verbindungen, kondensierte gesättigte Heterocyclen, Vorläuferchemikalien quinoide Verbindungen, tert-Butyl	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Keine Einst.	N	N

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ⁽¹⁾	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ⁽²⁾	Viabilität VRM 2 (%) ⁽³⁾	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
Kaliumtetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganische Salze	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Keine Einst.	N	N

Abkürzungen:

CASRN = Registernummern des Chemical Abstracts Service.; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (1); VRM 1 = validierte Referenzmethode, EpiOcular™ EIT; VRM 2 = validierte Referenzmethode, SkinEthic™ HCE EIT; Farbinterf. = Farbinterferenz mit der Standardabsorption (optische Dichte (OD)) Messung von MTT-Formazan.

⁽¹⁾ Organische Funktionsgruppe, zugewiesen aufgrund einer Nested Analysis der OECD Toolbox 3.1 (8).

⁽²⁾ Nach den Ergebnissen eines EpiOcular™ EIT in der EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

⁽³⁾ Nach den Ergebnissen des SkinEthic™ HCE EIT in der Validierungsstudie (10) (11).

⁽⁴⁾ Nach den Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5/OECD TG 405) (2) (14) unter Berücksichtigung des UN GHS.

⁽⁵⁾ Nach den Ergebnissen der Studie des CEFIC Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4E).

⁽⁶⁾ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Das eine Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wies (an Tag 7) einen Hornhauttrübungswert von 1 auf, der an Tag 9 ganz zurückgegangen war.

PRÜFVERFAHREN

23. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollten die Benutzer die vom Hersteller des RhCE-Gewebemodells spezifizierten Barriereigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen (Nummern 25, 27 und 30). Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Prüfung erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit festgestellt und nachgewiesen wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig durchgeführten Prüfungen, die Barriereigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.
24. Gegenwärtig entsprechen der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT als wissenschaftlich fundierte Prüfungen dieser Prüfmethode (9) (12) (13); diese Prüfungen werden auch als validierte Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) bezeichnet. Für die RhCE-Prüfmethoden liegen Standardarbeitsanweisungen vor, die bei der Umsetzung und Verwendung dieser Prüfmethode im Labor angewendet werden sollten (34) (35). In den folgenden Abschnitten sowie in Anlage 2 werden die wesentlichen Elemente und Verfahren der RhCE-Prüfungen beschrieben.

ELEMENTE DER RHCE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

25. Zur Rekonstruktion des aus progressiv geschichteten, aber nicht verhornten Zellen bestehenden dreidimensionalen hornhautartigen Epithelgewebes sind die betreffenden menschlichen Zellen zu verwenden. Das RhCE-Gewebemodell wird in Einsätzen mit einer porösen synthetischen Membran konstruiert, durch die Nährstoffe in die Zellen gelangen können. Das rekonstruierte hornhautartige Epithel sollte mehrere Schichten lebensfähiger nicht verhornter Epithelzellen enthalten. Beim RhCE-Gewebemodell sollte die Epitheloberfläche unmittelbar mit der Luft in Berührung kommen, damit eine oberflächliche Exposition gegenüber den Prüfchemikalien ähnlich wie *in vivo* beim natürlichen Hornhaut-Epithel erfolgen kann. Das RhCE-Gewebemodell sollte eine funktionsfähige Barriere bilden, die so robust ist, dass sie eine rasche Durchdringung zytotoxischer Referenzstoffe (z. B. Triton X-100 oder Natriumdodecylsulfat (SDS)) verhindert. Die Barrierefunktion sollte nachgewiesen werden. Zur Beurteilung der Barrierewirkung kann entweder die Expositionszeit, bei der nach Applikation eines Referenzstoffs in einer bestimmten festgelegten Konzentration (z. B. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100) die Viabilität eines Gewebes um 50 % reduziert wird (ET₅₀), oder die Konzentration bestimmt werden, bei der ein Referenzstoff nach einer bestimmten Expositionszeit (z. B. nach 30-minütiger Behandlung mit 50 µl SDS) die Viabilität der Gewebe um 50 % reduziert (IC₅₀) (Nummer 30). Die Rückhalteigenschaften des RhCE-Gewebemodells müssen ausschließen, dass die Prüfchemikalie rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hornhautexposition beeinträchtigt. Die zur Herstellung des RhCE-Gewebemodells verwendeten menschlichen Zellen müssen frei von Verunreinigungen durch Bakterien, Viren, Mycoplasma und Pilze sein. Der Hersteller prüft die Sterilität des Gewebemodells und stellt sicher, dass das Modell nicht durch Pilze oder Bakterien verunreinigt ist.

Funktionale Bedingungen*Viabilität*

26. Die Größenordnung der Viabilität der Gewebe wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (16). Die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells reduzieren den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrierfahren (OD = optische Dichte) (36) quantifiziert werden. Die optische Dichte (OD) des reinen Extraktionslösungsmittels sollte ausreichend gering sein, d. h. OD < 0,1. Das RhCE-Gewebemodell sollte sicherstellen, dass

jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Die Akzeptanzspannen der OD-Werte der Negativkontrolle für die VRM sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle angenommen werden. Im Prüfbericht sollte dokumentiert werden, dass die mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe über den gesamten Expositionszeitraum stabil bleiben (bzw. dass eine vergleichbare Gewebeviabilität gemessen wird). Entsprechend verfährt der Hersteller des Gewebes im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe der Gewebecharge. Dabei können allerdings andere als die in Tabelle 2 genannten Akzeptanzkriterien maßgeblich sein. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle (unter den Bedingungen bei der Qualitätskontrolle der Prüfmethode) festlegen.

Tabelle 2

Akzeptanzspannen für OD-Werte der Negativkontrolle zur Kontrolle der Chargenqualität (für die Anwender der Prüfung)

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	> 0,8 ⁽¹⁾	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	> 1,0	≤ 2,5

(¹) Diese Akzeptanzgrenze trägt der Möglichkeit längerer Versand- oder Lagerzeiten (z. B. > 4 Tage) Rechnung, die nachweislich keine Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode haben (37).

Barrierefunktion

27. Das RhCE-Gewebemodell sollte so dick und robust sein, dass es ein rasches Eindringen der zytotoxischen Referenzstoffe verhindert; als Maßstab sind die Werte z. B. für ET₅₀ (Triton X-100) oder IC₅₀ (SDS) (Tabelle 3) anzunehmen. Die Barrierefunktion der einzelnen Chargen des verwendeten RhCE-Gewebemodells sollte nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells nachgewiesen werden (Nummer 30).

Morphologie

28. Anhand einer histologischen Untersuchung des RhCE-Gewebemodells sollte die Ähnlichkeit des Epithelgewebes mit der menschlichen Hornhaut (bei mindestens 3 Schichten lebensfähiger Epithelzellen und nicht verhornter Oberfläche) nachgewiesen werden. Für die VRM hat der Entwickler/Hersteller eine geeignete Morphologie nachgewiesen. Daher brauchen die Anwender der Prüfmethode diesen Nachweis nicht für jede einzelne verwendete Gewebecharge neu zu führen.

Reproduzierbarkeit

29. Die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

30. Das RhCE-Gewebemodell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der Viabilität (Nummer 26) und der Barrierefunktion (Nummer 27) die wichtigsten sind. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells legt eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die Barrierefunktionen anhand der Werte für ET₅₀ oder IC₅₀ (Nummern 25 und 26) fest. Die vom Entwickler/Hersteller der RhCE-Gewebemodelle bei der Qualitätskontrolle für die Freigabe einer Charge angenommenen (und für die VRM verwendeten) Akzeptanzspannen für ET₅₀ und IC₅₀ sind Tabelle 3 zu entnehmen. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells stellt den Anwendern der Prüfmethode Daten zur Verfügung, die die Erfüllung sämtlicher Freigabekriterien belegen, damit die Anwender die betreffenden Informationen im Prüfbericht berücksichtigen können. Für die zuverlässige Vorhersage, dass Chemikalien eine Einstufung und Kennzeichnung im Hinblick auf eine augenreizende oder schwer augenschädigende Wirkung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erfordern, können ausschließlich Ergebnisse akzeptiert werden, die mit Geweben ermittelt wurden, die diese Freigabekriterien vollständig erfüllen.

Tabelle 3

Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (30-minütige Behandlung mit 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Applikation der Prüfchemikalie und der Kontrollstoffe

31. Für jede Prüfchemikalie und für jeden Prüfstoff sollten bei jedem Prüflauf mindestens zwei Gewebereplikate verwendet werden. Zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle werden verwendet (jeweils eines für flüssige und eines für feste Prüfchemikalien) (34) (35). Bei beiden Methoden und Protokollen ist die Oberfläche des Gewebemodells vor der Applikation von Prüfchemikalien mit calcium- und magnesiumfreiem Dulbecco-Phosphatpuffer (Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS) zu befeuchten, um eine Feuchtigkeit ähnlich wie am menschlichen Auge herzustellen. Die Behandlung der Gewebe beginnt mit der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien und den Kontrollstoffen. Nach den beiden Behandlungsprotokollen der beiden VRM sind die Prüfchemikalien und Kontrollstoffe so ausreichend aufzutragen, dass die gesamte Epitheloberfläche gleichmäßig bedeckt, eine unklare Dosierung jedoch vermieden wird (Nummern 32 und 33) (Anlage 2).
32. Prüfchemikalien, die bei höchstens 37 °C pipettiert werden können (erforderlichenfalls mit einer Direktverdränger-Pipette), werden in den VRM als Flüssigkeiten behandelt; ansonsten sind die Prüfchemikalien als Feststoffe zu betrachten (Nummer 33). Bei den VRM wird die flüssige Prüfchemikalie gleichmäßig auf die Gewebeoberfläche aufgetragen (mindestens 60 µl/cm²) (siehe Anlage 2, (33) (34)). Kapillareffekte (Wirkungen der Oberflächenspannung), die aufgrund der geringen Volumina der in den Einsatz (auf die Gewebeoberfläche) aufgetragenen Chemikalien auftreten könnten, sollten möglichst vermieden werden, um eine korrekte Dosierung bei der Behandlung des Gewebes sicherzustellen. Mit flüssigen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden 30 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Am Ende des Expositionszeitraums werden die flüssige Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen Zeitraum in ein frisches Medium, um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nur bei VRM 1 werden die Zellen nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung in einem frischen Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).
33. Prüfchemikalien, die bei Temperaturen bis zu 37 °C nicht pipettiert werden können, werden in den VRM als Feststoffe behandelt. Die Prüfchemikalie sollte in ausreichender Menge aufgetragen werden, um die gesamte Oberfläche des Gewebes zu bedecken (d. h. mindestens 60 mg/cm² (Anlage 2)). Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. Mit festen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden über einen festgelegten Zeitraum (je nach VRM) bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Am Ende des Expositionszeitraums werden die feste Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen, Zeitraum in ein frisches Medium, um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung werden die Zellen in frischem Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).

34. Bei jedem Prüflauf sind gleichzeitige Negativ- und Positivkontrollen zu berücksichtigen, um nachzuweisen, dass die Werte für die Viabilität (mit der Negativkontrolle ermittelt) und die Sensitivität (mit der Positivkontrolle ermittelt) der Gewebe innerhalb der anhand historischer Daten festgelegten Akzeptanzspannen liegen. Die gleichzeitige Negativkontrolle dient auch als Referenzwert (Gewebeviabilität 100 %) zur Berechnung der relativen Viabilität der mit der Prüfchemikalie behandelten Gewebe (% Viabilität_{Prüfung}). Der für die VRM empfohlene Positivkontrollstoff ist reines Methylacetat (CAS-Nr. 79-20-9, im Handel erhältlich beispielsweise von Sigma-Aldrich, Bestellnr. 45997, flüssig). Als Negativkontrollstoffe für VRM 1 und VRM 2 werden ultrareines H₂O bzw. Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS empfohlen. Diese Kontrollstoffe wurden in den Studien zur Validierung der VRM verwendet und für diese Kontrollstoffe liegen die umfangreichsten historischen Daten vor. Die Verwendung geeigneter alternativer Positiv- oder Negativkontrollstoffe sollte wissenschaftlich begründet und angemessen gerechtfertigt sein. Negativ- und Positivkontrollen sollten mit denselben Protokollen wie die im jeweiligen Prüflauf (d. h. für Flüssigkeiten und/oder Feststoffe) verwendeten Prüfchemikalien geprüft werden. Vor der Durchführung der MTT-Prüfung (Nummer 35) ist hinsichtlich der Exposition und ggf. der Immersion nach der Behandlung das Protokoll so einzuhalten, wie für die gleichzeitig durchgeführten Kontrollen bei flüssigen Prüfchemikalien (Nummer 32) bzw. bei festen Prüfchemikalien (Nummer 33) beschrieben (34) (35). Eine einzelne Gruppe von Negativ- und Positivkontrollen ist für alle in einem Prüflauf berücksichtigten Prüfchemikalien jeweils eines Aggregatzustands (flüssig oder fest) ausreichend.

Messungen der Gewebeviabilität

35. Die MTT-Prüfung ist eine standardisierte quantitative Methode (16), die zur Messung der Gewebeviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die MTT-Prüfung wird unmittelbar im Anschluss an die Inkubation nach der Behandlung durchgeführt. Bei den VRM wird die Probe des RhCE-Gewebemodells 180 ± 15 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen in 0,3 ml MTT-Lösung (1 mg/ml) gegeben. Der Vitalfarbstoff MTT wird durch die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag reduziert. Der blaue MTT-Formazan-Niederschlag wird dann mit einer geeigneten Menge Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert (34) (35). Mit flüssigen Prüfchemikalien geprüfte Gewebe sind sowohl oben als auch unten aus dem Gewebe zu extrahieren. Mit festen Prüfchemikalien und mit gefärbten Flüssigkeiten geprüfte Gewebe dagegen sind ausschließlich aus dem unteren Bereich zu extrahieren (um die Gefahr einer Verunreinigung der Isopropanol-Extraktionslösung durch möglicherweise im Gewebe verbliebene Prüfchemikalien zu minimieren). Bei Geweben, die mit flüssigen Prüfchemikalien geprüft wurden, die nicht ohne Weiteres auswaschbar sind, muss die Extraktion unter Umständen ebenfalls ausschließlich aus dem unteren Bereich des Gewebes erfolgen. Die gleichzeitig geprüften Negativ- und Positivkontrollstoffe sind wie die geprüfte Chemikalie zu behandeln. Das extrahierte MTT-Formazan kann entweder durch eine Standardabsorptions-(OD-)Messung bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrierfahren gemessen werden (Nummer 42) (11) (36).
36. Die optischen Eigenschaften der Prüfchemikalie bzw. ihre chemische Wirkung auf das MTT können die MTT-Formazan-Messung beeinträchtigen und dazu führen, dass die Gewebeviabilität falsch eingeschätzt wird. Prüfchemikalien können die MTT-Formazan-Messung durch direkte Reduzierung des MTT zu blauem MTT-Formazan und/oder durch Farbbinterferenzen stören, wenn die Prüfchemikalie an sich oder infolge von Behandlungsverfahren in demselben OD-Bereich wie das MTT-Formazan (570 nm) absorbiert. Vor der eigentlichen Prüfung sind Vorprüfungen durchzuführen, um direkt wirkende potenzielle MTT-Reduziermittel und/oder Chemikalien zu ermitteln, die Farbbinterferenzen verursachen können. Außerdem sollten weitere Kontrollen verwendet werden, um potenzielle Interferenzen aufgrund dieser Prüfchemikalien erkennen und korrigieren zu können (Nummern 37-41). Dies ist besonders dann wichtig, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht vollständig aus dem RhCE-Gewebemodell ausgewaschen wurde oder das hornhautartige Epithel durchdringt und daher bei Durchführung der MTT-Prüfung auch in den RhCE-Gewebemodellen enthalten ist. Bei Prüfchemikalien, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Bereich wie MTT-Formazan absorbieren und wegen übermäßiger Interferenzen (d. h. einer Absorption bei 570 ± 30 nm) nicht mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung bei MTT-Formazan im Einklang stehen, kann eine MTT-Formazan-Messung mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrierfahren vorgenommen werden (Nummern 41 und 42) (11) (36). Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise zur Erkennung und Korrektur einer direkten MTT-Reduktion sowie von Interferenzen durch Färbemittel ist den Standardarbeitsanweisungen für die VRM zu entnehmen (34) (35). Die Flussdiagramme in den Anhängen III und IV veranschaulichen die Vorgehensweise zur Erkennung und Behandlung von direkt wirkenden MTT-Reduktionsmitteln und von Farbbinterferenzen verursachenden Chemikalien für die VRM 1 und 2.

37. Um potenzielle Interferenzen durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Spektrum wie MTT-Formazan absorbieren, und um entscheiden zu können, ob weitere Kontrollen erforderlich sind, wird die Prüfchemikalie zu Wasser und/oder Isopropanol hinzugegeben und über einen angemessenen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Wenn die Prüfchemikalie bei VRM 1 in Wasser und/oder Isopropanol ausreichend Licht im Bereich von 570 ± 20 nm absorbiert (siehe Anlage 3), oder wenn bei VRM 2 eine farbige Lösung entsteht, wenn die Prüfchemikalie mit Wasser gemischt wird (siehe Anlage 4), ist anzunehmen, dass die Prüfchemikalie bei der Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan Interferenzen verursacht; in diesem Fall sind weitere Farbkontrollen oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorzunehmen. Die betreffenden Kontrollen werden dann nicht benötigt (Nummern 41 und 42 sowie Anhänge III und IV) (34) (35). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jede interferierende Prüfchemikalie auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate aufgetragen; diese Replikate werden dem vollständigen Prüfverfahren unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um in lebendem Gewebe eine nicht spezifische Farbe (NSC_{lebend}) zu erzeugen (34) (35). Die NSC_{lebend}-Kontrolle muss gleichzeitig mit der Untersuchung des Prüffarbstoffs durchgeführt werden, und bei mehreren Prüfungen ist wegen der inhärenten biologischen Variabilität lebender Gewebe für jede durchgeführte Prüfung (bei jedem Prüflauf) eine unabhängige NSC_{lebend}-Kontrolle zu prüfen. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist (% NSC_{lebend}), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSC_{lebend}].
38. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestellter MTT-Lösung hinzugegeben werden. Eine geeignete Menge einer Prüfchemikalie wird zu einer MTT-Lösung hinzugegeben und etwa 3 Stunden unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie (bzw. die Suspension bei nicht lösliche Prüfchemikalien) blau/violett färbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung der nicht lebensfähigen RhCE-Gewebemodelle vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlicher Weise wie lebensfähige Gewebe absorbieren und binden. Bei der VRM 1 werden Gewebe abgetötet, indem sie einer niedrigen Temperatur ausgesetzt werden („durch Gefrieren abgetötet“). Bei der VRM 2 werden Gewebe abgetötet, indem sie über einen längeren Zeitraum (z. B. mindestens 24 ± 1 Std.) in Wasser inkubiert und anschließend bei einer niedrigen Temperatur aufbewahrt werden („in Wasser abgetötet“). Jede MTT reduzierende Prüfchemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem gesamten Prüfverfahren unterzogen werden, um eine nicht spezifische MTT-Reduktionskontrolle (NSMTT-Reduktion) herzustellen (34) (35). Pro Prüfchemikalie ist unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe eine einzelne NSMTT-Kontrolle ausreichend. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% NSMTT), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSMTT], berechnet.
39. Bei Prüfchemikalien, die sowohl Farbinterferenzen (Nummer 37) als auch eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 38) verursachen, wird für die Standardabsorptions-(OD-)Messung außer der NSMTT-Kontrolle und der NSC_{lebend}-Kontrolle (siehe vorstehende Abschnitte) eine dritte Gruppe von Kontrollen benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Licht im Bereich von 570 ± 30 nm (z. B. blau, violett oder schwarz) absorbieren, weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 38). In diesen Fällen sind zusammen mit den NSC_{lebend}-Kontrollen regelmäßig NSMTT-Kontrollen zu verwenden. Prüfchemikalien, bei denen sowohl NSMTT-Kontrollen als auch NSC_{lebend}-Kontrollen untersucht wurden, können von lebenden und von abgetöteten Geweben absorbiert und gebunden werden. Daher kann in diesen Fällen bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie an

abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits eine Korrektur der Farbbinterferenz aufgrund der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie durch lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben (NSC_{abgetötet}) untersucht werden (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige NSC_{abgetötet}-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie mit derselben Gewebecharge untersucht werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (% Viabilität_{Prüfung}) abzüglich % NSMTT und abzüglich % NSC_{lebend} zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% NSC_{abgetötet}), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% Viabilität_{Prüfung}] - [% NSMTT] - [% NSC_{lebend}] + [% NSC_{abgetötet}], ermittelt.

40. Wichtig ist, dass eine nicht spezifische MTT-Reduktion und nicht spezifische Farbbinterferenzen die optische Dichte (bei Standard-Absorptionsmessungen) und die Peak-Flächen für MTT-Formazan (bei HPLC/UPLC-Spektrophotometriemessungen) der Gewebeextrakte über die Linearitätsspanne des Spektrophotometers hinaus verstärken bzw. vergrößern können. Daher muss jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne der OD/Peak-Fläche seines Spektrophotometers mit im Handel (z. B. bei Sigma-Aldrich (Bestellnr. M2003) erhältlichem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln.
41. Die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer ist zur Beurteilung von Prüfchemikalien geeignet, die als direkte MTT-Reduktionsmittel wirken bzw. Farbbinterferenzen verursachen, sofern die bei der MTT-Formazan-Messung beobachtete Interferenz nicht zu stark ausgeprägt ist (d. h. wenn die OD-Werte der Gewebeextrakte mit der Prüfchemikalie ohne Korrektur für eine direkte MTT-Reduktion und/oder Farbbinterferenzen innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen). Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit % NSMTT und/oder % NSC_{lebend} ≥ 60 % (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. 50 % (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten, da dies die festgelegten und in den VRM verwendeten Schwellenwerte sind, nach denen darüber entschieden wird, ob bei Chemikalien eine Einstufung erforderlich ist (Nummer 44). Die Standardabsorption (OD) kann bei übermäßiger Interferenz mit der MTT-Formazan-Messung (d. h. wenn die Interferenz dazu führt, dass nicht korrigierte OD-Werte der Prüfgewebeextrakte außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen) jedoch nicht gemessen werden. Prüffarbstoffe, die sich bei Kontakt mit Wasser oder Isopropanol färben und die Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan übermäßig beeinträchtigen, können durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (siehe Anhänge III und IV). Eine Messung durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie ist deshalb möglich, weil bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden kann (36). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder NSC_{abgetötet}-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. Allerdings sollten NSMTT-Kontrollen verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert (Verfahren wie in Nummer 38 beschrieben). NSMTT-Kontrollen sollten jedoch auch bei Prüfchemikalien mit Färbungen (an sich oder in Wasser auftretend) verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 38). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität wie folgt berechnet: % Viabilität_{Prüfung} abzüglich % NSMTT, wie in Nummer 38 im letzten Satz beschrieben. Und schließlich ist festzustellen, dass direkte MTT-Reduktionsmittel sowie auch Farbbinterferenzen verursachende direkte MTT-Reduktionsmittel, die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu OD-Werten oder (bei der Untersuchung der Gewebeextrakte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peak-Flächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbbinterferenzen kommen kann, mit Prüfmethode unter Verwendung von RhCE nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

42. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (11) (36). Aufgrund der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme können nicht für alle Systeme exakt identische Bedingungen festgelegt werden. Daher sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (36) (38). Diese Schlüsselparameter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 5 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 5 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

43. Bei allen Prüfläufen mit RhCE-Gewebechargen, die die Anforderungen der Qualitätskontrolle erfüllen, (Nummer 30) müssen alle mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe OD-Werte aufweisen, die der Qualität der Gewebe nach der Lieferung sowie nach Durchführung aller Schritte und aller im Protokoll vorgesehenen Prozesse entsprechen und nicht außerhalb der in Tabelle 2 genannten historisch ermittelten Grenzen liegen (Nummer 26). Die mittlere Gewebeviabilität von mit dem Positivkontrollstoff (d. h. mit Methylacetat) behandelten Geweben muss bei Anwendung der Protokolle für Flüssigkeiten oder für Feststoffe $< 50\%$ der Negativkontrolle bei der VRM 1 und $\leq 30\%$ (beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. $\leq 20\%$ (beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle bei der VRM 2 sein und damit belegen, dass die Gewebe unter den Bedingungen der Prüfmethode auf eine reizende Prüfchemikalie reagieren können (34) (35). Die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei Prüfchemikalien und Kontrollstoffen muss innerhalb der akzeptierten Grenzen liegen (d. h. die Viabilität von zwei Gewebereplikaten muss unter 20% liegen, bzw. bei drei Gewebereplikaten darf die Standardabweichung (SD) höchstens 18% betragen). Wenn die Negativ- oder die Positivkontrolle bei einem Prüflauf Werte außerhalb der akzeptierten Spannen ergibt, ist der Prüflauf als nicht geeignet zu betrachten und sollte wiederholt werden. Liegt die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei einer Prüfchemikalie außerhalb der akzeptierten Spanne, ist die Prüfung als nicht geeignet zu betrachten und die Prüfchemikalie erneut zu prüfen.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

44. Die OD-Werte/Peak-Flächen der Replikatgewebe-Extrakte für die einzelnen Prüfchemikalien werden zur Berechnung der mittleren Gewebeviabilität in Prozent (Mittelwert der Gewebereplikate) bezogen auf die mit 100% angesetzte Negativkontrolle verwendet. Der prozentuale Grenzwert der Gewebeviabilität bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) nicht erforderlich ist, sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Ergebnisse sind wie folgt zu bewerten:

- Bei einer Prüfchemikalie sind eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich (Keine Einstufung), wenn die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition den in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent überschreitet ($>$). In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethoden nicht erforderlich.
- Ist die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition kleiner oder gleich (\leq) dem in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent, kann keine Vorhersage getroffen werden. In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethoden vorzunehmen, weil bei den Prüfmethoden unter Verwendung von RhCE ein bestimmter Anteil falsch positiver Ergebnisse ermittelt wird (Nummern 14 und 15) und nicht zwischen den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 und 2 unterschieden werden kann (Nummer 17).

Tabelle 4

Vorhersagemodelle nach dem UN-GHS und der CLP-Verordnung

VRM	Keine Einstufung	Keine Vorhersage möglich
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (beide Protokolle)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Flüssigkeiten)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Feststoffe)	Mittlere Gewebeviabilität > 50 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 50 %

45. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist eine einzige, Prüfung mit mindestens zwei Geweben ausreichend. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Gewebeviabilität von $60 \pm 5\%$ (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. $50 \pm 5\%$ (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe), sollte eine zweite bzw. bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfungen eine dritte Prüfung in Betracht gezogen werden.
46. Wenn angemessen und begründet, können bei bestimmten Arten von Gemischen für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung vorgenommen wurde, und für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung nicht erforderlich ist, unterschiedliche prozentuale Grenzwerte für die Gewebeviabilität angenommen werden, um die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode für die betreffende Art von Gemischen insgesamt zu erhöhen (Nummer 14). Referenzchemikalien können die Beurteilung des augenreizenden bzw. schwer augenschädigenden Potenzials unbekannter Prüfchemikalien oder Produktklassen und die Bewertung des relativen augentoxischen Potenzials einer klassifizierten Chemikalie innerhalb einer bestimmten Spanne positiver Reaktionen erleichtern.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

47. Die Daten einzelner Replikatgewebe eines Prüflaufs (z. B. OD-Werte/MTT-Formazan-Peak-Flächen und berechnete prozentuale Daten der Gewebeviabilität für die Prüfchemikalie und für Kontrollen sowie die endgültige Vorhersage mit der RhCE-Prüfmethode) sind für jede Prüfchemikalie (ggf. einschließlich der Daten von Wiederholungsprüfungen) tabellarisch darzustellen. Außerdem sind für jede einzelne Prüfchemikalie und für alle Kontrollen die mittlere prozentuale Gewebeviabilität und der Unterschied der Viabilität zwischen zwei Gewebereplikaten (bei $n = 2$ Replikatgewebe) bzw. die Standardabweichung (SD) (bei $n \geq 3$ Replikatgeweben) anzugeben. Wenn bei einer Prüfchemikalie bei der Messung von MTT-Formazan anhand der direkten MTT-Reduktion eine Interferenz festgestellt wird und/oder eine farbliche Interferenz auftritt, ist dies für jede einzelne geprüfte Chemikalie anzugeben.

Prüfbericht

48. Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

Prüfstoff

Einkomponentiger Stoff:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische:

- Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;
- Aggregatzustand sowie weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Positiv- und Negativkontrollstoffe

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Prüfung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Begründung für die Verwendung einer anderen Negativkontrolle als ultrareines H₂O oder Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS;
- ggf. Begründung der Verwendung einer anderen Positivkontrolle als reines Methylacetat;
- Verweis auf historische Ergebnisse von Positiv- und Negativkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Prüfdurchlauf dokumentieren.

Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters.
- RhCE-Gewebemodell und verwendetes Protokoll (ggf. mit Begründung für die getroffene Auswahl)

Bedingungen der Prüfmethode

- Verwendetes RhCE-Gewebemodell einschließlich Chargennummer;
- Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts (z. B. eines Spektrophotometers);
- Beschreibung der verwendeten Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;
- Beschreibung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant);
- umfassende Begleitdokumentation für das betreffende RhCE-Gewebemodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Elemente und Angaben beinhalten:
 - i) Qualitätskontrolle der Viabilität (Hersteller)
 - ii) Viabilität unter den Bedingungen der Prüfmethode (Anwender);
 - iii) Qualitätskontrolle der Barrierefunktion;
 - iv) ggf. Morphologie;
 - v) Reproduzierbarkeit und Vorhersagefähigkeit;
 - vi) ggf. sonstige Qualitätskontrollen des RhCE-Gewebemodells;
- Verweis auf historische Daten zum RhCE-Gewebemodell. Unter anderem sollte die Akzeptierbarkeit der QK-Daten auf der Grundlage historischer Chargendaten spezifiziert werden;
- Erklärung, dass die Prüfeinrichtung ihre Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Untersuchung der Leistungskemikalien nachgewiesen hat.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen

- Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;
- akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Prüfverfahren

- Einzelheiten der angewandten Methode;
- Dosierungen der verwendeten Prüfchemikalien und Kontrollstoffe;
- Expositionszeitraum und -temperatur, Dauer der Immersion nach der Exposition und Inkubationszeit nach der Exposition (wenn relevant);
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;

- Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);
- Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und $NSC_{\text{abgetötet}}$, wenn relevant) verwendeten Gewebereplikate.

Ergebnisse

- Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollstoffe für die einzelnen Prüfläufe (ggf. einschließlich Wiederholungsprüfungen) und Replikatmessungen einschließlich der OD-Werte bzw. der MTT-Formazan-Peak-Flächen, der prozentualen Gewebeviabilität, der mittleren prozentualen Gewebeviabilität, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung und der endgültigen Vorhersagen;
- gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD-Werten oder MTT-Formazan-Peak-Flächen, % NSMTT, % NSC_{lebend} , % $NSC_{\text{abgetötet}}$, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung, der endgültigen korrekten prozentualen Gewebeviabilität und der endgültigen Vorhersagen;
- mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollstoffen ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;
- Beschreibung weiterer festgestellter Wirkungen (z. B. Verfärbung der Gewebe durch Prüffarbstoffe).

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (1) UN (2015). GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen, ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Auflage, New York und Genf: Vereinte Nationen. Abrufbar unter:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (3) Kapitel B.47 dieses Anhangs, Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (4) Kapitel B.48 dieses Anhangs, Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung erfordern.
- (5) Kapitel B.61 dieses Anhangs Fluorescein-Leckage-Prüfmethode zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung
- (6) Kapitel B.68 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfmethode mit Kurzzeitexposition zur Ermittlung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (7) Freeman, S.J., Alépée, N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2 010,261-266.

- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM – Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Abrufbar unter:<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03, 17. November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Abrufbar unter:<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.
- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02, 24. Juni 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Abrufbar unter:<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuskript in Vorbereitung).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbcker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Hrsg.), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, S. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.
- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli, F.N., und Maibach, H.I. (Hrsg.), 4. Auflage, S. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D. (Ed.), 7. Auflage, S. 665–697. Withby, O.N., Kanada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Toxicol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610–2 625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (5. März 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter:[<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20. Juli 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter:<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Abrufbar unter:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2“.

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung und Kennzeichnung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterscheiden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dev: Abweichung

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

EIT: Eye Irritation Test (Prüfung auf Augenreizung).

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier bzw. der Umwelt gewährleistet (18).

ET₅₀: Expositionszeit, die erforderlich ist, um die Gewebeviabilität bei Anwendung einer Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren.

EURL ECVAM: Referenzlabor der Europäischen Union für alternative Methoden zu Tierversuchen.

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Prüfchemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller Positivstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Negativstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller Negativstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Positivstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (18).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe der Strategie übergegangen wird. Wenn das Gefahrenpotenzial/die gefahrenrelevante Wirksamkeit einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich (18).

Gewebeviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellenpopulation (bei einem rekonstruierten Gewebe die Fähigkeit, den Vitalfarbstoff zu reduzieren), der je nach gemessenem Endpunkt und verwendetem Testaufbau mit der Gesamtzahl und/oder Vitalität lebender Zellen korreliert.

Gültige Prüfmethode: Eine Prüfmethode, die eine ausreichende Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck aufweist und auf wissenschaftlich fundierten Grundsätzen beruht. Eine Prüfmethode ist nie im absoluten Sinn, sondern nur in Bezug auf einen definierten Zweck gültig (18).

HCE: Menschliches Hornhautepithel SkinEthic™.

Hornhaut: Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IC₅₀: Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (z. B. nach einer 30-minütigen Behandlung mit SDS).

Irreversible Wirkungen am Auge: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht als augenreizend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 2, UN-GHS-/Kategorien 2A oder 2B) oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) eingestuft werden. Synonym zu „UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung“.

Leistungsstandards: Auf einer validierten und als wissenschaftlich fundiert betrachteten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien erreichen sollte (18).

LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze.

log P: Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

Negativkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt, um eine Gewebeviabilität von 100 % zu ermitteln.

NSC_{abgetötet}: Nicht spezifische Farbe bei abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}: Nicht spezifische Farbe bei lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der im Prüfsystem bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt. Um sicherzustellen, dass Abweichungen der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Prüfung: Eine einzelne Prüfchemikalie, die gleichzeitig an mindestens zwei Gewebereplikaten im Sinne der jeweiligen Standardarbeitsanweisungen geprüft wird.

Referenzchemikalie: Eine zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendete Chemikalie. Eine Referenzchemikalie sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob dieses Verhältnis aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhergesagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (18).

Reproduzierbarkeit: Die Übereinstimmung von Ergebnissen, die mit wiederholten Prüfungen derselben Prüfchemikalie nach demselben Prüfprotokoll ermittelt wurde (siehe „Zuverlässigkeit“) (18).

Reversible Wirkungen am Auge: Siehe „Augenreizung“.

RhCE: Rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel.

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffs auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

SD: Standardabweichung

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Standardarbeitsanweisungen: Förmliche, schriftliche Verfahrensbeschreibungen, in denen detailliert erläutert wird, wie bestimmte regelmäßige und prüfungsspezifische Tätigkeiten im Labor durchgeführt werden sollten. Standardarbeitsanweisungen sind nach guter Laborpraxis (GLP) vorgeschrieben.

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

Übereinstimmung: Siehe „Genauigkeit“.

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf das RhCE-Gewebemodell aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung“.

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die die Anforderungen für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) nicht erfüllen. Entspricht der Kategorie „Keine Einstufung“.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (18).

VK: Variationskoeffizient.

VRM 1: Der EpiOcular™ EIT wird als validierte Referenzmethode 1 bezeichnet.

VRM 2: Der SkinEthic™ HCE EIT wird als validierte Referenzmethode 2 bezeichnet.

VRM: Validierte Referenzmethode.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (18).

Anlage 2

WESENTLICHE ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RHCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Protokolle	Flüssigkeiten (15 Minuten bei Temperaturen von höchstens 37 ± 1 °C pipettierbar)	Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten: (pipettierbar)
Modelloberfläche	0,6 cm ²	0,5 cm ²
Anzahl der Gewebereplikate	Mindestens 2	Mindestens 2
Vorabprüfung auf Farbin- terferenzen	50 µl + 1 ml H ₂ O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) bzw. 50 µl + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüfsubstoffe) →Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 µl + 90 µl H ₂ O 30 ± 2 min bei Raumtemperatur (RT) gemischt (RT = 18-28 °C) →Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.
	50 mg + 1 ml H ₂ O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) und/oder 50 mg + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüfsubstoffe und nicht farbige Prüfchemikalien) →Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 mg + 90 µl H ₂ O 30 ± 2 min gemischt bei Raumtemperatur →Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Vorabprüfung auf direkte MTT-Reduktion	<p>50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit</p> <p>→wenn sich die Lösung blau/violett färbt, sollten geeignete durch Gefrieren abgetötete Kontrollen geprüft werden</p> <p>50 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).</p>	<p>30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit</p> <p>→Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden</p> <p>(Negativkontrolle = 30 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).</p>
Vorbehandlung	<p>20 µl Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS</p> <p>30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit, lichtgeschützt.</p>	-
Behandlungsdosierungen und Auftragung	<p>50 µl (83,3 µl/cm²)</p> <p>50 mg (83,3 mg/cm²) mit einem geeichten Werkzeug (z. B. einem gestrichenen Löffel, der 50 mg Natriumchlorid fasst).</p>	<p>10 µl Ca²⁺/Mg²⁺-freier DPBS</p> <p>Bei viskosen Flüssigkeiten ist ein Nylon-Maschenfilter zu verwenden.</p>
Expositionszeitraum und temperatur	<p>30 min (± 2 min)</p> <p>im Kulturmedium</p> <p>bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit</p>	<p>30 min (± 2 min)</p> <p>im Kulturmedium</p> <p>bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit</p>

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Waschen bei Raumtemperatur	Dreimal in 100 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem DPBS	Dreimal in 100 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem DPBS	20 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem DPBS	25 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem DPBS
Immersion nach der Exposition	12 min (\pm 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	25 min (\pm 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	30 min (\pm 2 min) bei 37 °C, 5 % CO_2 , 95 % relative Luftfeuchtigkeit im Kulturmedium	30 min (\pm 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium
Inkubation nach der Exposition	120 min (\pm 15 min) im Kulturmedium bei 37 \pm 2 °C, 5 \pm 1 % CO_2 , \geq 95 % relative Luftfeuchtigkeit	18 h (\pm 0,25 h) im Kulturmedium bei 37 \pm 2 °C, 5 \pm 1 % CO_2 , \geq 95 % relative Luftfeuchtigkeit	–	18 h (\pm 0,5 h) im Kulturmedium bei 37 \pm 2 °C, 5 \pm 1 % CO_2 , \geq 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Negativkontrolle	50 μl H_2O Gleichzeitig geprüft	50 μl H_2O Gleichzeitig geprüft	30 \pm 2 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier DPBS Gleichzeitig geprüft	30 \pm 2 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier DPBS Gleichzeitig geprüft
Positivkontrolle	50 μl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	50 μl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 \pm 2 μl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 \pm 2 μl Methylacetat Gleichzeitig geprüft

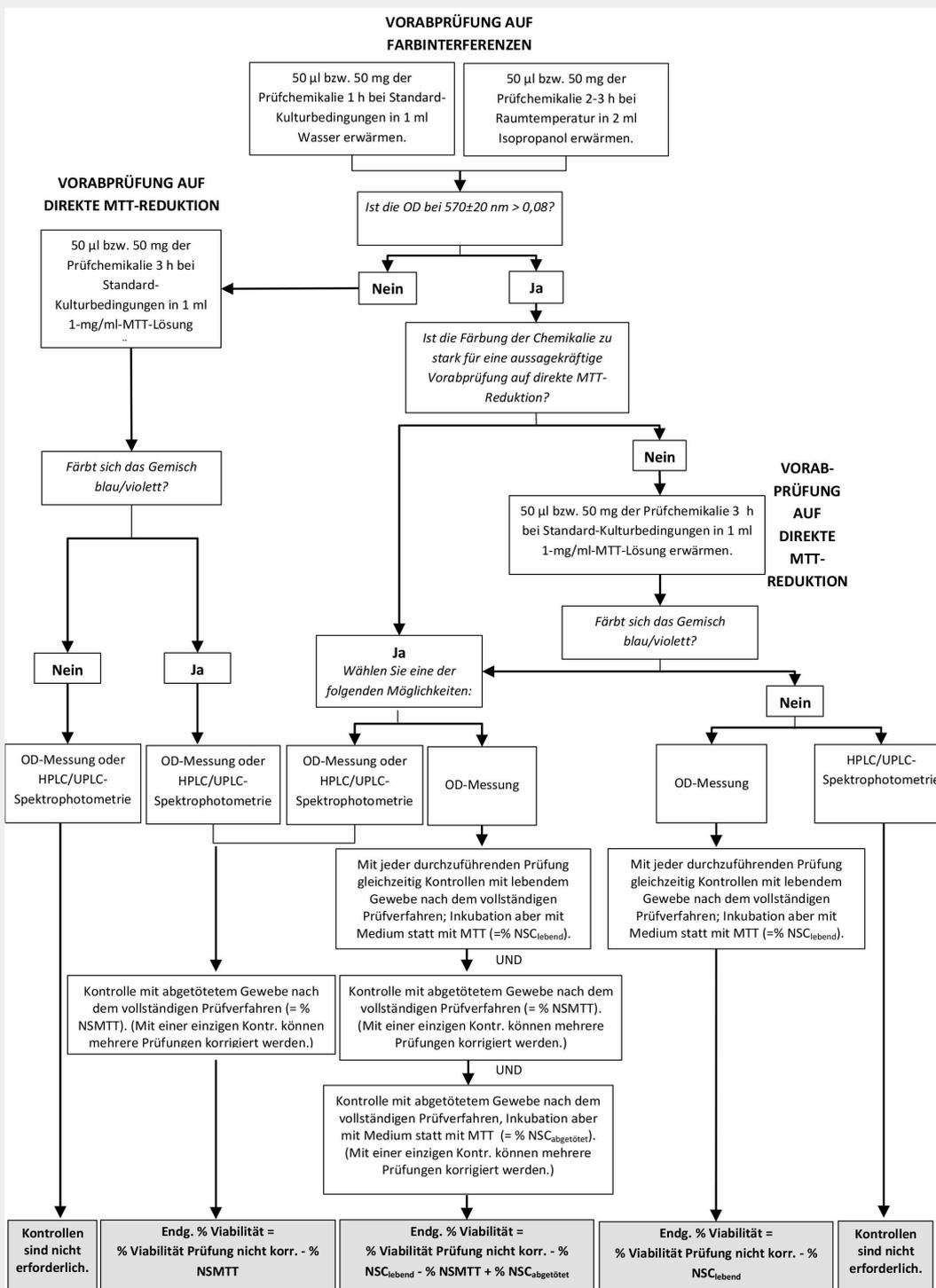
gestrichen - siehe Teil 0

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
MTT-Lösung	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT Inkubationszeit and temperature	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit
Extraktionslösung	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz unter Durchstechen des Gewebes)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)
Expositionszeitraum and temperature	2-3 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-10 °C	4 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über mindestens Nacht ohne Schütteln bei 4-10 °C
OD-Anzeige	570 nM (550 - 590 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (540 - 600 nM) ohne Referenzfilter
Kontrolle der Gewebequalität	Behandlung mit 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30-minütige Behandlung mit SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Akzeptanzkriterien	<p>1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $\geq 0,8$ und $\leq 2,5$ sein.</p> <p>2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 50 % sein.</p> <p>3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.</p>	<p>1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $> 1,0$ und $\leq 2,5$ sein.</p> <p>2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte ≤ 30 % sein.</p> <p>3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.</p>
		<p>1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte $> 1,0$ und $\leq 2,5$ sein.</p> <p>2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 4-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte ≤ 20 % sein.</p> <p>3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.</p>

Anlage 3

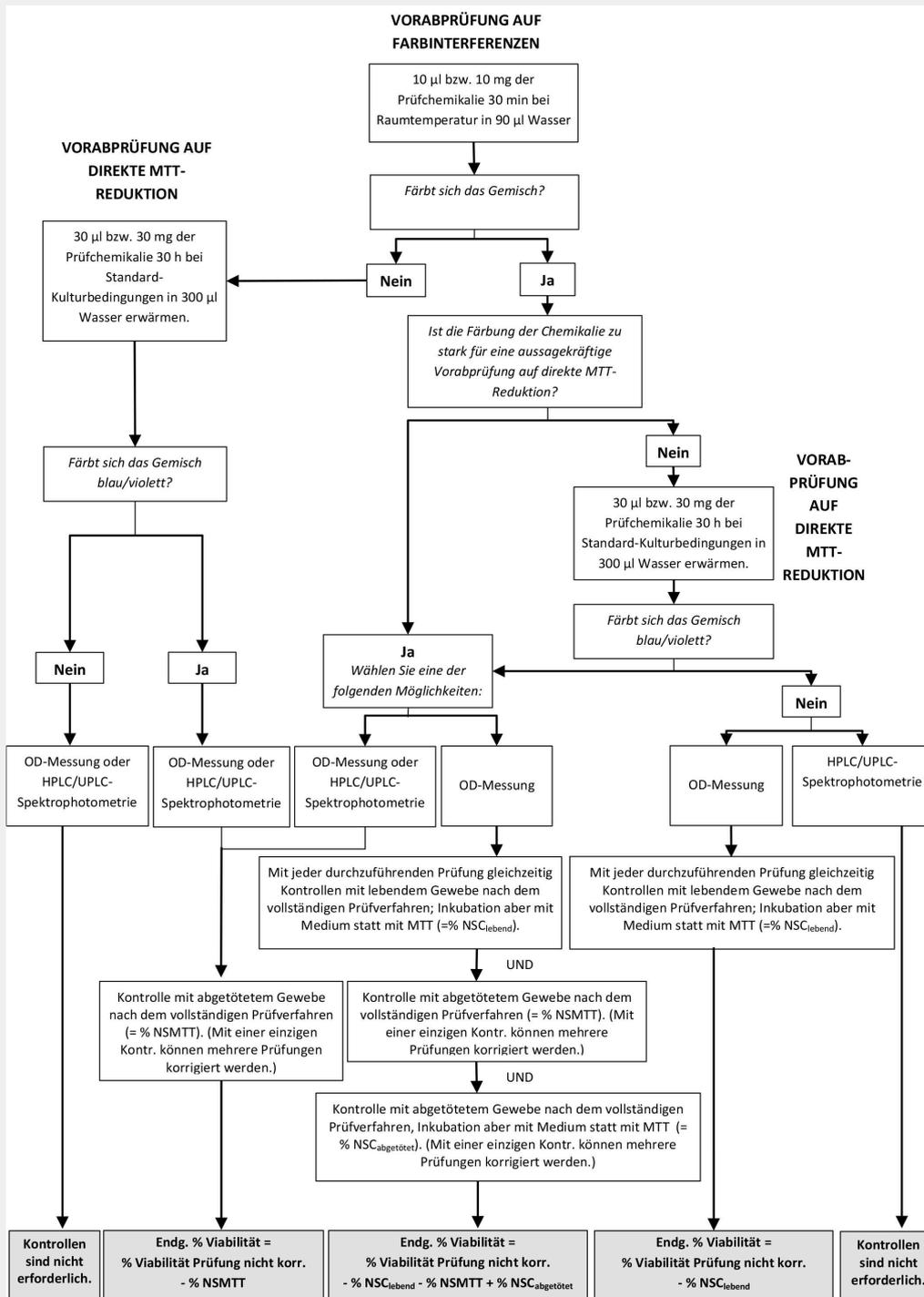
FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 1



gestrichen - siehe Teil 0

Anlage 4

FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 2



gestrichen - siehe Teil 0

Anlage 5

SCHLÜSSELPARAMETER UND AKZEPTANZKRITERIEN FÜR DIE QUALIFIZIERUNG EINES HPLC/UPLC-SPEKTROPHOTOMETRIESYSTEMS ZUR MESSUNG VON AUS RhCE-GEWEBEMODELLEN EXTRAHIERTEM MTT-FORMAZAN

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (36) (38)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindkontrolle lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung), Blindkontrolle abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung) und einem Farbstoff (z. B. Methylenblau)	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}^{(1)}$
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	VK ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Genauigkeit	Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	% Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen mit Blindkontrolle lebend (n=5)	85 % ≤ Matrixeffekt % ≤ 115 %
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ ⁽²⁾ -Standard	$\text{Fläche}_{\text{Interferenz}} \leq 20 \% \text{ Fläche}_{\text{LLOQ}}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	Eichkurven: % Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ Qualitätskontrollen: % Abw. ≤ 15 % und VK ≤ 15 %
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei -20 °C analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %

⁽¹⁾ LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen (~70 µg/ml bei der VRM), d. h. 200 µg/ml.