

EWA T. MYSTKOWSKA-BĄCZKOWSKA¹, ALDONA KOMAR¹,
JOLANTA SAMOS-ZIELIŃSKA¹, WALENTYNA STROIŃSKA², TERESA ROGULSKA³

OCENA PRZYDATNOŚCI BŁONY OMOCZNIOWO-KOSMÓWKOWEJ ZARODKA KURY DO TESTOWANIA DRAŻNIĄCYCH WŁAŚCIWOŚCI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

ASSESSMENT OF THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF THE CHICK EMBRYO
TO TEST IRRITATION POTENTIAL OF CHEMICAL AND COSMETIC PRODUCTS

¹ Z Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. S. Moskalewski

² Z Salonu Kosmetyki Lekarskiej „Jolwita”, Dział Badań Kosmetyków
Kierownik: dr n. med. J. Samos-Zielińska i lek. med. W. Stroińska

³ Z Zakładu Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego
Kierownik: prof. dr hab. A.K. Tarkowski

Oceniano przydatność testu wykonywanego na błonie omocznioowo-kosmówkowej zarodka kury do określenia właściwości drażniących kosmetyków.

Przemysł chemiczny i kosmetyczny wytwarza coraz to nowe produkty. Warunkiem dopuszczenia ich do obrotu jest wykonanie testów, które wykluczyłyby ich działanie drażniące na skórę i oczy przyszłych użytkowników. Dotychczas stosowanym testem określającym ryzyko wywołania podrażnienia skóry lub oka był test wykonywany *in vivo* na oku królika (test *Draize'a*) [2]. Wiele organizacji broniących praw zwierząt w Europie Zachodniej, a ostatnio i w Polsce, protestuje przeciwko stosowaniu metod powodujących cierpienia i okaleczenie zwierząt, stąd w krajach Unii Europejskiej testy *Draize'a* na zwierzętach są wycofywane i zastępowane testami alternatywnymi. Różne metody określające potencjalne właściwości drażniące substancji chemicznych przedstawiono we wcześniejszej pracy na podstawie piśmiennictwa [6]. W tej pracy chcieliśmy sprawdzić, przydatność do określenia właściwości drażniących jednego ze stosowanych testów alternatywnych, opracowanego przez *Luepke'go* [5]-Chorioallantoic Membrane test-CAM test, który wydawał się nam stosunkowo prosty w wykonaniu. Metoda *Luepke'go* polega na ocenie wpływu substancji chemicznej na naczynia krwionośne błony omocznioowo-kosmówkowej (CAM) zarodka kury. Ta błona płodowa składa się z dwóch warstw nabłonka (zewnętrznej i wewnętrznej) oraz zawartej między nimi bogato unaczynionej tkanki łącznej. Układ krwionośny CAM pozostaje w łączności z krążeniem zarodkowym. Substancje badane mogą w różnym stopniu uszkadzać naczynia błony omocznioowo-kosmówkowej i samą błonę. Oceniano czułość testu, jego powtarzalność i możliwość porównania otrzymanych wyników z wynikami znanymi z badań przeprowadzonych poprzednio w innych pracowniach.

METODY I MATERIAŁY

Badania wykonywano na zarodkach kur rasy *Astra* i *Hy-Line*. Jaja były inkubowane w temperaturze 37,8°C–38,0°C i wilgotności powietrza – 60%. W trzecim dniu rozwoju skorupy otwierano i wykonywano sztuczną komorę powietrzną nad rozwijającym się zarodkiem według metody *Callebaut* [1], po czym inkubowano dalej do 10 dnia rozwoju. W 10 dniu, otwór w skorupie nad zarodkiem był poszerzany dla utworzenia dogodnego pola obserwacji i jaja umieszczano pod mikroskopem stereoskopowym (F-my Olympus), pod którym dokonywano dalszych obserwacji (powiększenie 30 X). Badana substancja była nakrapiana na CAM w ilości 200 μ l. W tym okresie rozwoju błona omoczniowo-kosmówkowa przylega, poza obrębem komory powietrznej, do skorupy jaja. W obserwowanym polu nie ma już białka, którego resztkę pozostaje w okolicy pęcherzyka żółciowego. Tak więc badana substancja działa bezpośrednio na nabłonek CAM. Reakcje obserwowano po 0,5, 2 i 5 min. W przypadku żeli i zawiesin 200 μ l roztworu nalewano lub kładziono szpatułką, a po 20 sekundach splukiwano 5 ml wody destylowanej. Od tego momentu mierzono czas. Reakcję oceniano po 0,5, 2 i 5 minutach [5]. Każda substancja była badana na 4 jajkach. Obserwowano zachowanie się naczyń krwionośnych. Wskaźnikami reakcji wg *Luepke'go* są: przekrwienie, krwotok i koagulacja. Tabela I i II przedstawia punktową ocenę wpływu drażniącego preparatu wg tego autora [5].

Tabela I. Ocena drażniącego działania preparatu na błonę omoczniowo-kosmówkową [5]
Scoring scheme for irritation testing with the hen's egg chorioallantoic membrane

Obserwowane zmiany	Liczba punktów		
	0,5 min	2 min	5 min
Przekrwienie	5	3	1
Wylew	7	5	3
Koagulacja	9	7	5

Tabela II. Ocena stopnia reakcji drażniącej wg liczby punktów [5]
Classification of cumulative scores in the chorioallantoic membrane test

Liczba punktów	Ocena stopnia reakcji
0 – 0,9	brak
1 – 4,9	słaba
5 – 8,9	umiarkowana
9 – 21	silna

Kryteria stosowane dotychczas w piśmiennictwie [4, 5, 7], wydawały się nam mało precyzyjne i dlatego opierając się na metodyce *Luepke'go* rozszerzono test o nowe parametry oceny. Uwzględniono zmiany o różnym charakterze, obserwowane w naczyniach o różnej grubości, zachowując sumaryczną ocenę punktową dla poszczególnych zmian w odpowiednich grupach czasowych. Naczynia krwionośne w błonie omoczniowo-kosmówkowej zostały zaklasyfikowane do trzech grup w zależności od średnicy: włosowate, średnie o średnicy 25–100 μ m i duże, o średnicy powyżej 100 μ m. Zaobserwowano następujące reakcje: wylewy, zniszczenie ściany naczyń, utrata widoczności naczyń wynikająca zapewne z lizy wchodzących w jego skład komórek lub koagulację krwi co przejawiało się lokalnym zatrzymaniem krążenia lub też zbieżenie naczyń, które jest prawdopodobnie wyrazem

koagulacji ich ścian. W skrajnych przypadkach występowała koagulacja nabłonka. W zależności od stopnia reakcji i czasu oddziaływania preparatu (0,5 do 5 minut), obserwowano powyższe zmiany w naczyniach o różnej grubości. Reakcja zaczynała się od naczyń włosowatych po czym obejmowała naczynia średnie. Naczynia duże na ogół nie ulegały uszkodzeniu, jedyną zmianą obserwowaną pod wpływem działania drażniącego niektórych preparatów było zatrzymanie w nich krążenia. Zmodyfikowany test podano w Tabeli III wraz z oceną punktową poszczególnych zmian.

Tabela III. Opis zmian w naczyniach krwionośnych i nabłonku CAM pod wpływem testowanych substancji wraz z oceną punktową ich właściwości drażniących
The description of modification of CAM blood vessels and epithelium evoked by tested substances and the score of the potential irritation

Opis zmian		Liczba punktów		
		0,5 min	2 min	5 min
Wylewy z naczyń	włosowatych	2	1	0
	średnich i dużych	3	2	1
Utrata widoczności naczyń	włosowatych	2	1	1
	średnich	2	2	1
	dużych	3	2	1
Zatory w naczyniach	włosowatych i średnich	0,5	0	0
	dużych	1,5	1	0,5
Koagulacja naczyń i nabłonka		7	6	4,5
Liczba punktów ogółem		21	15	9

Dla wyjaśnienia obserwowanego często zjawiska znikania, w polu obserwacji, wynaczynionych erytrocytów lub zatrzymanych w naczyniach, pod wpływem niektórych preparatów, wykonano badania bezpośredniego działania szamponu nr 6 na krwinki czerwone 10-dniowego zarodka. W tym celu pobierano krew z serca w ilości około 5 μ l. i dodawano do 5 μ l. roztworu szamponu w płynie fizjologicznym (0,9% NaCl). Płyn fizjologiczny był używany jako kontrola.

Stosując zmodyfikowany test, poddano ocenie szampony (w trzech stężeniach: nie rozcieńczony, rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku 1:2 i 1:4), kremy, emulsje, żele, toniki i mlecza kosmetyczne. Prócz tego oceniono właściwości drażniące następujących substancji chemicznych: siarczan dodecylu sodu – SDS 1%, preparat Teepol 5%, stosowany do mycia szkła laboratoryjnego, dimetylo sulfotlenek – DMSO 10% i alkohol etylowy 50% i 100%. Jako kontrola służyła woda destylowana, stosowana również do rozcieńczania alkoholu, detergentu i innych substancji.

WYNIKI

Miarą zdolności do wywołania reakcji drażniącej przez badany preparat było uszkodzenie naczyń krwionośnych w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurczęcia, oceniane według zmodyfikowanego przez nas testu (Tabela III). Ocena stopnia reakcji drażniącej była odczytywana z Tabeli II, przez zsumowanie liczby punktów uzyskanych wg testu, zgodnie z czterema kategoriami: brak reakcji, reakcja

słaba, średnia (czyli umiarkowana) i silna. Badano również bezpośrednie działanie szamponu (nr 6) na krwinki czerwone. Stwierdzono zmianę kształtu krwinek i występowanie hemolizy. Szybkość reakcji była zależna od stężenia szamponu i czasu. W rozcieńczeniach 1:4, reakcja była natychmiastowa, wszystkie krwinki ulegały hemolizie. W rozcieńczeniu 1:100 po 30 sekundach następowała zmiana kształtu komórek z owalnych na soczewkowate, po 2 minutach obserwowano uwolnienie hemoglobiny z krwinek lub ich pękanie a po 5 minutach tylko nieliczne krwinki zachowały swój kształt. Przy stężeniu 1:1000 po 30 sekundach krwinki zachowały normalny kształt, po 2 minutach niektóre krwinki zmieniały kształt a niektóre ulegały hemolizie. Po 5 minutach hemoliza dotyczyła tylko niewielkiego odsetka krwinek. Po rozcieńczeniu szamponu w stosunku 1:5000 nie było reakcji po 2 minutach a po 5 minutach pojawiły się nieliczne, zhemolizowane krwinki. Przy rozcieńczeniu 1:10000 hemoliza nie występowała.

W pracy oceniono właściwości drażniące 14 substancji płynnych i 13 substancji o konsystencji żelu lub zawiesiny. Wyniki badań podano w Tabelach IV, V i VI. Woda podwójnie destylowana traktowana jako kontrola nie miała właściwości drażniących (Tabela IV) dlatego stosowana była jako roztwór obojętny do rozcieńczania szamponów (z wyjątkiem użytego do badania uszkodzenia krwinek), detergentów i alkoholu oraz spłukiwania żeli i zawiesin.

Tabela IV. Ocena właściwości drażniących płynnych substancji chemicznych
Scores and assessments of irritation potential of liquid chemicals
and cosmetics

Nazwa substancji	Liczba punktów	Reakcja
Woda destylowana	0	brak
SDS 1%	9,12	silna
Teepol 5%	15,50	silna
DMSO 10%	3,10	słaba
Alkohol etylowy 50%	15,37	silna
Alkohol etylowy 100%	18,10	silna
Tonik 1	0	brak
Tonik 2	0,62	brak
tonik 3	0	brak

W Tabeli IV zestawiono wyniki testu dla trzech toników produkcji krajowej. Żaden z toników nie wykazywał właściwości drażniących. Dla porównania wyników testu kosmetyków wykonano badanie substancji chemicznych o spodziewanym silnym działaniu drażniącym, takich jak alkohol lub SDS. Wyniki testu tych substancji są zestawione w Tabeli IV. Preparaty te już po 0,5 minuty niszczyły naczynia krwionośne powodując wylewy i rozpad naczyń.

Szampony testowano w trzech stężeniach: nie rozcieńczone, w rozcieńczeniu 1:2 i 1:4. Wszystkie testowane szampony wykazywały różne właściwości drażniące, przy czym stopień drażnienia nieznacznie różnił się przy zmianie stężenia (Tabela V). Najmniejszą reakcję wywoływał szampon dla dzieci a największą szampony 1 i 6.

Tabela V. Ocena właściwości drażniących szamponów
Scores and assessments of irritation potential of shampoos

Badana substancja	Liczba punktów	Reakcja wg CAM test
Szampon 1	14,00	silna
rozcieńczony 1:2	15,25	silna
rozcieńczony 1:4	12,75	silna
Szampon 2	9,00	silna
rozcieńczony 1:2	9,50	silna
rozcieńczony 1:4	7,50	umiarkowana
Szampon 3	7,25	umiarkowana
rozcieńczony 1:2	7,75	umiarkowana
rozcieńczony 1:4	8,00	umiarkowana
Szampon 4*	8,37	umiarkowana
rozcieńczony 1:2	7,75	umiarkowana
rozcieńczony 1:4	6,50	umiarkowana
Szampon 5**	6,50	umiarkowana
rozcieńczony 1:2	6,37	umiarkowana
rozcieńczony 1:4	5,00	umiarkowana
Szampon 6	13,12	silna
rozcieńczony 1:2	11,75	silna
rozcieńczony 1:4	8,87	umiarkowana
Szampon 6*	12,60	silna

* – szampon splotkiwany po 20 sek

** – szampon dla dzieci „myje bez teź”

W Tabeli VI zestawiono wyniki testu kremów, żeli, emulsji, mleczek i tuszów do rzes. Metodyka oceny właściwości drażniących zawiesin i żeli różni się od metodyki oceny substancji płynnych. W pierwszym przypadku badany preparat działa na błonę tylko przez 20 sekund a w drugim przez 5 minut. Dla porównania wyników uzyskanych przy użyciu obu metod oceniono właściwości drażniące szamponu Nr 6 oboma modyfikacjami testu. W pierwszej wersji doświadczenia szampon działał przez 5 minut a oceny dokonywano tak jak w przypadku innych substancji płynnych po 0,5, 2 i 5 minutach. W drugiej wersji był splotkiwany po 20 sekundach a ocenę przeprowadzono w ciągu następnych 0,5, 2 i 5 minutach. Wyniki oceny własności drażniących przy zastosowaniu obu technik są podobne: 13, 12 punktów w porównaniu do 12,6 punktów (Tabela V). Szampon Nr 4 nie rozcieńczony oddziaływał przez 20 sekund podczas gdy w rozcieńczeniu 1 : 2 przez 5 minut. Liczba punktów, na które w obu przypadkach oceniono reakcję drażniącą wynosiła odpowiednio: 8 i 7,75 (Tabela V).

Wszystkie preparaty testowane, poza jednym kremem i jednym szamponem, były produkowane w kraju. Na uwagę zasługuje wynik oceny kremu nr 1. W Tabeli VI zamieszczone są dwa wyniki gdyż oceniano próbki z dwóch partii kremu, jedna z nich wywoływała podrażnienia skóry. W obu przypadkach test *Draize'a* nie wykazał

Tabela VI. Ocena właściwości drażniących kremów, żeli i zawiesin
Scores and assessments of irritation potential of creams,
gels and suspension

Nazwa substancji	Liczba punktów	Reakcja
Krem 1, seria A	0	brak
Krem 1, seria B	2	słaba
Żel 2	0,37	brak
Żel 3	3,08	słaba
Żel 4	1,25	słaba
Emulsja 1	2,10	słaba
Krem 5	5,75	umiarkowana
Mleczko 1	0,75	brak
Mleczko 2	0,75	brak
Płyn do kąpieli 1	6,50	umiarkowana
Tusz do rzęs 1	7,25	umiarkowana
Tusz do rzęs 2	4	słaba
Tusz do rzęs 3	9,87	silna

właściwości drażniących podczas gdy wynik testu wykonanego na błonie oczniowo-kosmówkowej był różny: krem, który wywoływał podrażnienia skóry powodował również zmiany w naczyniach CAM ocenione jako słaba reakcja drażniąca. Zbadano również wpływ emulsji zawierającej α -hydroksykwas. Emulsje takie są w chwili obecnej szeroko stosowane w Polsce i w krajach Unii Europejskiej. Testowana emulsja (nr 1, Tabela VI) wykazywała tylko słabą reakcję drażniącą.

Tabela VII. Ocena właściwości drażniących niektórych substancji na podstawie testu CAM i testu *Draize'a*
Comparison of CAM test results with those for *Draize* method irritation testing using various cosmetics

Nazwa substancji	Reakcja wg testu CAM (liczba uzyskanych punktów)	Reakcja wg testu <i>Draize'a</i>
Mleczko 1	brak	brak
Mleczko 2	brak	brak
Szampon 3	umiarkowana (7,25)	brak
Krem 1 A	brak	brak
Krem 1 B	słaba	brak
Tonik 1	brak	brak
Szampon 6	silna (13,12)	brak
Płyn do kąpieli 1	umiarkowana (6,50)	brak
Tonik 2	brak	brak
Tonik 3	brak	brak

W Tabeli VII zestawiono ocenę właściwości drażniących niektórych toników mleczek i szamponów, wykonaną testem CAM i testem *Draize'a*.

DYSKUSJA

Nie opracowano dotychczas idealnego testu pozwalającego ocenić ryzyko wywołania podrażnienia skóry i oka ludzkiego przez kosmetyki i preparaty chemiczne. Dotychczas stosowany test *in vivo* – wykonywany na oku królika powinien być z powodów etycznych zastąpiony innym testem. Jest wiele testów proponowanych jako alternatywne [przeгляд piśmiennictwa: 3, 6], żaden z nich jednak nie uzyskał dotychczas pełnej akceptacji ani w krajach Unii Europejskiej ani w Stanach Zjednoczonych. Spośród proponowanych testów na uwagę zasługuje ocena własności drażniących substancji chemicznych metodą badania ich oddziaływania na błonę omoczeniowo-kosmówkową zarodka kury – test CAM [5]. Badana substancja oddziałuje na bogato unaczynioną, żywą błonę a zdolność do podrażniania jest oceniana przez; reakcję krwinek – ich hemolizę; naczyń krwionośnych: wylewy, utrata widoczności naczyń lub ich zbieżenie będące przypuszczalnie wynikiem koagulacji; oraz reakcję nabłonka – koagulację. Szybkość reakcji jest określona w czasie. Kalkulacja punktowa (skala od 0 do 21 punktów) uwzględnia zakres zmian i szybkość wystąpienia reakcji – im szybciej występują zmiany, tym wyższa liczba punktów.

Test CAM nie nadaje się do oceny substancji w postaci ciał stałych. Umieszczenie ciała stałego na błonie omoczeniowo-kosmówkowej może powodować uszkodzenia mechaniczne. Możliwa jest natomiast ocena właściwości drażniących kremów, zawiesin i żeli. Jest to jednak inna metoda niż stosowana dla substancji płynnych. Kremy, żele i zawiesiny działają tylko przez 20 sekund, po czym są splukiwane. Reakcja jest odczytywana tylko w tym polu, na które działał badany preparat i można zauważyć, że ogranicza się tylko do niego. Substancje płynne pokrywają całą odsłoniętą powierzchnię błony i działają na nią przez cały czas obserwacji (0–5 minut). Okazało się, że nie stanowi to większej różnicy w ocenie preparatów obiema metodami.

Porównanie testu CAM z testem ocznym *Draize'a* wykazuje, że test CAM jest znacznie bardziej czuły. Wykazują to zarówno nasze doświadczenia jak i wyniki przedstawione w piśmiennictwie [7]. Wynika to ze specyfiki obu metodyk. Test CAM jest krótkotrwały i odczyt wyniku – natychmiastowy. Uzyskane wyniki a także uzyskane przez *Luepke* [5] wskazują, że dłuższe pozostawienie substancji badanej nie zmienia oceny. Metodyka wykonania testu *Draize'a* polega na długotrwałej obserwacji, do 72 godzin i dotyczy żywych tkanek, które podlegają gojeniu. Badana substancja nawet jeżeli powoduje podrażnienia po 2 godzinach to w większości przypadków po 48 lub 72 godzinach, po wypłukaniu z oka, nie daje zmian trwałych a podrażnienie znika. Oczywiście dotyczy to substancji o umiarkowanym potencjale drażniącym, takich jak kosmetyki czy szampony, gdyż żrące preparaty powodują trwałe uszkodzenia. Przedstawione tu różnice w obu metodykach powodują odmienne oceny właściwości drażniących substancji przy użyciu obu testów. Wiąże się to z niebezpieczeństwem odrzucenia niektórych preparatów na podstawie oceny testem CAM. Z drugiej strony test ten jest na tyle czuły, że może wykazywać różnice w jakości dwóch próbek pozornie tego samego preparatu, nie wykrywalne testem *in vivo*.

Plusem tej metodyki jest również fakt, że jest to metoda półilościowa i w niewielkim stopniu oparta na subiektywnej ocenie, jednakże musi być wykonywana przez osobę mającą doświadczenie w ocenie reakcji naczyń krwionośnych CAM na podawane

substancje. Laboratoria nie mające doświadczenia w wykonywaniu tego testu mogą różnie interpretować obserwowane reakcje [4]. W momencie rozpoczynania wykonywania testu ocena wydaje się być istotnie trudna. Trudności potęguje fakt, że kryteria oceny zamieszczone w piśmiennictwie są bardzo ogólne: krwotok, liza i koagulacja [4, 7] lub przekrwienie, krwotok i koagulacja [5]. Tak niejednoznaczne określenia skłoniły nas do poszerzenia skali oceny przez dodanie nowych parametrów określających wielkość naczyń, których dotyczy reakcja. Wydaje się, że opracowana przez nas skala umożliwi łatwiejsze i bardziej jednoznaczne odczytanie wyników testu przy zachowaniu oceny punktowej opracowanej przez autora metody [5].

Wydaje się, że tego rodzaju test może być przydatny do wstępnego testowania substancji chemicznych, oraz dla oceny ewentualnych właściwości drażniących preparatów kosmetycznych.

WNIOSKI

Zmodyfikowany przez nas test *Luepke'go* jest testem krótkotrwałym i czułym. Metoda ta nadaje się do testowania płynów, zawiesin i żeli. Test może być przydatny do oceny właściwości substancji chemicznych i preparatów kosmetycznych.

E.T. Mystkowska-Bączkowska, A. Komar, J. Samos-Zielińska,
W. Stroińska, T. Rogulska

ASSESSMENT OF THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF THE CHICK EMBRYO TO TEST IRRITATION POTENTIAL OF CHEMICAL AND COSMETIC PRODUCTS

Summary

A large number of new chemicals and cosmetics are introduced every year and it is necessary to find a reliable method for the detection of potential irritants. Hitherto used, for this purpose, in vivo rabbit eye test (*Draize'a test*) should be substituted by alternatives because of ethical and legal aspects. One of the most promising method predicting the irritant potential is test performed on the chorioallantoic membrane of the chick embryo (CAM-test) [5]. This membrane is a complete tissue including arteries, capillaries and veins and is technically easy to study. The aim of the study was to check reliability and sensitivity of the test.

The principles of the method are simple. The test substance (pure, dissolved or suspended) is applied to the CAM at a volume of 200 μ l. The blood vessels and the remaining parts of the membrane are examined and scored for irritant effects (hyperaemia, lysis or coagulation) after 0,5, 2 and 5 minutes treatment.

The numerical, time-dependent score (Table III) are summed to give a single numerical value indicating the irritation potential of the tested substance (Table II). The final assesment is based on the mean value from four experiments.

A summary of the results of CAM irritation testing of some of chemicals and cosmetics is given in Tables IV, V and VI. Table VII shows results of assessment of irritation potential of various cosmetics tested by two methods: CAM and *Draize* eye tests.

It was found that CAM test is a rapid and very sensitive method which can give an information on the potential of irritation of chemical substances and cosmetics.

PIŚMIENNICTWO

1. *Callebaut M.*: A new method for making an artificial air space on top of fertilized avian eggs. *Poultry Sci.* 1981, 60, 723. – 2. *Draize J.H., Woodard G., Calvery H.O.*: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1944, 82, 377 (cyt. za *Gfeller i wsp.*, 1985). – 3. *Gfeller W., Kobel W., Seifert G.*: Overview of animal test methods for skin irritation. *Fr. Chem. Toxic.*, 1985, 23, 165. – 4. *Kalweit S., Besoke R., Gerner I., Spielman H.*: A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. *Toxic. in Vitro* 1990, 4, 702. – 5. *Luepke N.P.*: Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd. Chem. Toxic.* 1985, 23, 287. – 6. *Moskalewski S., Mystkowska-Bączkowska E., Kiss E.*: Test *Draize'a* i alternatywne metody oceny drażniącego działania substancji chemicznych. *Roczniki PZH* 1995, 46, 163. – 7. *Sterzel W., Bartnik F.G., Matthies W., Kästner W., Künstler K.*: Comparison of two in vitro and two in vivo methods for the measurement of irritancy. *Toxic. in Vitro* 1990, 4, 698.

Dn. 1995.04.12

02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5