

Zintegrowane strategie badań toksyczności produktów nanotechnologii¹

dr LIDIA ZAPÓR
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Słowa kluczowe: ITS, zintegrowane strategie badań, nanomateriały, metody alternatywne, REACH.

Keywords: ITS, Integrated Testing Strategies, nanomaterials, alternative methods, REACH.

Streszczenie

W związku z rozwojem nanotechnologii należy spodziewać się, że w najbliższych latach do obrotu zostanie wprowadzone wiele nowych produktów w skali nano (10^{-9} m), które będą musiały zostać zaklasyfikowane pod względem zagrożeń. Do oceny bezpieczeństwa chemicznego nanomateriałów proponuje się stosowanie zintegrowanych strategii badań (*integrated testing strategy*, ITS).

W artykule przybliżono zasady zintegrowanych strategii badań, omówiono podstawy alternatywnych metod oceny toksyczności, zamieszczono informacje o poradnikach REACH dotyczących metod badawczych substancji chemicznych (w tym nanomateriałów) oraz przedstawiono przykład zintegrowanej strategii badań toksyczności nanocząstek.

Summary

The development of nanotechnology is expected to result in the launching of a number of new nanostructured products (10^{-9} m), which will have to be classified in terms of hazards. The Integrated Testing Strategy (ITS) can be used to assess the chemical safety of nanomaterials. This article discusses

the principles of ITS and of alternative methods for toxicity testing; it also contains information about REACH recommendations on information requirements and chemical safety. There is an example of how ITS is used to test the toxicity of nanoparticles.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników II etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2011-2013 w zakresie zadań służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

WPROWADZENIE

Obrót substancjami chemicznymi w Europie regulują rozporządzenia: w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (rozporządzenie REACH – Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals. Rozporządzenie WE nr 1907/2006) i rozporządzenie w sprawie klasyfikacji, oznakowania oraz pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP – Classification, labelling and packaging. Rozporządzenie WE nr 1272/2008). Rozporządzenia te nakładają na producentów i importerów substancji chemicznych obowiązek przedkładania w dossier rejestracyjnym odpowiednich (zależnie od tonażu) informacji dotyczących oceny zagrożeń dla zdrowia i środowiska, jakie wprowadzana do obrotu substancja może powodować oraz obowiązek klasyfikacji substancji do odpowiednich kategorii zagrożeń.

Nanomateriały² podlegają definicji substancji wg REACH i wszystkim regulacjom wynikającym z tego rozporządzenia (Nanomaterials ... 2008). W związku z rozwojem nanotechnologii należy spodziewać się, że w najbliższych latach do obrotu zostanie wprowadzone wiele nowych produktów w skali nano (10^{-9} m), które będą musiały zostać zaklasyfikowane ze względu na zagrożenia. Parlament Europejski w rezolucji w sprawie aspektów regulacyjnych nanomateriałów postuluje, aby wszystkie nanomateriały były uznawane za substancje nowe, jak również wnosi o obowiązek uproszczonej rejestracji nanomateriałów produkowanych lub importowanych poniżej jednej tony oraz sporządzenia sprawozdania o bezpieczeństwie wraz z oceną narażenia dla wszystkich zarejestrowanych nanomateriałów (Aspekty... 2010). Oznacza to, że w przypadku, gdy dana substancja chemiczna jest obecna na rynku w postaci większych cząstek („bulk”), wprowadzenie jej do obrotu w postaci nanocząstek będzie wymagało aktualizacji dokumentów rejestracyjnych, z uwzględnieniem nowych właściwości tej substancji wynikających z formy nano. Poza tym wiele z substancji już wprowadzonych do obrotu osiągnie próg tonażowy powyżej 10 t, dla którego zgodnie z roz-

porządzeniem REACH jest wymagana ocena bezpieczeństwa chemicznego (np. nanometryczny ditlenek tytanu, tlenek cynku czy srebro). Te wymagania są związane z obowiązkiem przedkładania przez producentów lub importerów odpowiednich informacji dotyczących oceny zagrożeń dla człowieka i środowiska. Podstawą oceny zagrożeń są wyniki badań toksykologicznych i ekotoksykologicznych. W rozporządzeniu REACH dużą wagę przykładają się do badań uwzględniających ochronę zwierząt doświadczalnych. W celu wsparcia procesu rejestracji substancji, zgodnie z wymaganiami REACH, są opracowywane, tzw. zintegrowane strategię badań substancji chemicznych.

Założenia zintegrowanej strategii badań

Zintegrowana strategia badań (*integrated testing strategy*, ITS) jest metodologią łączącą informacje pochodzące z różnego rodzaju badań toksykologicznych, na których podstawie jest możliwe wydanie odpowiedniej decyzji o toksyczności substancji, służącej przede wszystkim do celów oceny bezpieczeństwa przy wprowadzaniu substancji do obrotu (*Kinsner-Ovaskainen* i in. 2009). Źródłem informacji są: dane fizykochemiczne, wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo*, wyniki komputerowego modelowania toksyczności oraz dane pochodzące od ludzi (*Vermeire* i in. 2007).

Zintegrowana strategia badań ma charakter analizy sekwencyjnej i jest przeprowadzana etapowo, począwszy od oceny kompletności istniejących danych dotyczących toksyczności, po propozycję zastosowania odpowiednich metod badawczych (przede wszystkim metod alternatywnych do badań na zwierzętach), a w końcowym etapie podjęcia decyzji co do toksyczności substancji lub konieczności wykonania dodatkowych badań na zwierzętach. Do oceny informacji jest wykorzystywana analiza „wagi dowodów”³ (*weight of evidence*) uzyskanych na podstawie istniejących danych. Takie podejście (określane również jako podejście oparte na ciężarze dowodu) umożliwia zaprzestanie

² Nomenklatura dotycząca nanomateriałów (nanoobjektów, nanocząstek) została zamieszczona w artykule: Nanoobjekty w środowisku pracy (*Jankowska* 2011).

³ Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych elementów informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję oraz uzasadnienia takiego wniosku (rozporządzenie UE 1152/2010).

badania na każdym etapie, o ile uzyskiwane dane zostaną uznane za wystarczające do oceny ryzyka i klasyfikacji substancji (Vermeire i in. 2007).

Schematy postępowania wg zintegrowanej strategii badań są różne w zależności od badanego skutku toksycznego, jak np.: toksyczności ostrej układowej i toksykokinetyki (Grindon i in. 2008a), toksyczności dawki powtarzanej (Grindon i in. 2008b), działania uczulającego skórę (Grindon i in. 2007a), działania żrącego/ drażniącego skórę (Grindon i in. 2007b), działania drażniącego oko (Grindon i in. 2008c), toksyczności rozwojowej (Grindon i in. 2008d), działania mutagennego i rakotwórczego (Combes i in. 2007) czy też toksyczności środowiskowej (Vermeire i in. 2007; Grindon i in. 2008e).

Wspólnym elementem wszystkich strategii jest uwzględnianie informacji pochodzących z metod alternatywnych do badań na zwierzętach. Metody alternatywne to metody spełniające wszystkie lub którąkolwiek z zasad „3R”: *replacement* – zastąpienie zwierząt w doświadczeniach przez modele badawcze „nie odczuwające cierpień”, *reduction* – zmniejszenie liczby zwierząt, na których należy przeprowadzić badania, *refinement* – doskonalenie metod w kierunku zmniejszenia cierpień zwierząt w doświadczeniach. Idea 3R została uznana za podstawę działalności Funduszu Eliminacji Zwierząt z Eksperymentów Medycznych (Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments, FRAME), organizacji, pod której auspicjami powstają międzynarodowe programy badawcze, w ramach których są opracowywane nowe metody oceny działania toksycznego substancji.

Rozwojem, walidacją, a także koordynacją badań i ich wdrożeń zajmują się powstałe w wielu państwach fundacje i instytucje. Do najważniejszych należą: European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) w państwach Wspólnoty Europejskiej oraz Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) w USA. Metody, które przeszły pozytywnie proces walidacji, są zatwierdzane i wdrażane jako wytyczne (TG, Test Guideline) przez OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), (Wytyczne OECD...).

Podstawą badań alternatywnych są badania prowadzone w warunkach *in vitro* na komórkach wyizolowanych z różnych narządów (głównie ssaków), zwłaszcza z narządów docelowego działania substancji. Tylko wyniki zwalidowanych metod *in vitro* oraz metod poddanych wstępnej walidacji

mogą być wykorzystywane do celów klasyfikacji i oznakowania lub oceny ryzyka. Inne dane *in vitro* mogą być wykorzystywane jedynie jako wspomagające proces decyzyjny, w ramach podejścia opartego na ciężarze dowodu (Poradnik praktyczny... 2010).

Informacje dotyczące wykorzystania metod *in vitro* w kontekście REACH, dla każdego rodzaju toksycznego działania, są zamieszczone w poradniku dotyczącym wymagań w zakresie informacji (rozdział R.4.3.1.1 Dane *in vitro*), jak również w poradniku dotyczącym wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego (w części R7a i R7b), (Poradnik... 2011). W przypadku zamieszczania w dokumentacji rejestracyjnej danych z badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* z zastosowaniem podejścia opartego na ciężarze dowodu, należy postępować zgodnie ze wskazówkami zawartymi w poradniku praktycznym nr 2: Jak zgłaszać ciężar dowodu (Practical guide.... 2010).

Drugim nurtem badań alternatywnych są metody *in silico*, czyli z wykorzystaniem technik komputerowych, umożliwiających wnioskowanie o różnych aspektach toksyczności na podstawie opracowywanych modeli, jak np. modelowanie farmakokinetyki (PBPK – *physiologically based pharmacokinetic*); modelowanie zależności struktura-aktywność (QSAR, *quantitative structure-activity relationships*), pozwalającej na ustalenie związku między budową i właściwościami z niej wynikającymi a działaniem toksycznym substancji chemicznych; prognozowanie toksyczności (np.: genotoksyczności, rakotwórczości, działania uczulającego) na podstawie budowy chemicznej i wiedzy eksperckiej wykorzystującej system DEREK (*deductive estimation of risk from existing knowledge*); wnioskowanie o toksyczności danej substancji na podstawie podobieństwa jej właściwości fizykochemicznych i strukturalnych do grupy innych substancji o znanej toksyczności, tj. wnioskowanie *read-across* będące podstawą, tzw. podejścia przekrojowego do oceny zagrożeń. Wytyczne dotyczące modeli (Q)SAR są zamieszczone w rozdziale 6. Poradnika REACH: „(Q)SAR i grupowanie chemikaliów”, natomiast informacje na temat sposobu oceny ich ważności na stronie internetowej OECD [www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar; http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r6_en.pdf?vers=20_08_08].

Jedynie w przypadku, gdy wyniki alternatywnych metod oceny toksyczności nie są wystarczające do klasyfikacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego

substancji, celowe jest przeprowadzenie badań w warunkach *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych. Badania muszą być wykonane zgodnie z zasadami, tzw. dobrej praktyki laboratoryjnej, z zastosowaniem metod zgodnych z wytycznymi OECD.

Zintegrowane strategie badań mają charakter wytycznych, a w ich opracowywaniu biorą udział: jednostki administracyjne przygotowujące projekty aktów prawnych, instytuty naukowe i przemysłowe (np. OECD, ECVAM, COLIPA). Zintegrowane strategie badań opracowane dla danego skutku toksycznego są zamieszczone na stronie Europejskiej Agencji ds. Chemikaliów (European Chemical Agency, ECHA) w poradniku dotyczącym wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego w części B: Ocena zagrożenia (Poradnik... 2011). W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 440/2008 (rozporządzenie WE nr 440/2008 ze zm.) ustalającym metody badań, zgodnie z wytycznymi REACH, zintegrowana strategia badań jest określona jako strategia badań sekwencyjnych lub wielopoziomowych i jest zalecana w przypadku badania działania żrącego/drażniącego na skórę i poważnego uszkodzenia oczu/działania drażniącego na oczy.

Zintegrowane strategie badań są już stosowane w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym do oceny bezpieczeństwa produktów wprowadzanych na rynek (Combes, Balls 2011; Sprawozdanie Komisji... 2009).

Zintegrowane strategie badań toksyczności nanomateriałów

Substancje w skali nano mają właściwości fizykochemiczne odmienne od swoich większych odpowiedników („*bulk*”). Charakteryzują się one m.in.: względnie małą masą, dużą powierzchnią właściwą, większym powinowactwem do innych atomów, a także są bardziej reaktywne chemicznie, posiadają większą aktywność katalityczną i zdolność utleniania, inaczej rozpuszczają się w cieczach itp. Odmienne właściwości nanomateriałów wpływają na ich zdolność do wywoływania skutków toksycznych tak dalece, że naukę o ich toksyczności wyodrębniono jako nanotoksykologię (Obersdörster i in. 2005). Tymczasem w wymaganiach dotyczących rejestracji substancji zgodnie z wytycznymi REACH nie uwzględniono w wystarczającym stopniu specyficznych właści-

wości nanomateriałów. W celu wsparcia procesu rejestracyjnego nanomateriałów Komisja Europejska, przy współudziale ECHA oraz europejskich ośrodków naukowych współpracujących w ramach Wspólnego Centrum Badawczego (Joint Research Center, JRC), rozpoczęła w 2009 r. prace nad trzema projektami RIP-oN (REACH Implementation project on nanomaterials), których celem jest uzupełnienie istniejących poradników REACH o informacje, w których zostaną uwzględnione specyficzne wymagania dla nanomateriałów. Projekt RIPoN1 dotyczy identyfikacji substancji, RIPoN2 – wymaganych informacji, RIPoN3 – oceny bezpieczeństwa chemicznego.

W kwietniu 2012 r. ECHA opublikowała poradnik zawierający zalecenia dotyczące informacji wymaganych dla nanomateriałów i oceny bezpieczeństwa chemicznego opracowane w ramach projektu RIPoN2 (*Guidance...* 2012). W poradniku są opisane zintegrowane strategie badań dla takich niektórych właściwości fizykochemicznych nanomateriałów, jak: granulometria, kształt, pole powierzchni, rozpuszczalność (stała dysocjacji, pKa). Poradnik zawiera również przegląd istniejących strategii oceny toksyczności substancji pod kątem ich dostosowania do nanomateriałów. Uznano, że zintegrowane strategie badań opisane w poszczególnych sekcjach poradnika dotyczącego wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego (Poradnik... 2011) mogą być stosowane do oceny zagrożeń dla człowieka powodowanych przez nanomateriały, po wprowadzeniu zmian uwzględniających specyfikę ich działania. Na przykład zintegrowana strategia badań toksyczności dawki powtarzanej wymaga uwzględnienia działania neurotoksycznego i działania na układ endokryny (wydzielania wewnętrznego) oraz sercowonaczyniowy, natomiast toksyczności ostrej – wprowadzenia dodatkowych badań wykonanych na płuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL). Do schematu zintegrowanej strategii badań działania na rozrodczość należy wprowadzić badanie narażenia drogą oddechową. Zmian nie wymagają zintegrowane strategie badań działania: drażniącego/żrącego oraz uczulającego skórę i drogi oddechowe, a także rakotwórczego. Z uwagi na ograniczone i jeszcze niewystarczające dane z badań *in silico* stosowanie zintegrowanych strategii badań musi być naukowo uzasadnione i rozpatrywane indywidualnie w każdym przypadku (Speci-

fic... 2011; Guidance... 2012).

Również w OECD w ramach prac prowadzonych w międzyrządowym programie rozważnego zarządzania substancjami chemicznymi (Inter-organization programme for the sound management of chemicals, IOMC) dokonano przeglądu istniejących metod badań toksyczności pod kątem ich przydatności do oceny nanomateriałów. Uznano, że większość wytycznych jest odpowiednia do oceny skutków zdrowotnych powodowanych przez nanomateriały. Największych zmian wymagają wytyczne OECD dotyczące narażenia inhalacyjnego i toksykokinetyki (adsorption, distribution, metabolism, excretion, ADME), (Raport OECD... 2012). Podstawowym warunkiem w ocenie toksyczności jest uwzględnienie danych dotyczących charakterystyki i właściwości fizykochemicznych specyficznych dla nanomateriałów. W przewodniku do prowadzenia badań nanomateriałów opracowanym przez IOMC określono następujące parametry niezbędne do scharakteryzowania nanomateriałów: skład chemiczny (procent dodatków, procent zanieczyszczeń), metoda produkcji, morfologia powierzchni (kształt, postać krystaliczna, amorficzność), rozmiar, zdolność do agregacji i aglomeracji, rozpuszczalność w wodzie (hydrofilowość/lipofilność), dyspersyjność,

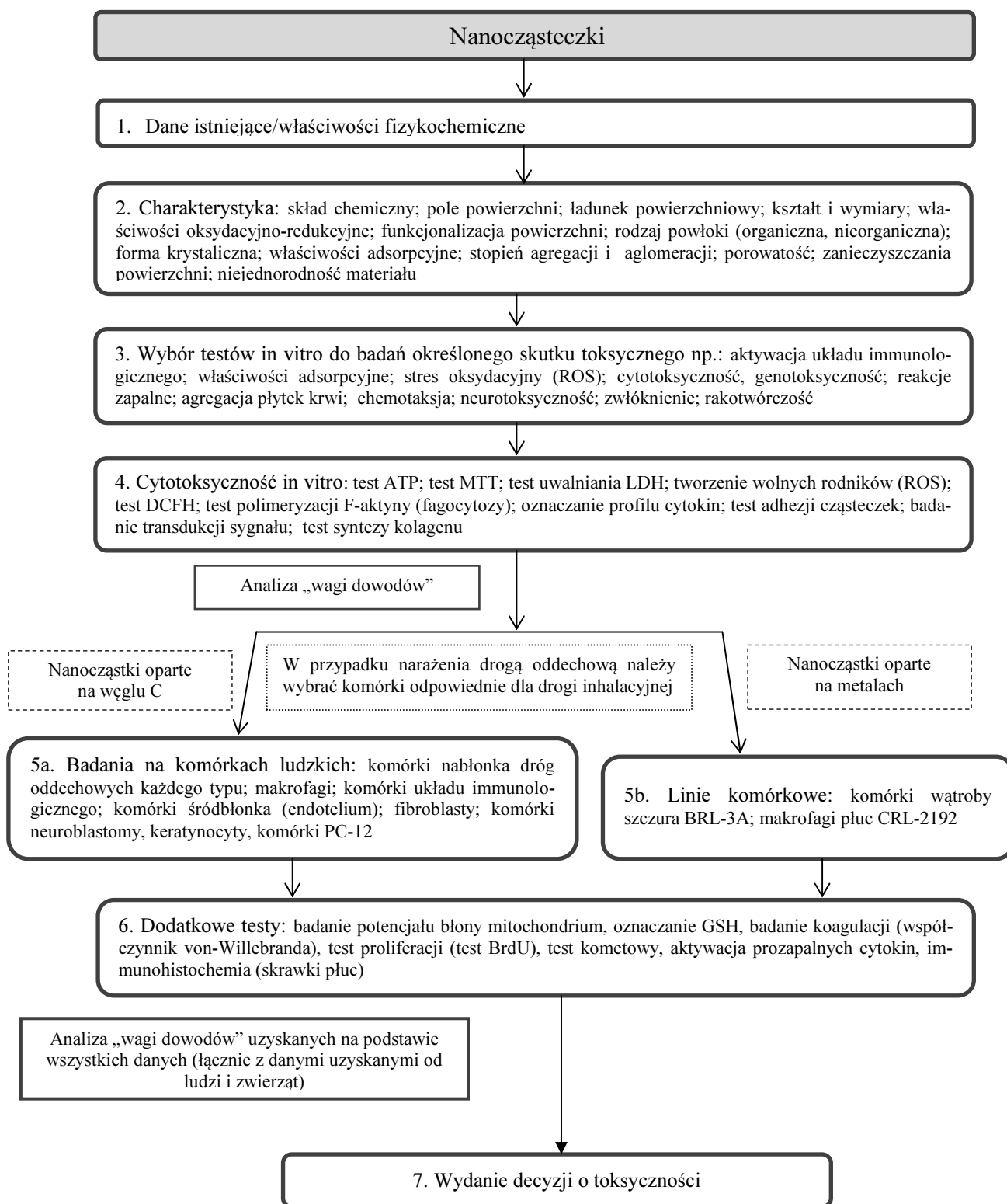
pole powierzchni i ładunek powierzchniowy, reaktywność, potencjał redox, właściwości adsorpcyjne, pylistość, rozkład wielkości cząstek, potencjał zeta (Raport OECD... 2009).

Największym problemem w stosowaniu opracowanych zintegrowanych strategii badań (których podstawą jest wnioskowanie oparte na ciężarze dowodu) jest ograniczona liczba danych dotyczących nanomateriałów wynikających z badań *in silico* (*read-across*, grupowanie substancji, QSAR) i badań *in vivo* oraz praktycznie brak danych dotyczących ludzi (badań epidemiologicznych, opisów przypadków, kontrolowanych badań na ochotnikach). Istotne jest, aby ocenę każdej substancji w formie nano rozpatrywać odrębnie (*case by case*) od oceny przeprowadzanej dla formy macierzystej („*bulk*”), o ile taka istnieje (Guidance... 2012).

W ramach prac prowadzonych przez organizację FRAME są aktualizowane i opracowywane nowe strategie oceny toksyczności, w których są uwzględniane najnowsze osiągnięcia technik *in silico* i metod *in vitro*.

Przykład metody zintegrowanej strategii badań zaproponowanej do oceny toksyczności nanocząstek przedstawiono na rysunku 1.

Zintegrowana strategia badań nanocząsteczek



Rys. 1. Schemat zintegrowanej strategii badań toksyczności nanocząstek. Opracowano na podstawie Combes, Balls (2011, cyt. za Schrand i in., BéruBé i in.). Wyjaśnienie skrótów: ROS – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*); ATP – adenozynotrójfosforan; MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu; LDH – dehydrogenaza mleczanowa; DCFH – 2',7'-dichlorofluoresceina; GSH – zredukowany glutation; BrdU – bromodeoksyurydyna

PODSUMOWANIE

Zintegrowane strategie badań dotyczą: opracowywania, uznawania i prawnego przyjmowania, alternatywnych do badań na zwierzętach metod, w celu oceny bezpieczeństwa substancji chemicznych. Zintegrowane strategie badań w sytuacji intensywnego rozwoju nanotechnologii oraz konieczności pilnej i szybkiej rejestracji substancji chemicznych wprowadzanych do obrotu dają możliwość uzyskania dużej liczby danych do oceny bezpieczeństwa w stosunkowo krótkim czasie, co jest konieczne przy dużej liczbie sub-

stancji. Uważa się, że w przypadku nanocząstek metody alternatywne są szczególnie przydatne do oceny bezpieczeństwa chemicznego (Combes, Balls 2011; Silbergeld i in. 2011).

Metodologia zintegrowanych strategii badań została zaakceptowana jako adekwatne narzędzie w identyfikacji zagrożeń i ocenie ryzyka stwarzanego przez substancje chemiczne (w tym nanomateriały) oraz jako perspektywiczny kierunek w rozwoju toksykologii XXI w. (Berg i in. 2011; De Wever i in. 2012; Silbergeld i in. 2011).

PIŚMIENNICTWO

Aspekty regulacyjne nanomateriałów. Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dnia 24.04.2009 r. w sprawie aspektów regulacyjnych nanomateriałów (2008/2208 (INI). Dz. Urz. UE. 2010/C 184 E/82.

Berg N., De Wever B., Fuchs H.W., Gaca M., Krul C., Roggen E.L. (2011) Toxicology in the 21 st century – working our way towards a visionary reality. *Toxicol. in Vitro* 25 (4), 874–881.

BéruBé K., Aufderheide M., Breheny D., Clothier R., Combes R., Duffin R., Forbes B., Graça M., Liebsch M., Gray A., Hall I., Kelly M., Lethem M., Liebsch M., Merolla L., Morin J.-P., Seagrave J.C., Swartz M.A., Tetley T.D., Umachandran M. (2009) In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME Workshop. *ATLA* 37, 89–141.

Combes R., Grindon C., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J. (2007) Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *ATLA* 35, 267–287.

Combes R.D., Balls M. (2011) Integrated testing strategies for toxicity employing new and existing technologies. *ATLA* 39, 213–225.

De Wever B., Fuchs H.W., Gaca M., Krul C., Mikulowski S., Poth A., Roggen E.L., Vila M.R. (2012) Implementation challenges for designing integrated in vitro testing strategies (ITS) aiming at reducing and replacing animal experimentation. *Toxicol. in Vitro* 26 (3), 526–534.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2007a) An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitisation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 35, 683–697.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2007b) Integrated decision-tree testing strategies for skin corrosion and irritation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 35, 673–682.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2008a) Integrated decision-tree testing strategies for acute systemic toxicity and toxicokinetics with

respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, 45–63.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2008b) An integrated decision-tree testing strategy for repeat dose toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, 93–101.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2008c) An integrated decision-tree testing strategy for eye irritation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, 81–92.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2008d) Integrated decision-tree testing strategies for developmental and reproductive toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, 65–80.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T.D., Roberts D.W., Garrod J.F. (2008e) Integrated decision-tree testing strategies for environmental toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, suppl. 1., 29–42.

Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R7-1 Recommendations for nanomaterials applicable to Chapter R7a – Endpoint specific guidance Reference: ECHA-12-G-03-EN Publ.date: April 2012 [http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/appendix_r7a_nanomaterials_en.pdf].

Jankowska E. (2011) Nanoobiekty w środowisku pracy. *PiMOŚP*, 4 (70), 7–21.

Kinsner-Ovaskainen A. i in. (2009). Overcoming barriers to validation of non-animal partial replacement methods/integrated testing strategies. The Report of an EPAA-ECVAM Workshop. *ATLA*, 37, 437–443.

Nanomaterials in REACH. Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH). Doc. CA/59/2008 rev. 1 [<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/nanomaterials.pdf>].

- Obersdörster G., Obersdörster E., Obersdörster J.* (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp.* 113, 823–839.
- Poradnik dotyczący wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego. Część B: Ocena zagrożenia. Wersja 2.1. grudzień 2011. [http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/information_requirements_part_b_pl.pdf].
- Poradnik praktyczny nr 1. Jak zgłaszać dane in vitro. ECHA, 2010. [http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_in_vitro_data_pl.pdf].
- Practical guide 2: How to report weight of evidence, 2010. [http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_weight_of_evidence_en.pdf].
- Raport OECD nr 35. Inhalation toxicity testing: expert meeting on potential revisions to OECD test guidelines and guidance document. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, ENV/JM/MONO(2012)14.
- Rapport OECD nr 25. Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD Sponsorship Programme. List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the OECD testing programme. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials ENV/JM/MONO(2009)20/REV, OECD 2010 [[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=en/vj/mono\(2009\)20/rev&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=en/vj/mono(2009)20/rev&doclanguage=en)].
- Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18.12.2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE (Dz. Urz. WE, L 136/3 z dnia 29.05.2007 r. ze zm.).
- Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1152/2010 z dnia 8.12.2010 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) [Tekst mający znaczenie dla EOG]. Dz. Urz. UE. L 324/13.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 z dnia 30.05.2008 r. ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) [tekst mający znaczenie dla EOG]. Dz. Urz. UE L142/1. ze zm. [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:EN:PDF>].
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz. Urz. UE nr L 353 z dnia 31.12.2008 r.).
- Schrand A.M., Dai L., Schlager J.J., Hussain S.M.* (2011) Toxicity testing of nanomaterials. [W:] *New technologies in toxicity testing* [Red.] M. Balls, R. Combes, N. Bhogal. Austin, TX, USA: Landes Bioscience (in press).
- Silbergeld E.K., Contreras E.Q., Hartund T., Hirsh C., Hogberg H., Jachak A.C., Jordan W., Landsiedel R., Morris A.P., Pounds J.G., de Vizcaya Riuz A., Shvedova A., Tanguay R., Tatarazako N., van Vliet E., Walker N.J., Wiesner M., Wilcox N., Zurlo J.* (2011) ^t Workshop Report: Nanotoxicology: The “End of the beginning” – Signs on the roadmap to a strategy for assuring the safe application and use of nanomaterials ALTEX, 28 (3), 136–241 [<http://www.altex.ch/en/index.html?id=50&iid=127&aid=5>].
- Specific advice on fulfilling information requirements for nanomaterials under REACH (RIP-oN 2). Final Project Report., RNC/RIP-oN2/FPR/1/FINAL, 2011 [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/report_rip_on2.pdf].
- Sprawozdanie Komisji dla Parlamentu Europejskiego i Rady nr 52011DC0558. Sprawozdanie na temat opracowywania, uznawania i prawnego przyjmowania metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach w branży produktów kosmetycznych (2009) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2011:0558:FIN:PL:HTML>].
- Vermeire T.G., Aldenberg T., Dang Z., Janer G.* (2007) Selected integrated testing strategies (ITS) for the risk assessment of chemicals, RIVMreport 601050001/2007.
- Wytyczne OECD dotyczące badania chemikaliów. [http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html].