

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA MERVIČ

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA MERVIČ

**VREDNOTENJE DRAŽILNEGA IN SENZIBILIZACIJSKEGA
POTENCIALA IN SILICO, IZBRANIH KOZMETIČNIH
SESTAVIN STRUKTURNO SORODNIH CIMETNI KISLINI**

**IN SILICO EVALUATION OF IRRITATION AND
SENSITIZATION POTENTIAL OF SELECTED COSMETIC
INGREDIENTS, STRUCTURALLY RELATED TO CINNAMIC
ACID**

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za strpnost, podporo in strokovno mnenje pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala družinskim članom, prijateljicam in londonski družini za spodbudo in razumevanje v času pisanja naloge.

Ko hodiš, pojdi zmeraj do konca.

Spomladi do rožne cvetice,

poleti do zrele pšenice,

jeseni do polne police,

pozimi do snežne kraljice,

v knjigi do zadnje vrstice,

v življenju do prave resnice.

A če ne prideš ne prvič ne drugič

do krova in pravega krova,

poskusi vnovič in zopet in znova.

(Tone Pavček)

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Kristina Mervič

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos

Članica komisije: doc. dr. Martina Gobec

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 METODE <i>IN SILICO</i>	1
1.1.1 SAR in QSAR.....	2
1.1.2 SICRET.....	3
1.2 DRAŽENJE, SENZIBILIZACIJA IN KOROZIJA KOŽE.....	4
1.2.1 DRAŽENJE.....	4
1.2.2 KOROZIJA	5
1.2.3 SENZIBILIZACIJA.....	7
1.3 CIMETNA KISLINA IN NJENI DERIVATI	13
1.3.1 VLOGA V KOZMETIČNIH IZDELKIH	13
2 NAMEN DELA	14
3 METODE IN MATERIALI	15
3.1 IZBRANI DERIVATI CIMETNE KISLINE	15
3.1.1 DIŠAVE.....	15
3.1.2 UV-FILTRI	24
3.2 UPORABLJENI RAČUNANIŠKI PROGRAMI ZA NAPOVED DRAŽILNEGA IN SENZIBILIZACIJSKEGA POTENCIALA.....	26
3.2.1 VEGA	26
3.2.2 TOXTREE.....	28
3.2.3 DEREK NEXUS.....	28
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1 Amil cinamal	30
4.1.1 Michaelova adicija (angl. <i>Michael addition</i>)	32
4.2 Benzil cinamat.....	33
4.3 Cinamal.....	38
4.3.1 SN ₂	43
4.4 Cinamilni alkohol	44

4.5	Kumarin	47
4.6	Evgenol in izoevgenol.....	50
4.7	Heksil cinamal.....	54
4.8	Etilheksil metoksicinamat in izoamil <i>p</i> - metoksicinamat	57
5	SKLEP	61
6	LITERATURA	63

POVZETEK

Pogosta uporaba kozmetičnih izdelkov prinese s seboj tudi tveganje za pojav različnih toksičnih učinkov. Istočasno se povečuje ozaveščenost o pravicah živali z vidika njihove zlorabe, predvsem za namene raznih testiranj. Ugotavljanje toksikoloških parametrov kozmetičnih izdelkov oziroma njihovih sestavin je temeljilo predvsem na testih *in vivo*, izvedenih na živalih in ljudeh. Zaradi evropske direktive, ki je prišla v veljavo leta 2009 in prepoveduje prodajo kozmetičnih izdelkov, ki so bili testirani na živalih, se je začelo pospešeno iskanje alternativnih testnih metod. Poleg testov *in vitro* so se začele razvijati tudi testne metode *in silico*. Pri teh gre za računalniške programe, ki temeljijo na podatkovnih bazah in podajajo napovedi različnih toksičnih učinkov, predvsem ob predpostavki, da imajo spojine s podobno strukturo podobno biološko aktivnost. Derivati cimetne kisline so bodisi zaradi njihovega značilnega vonja ali sposobnosti zaščite pred ultravijoličnim sevanjem pogosto sestavine kozmetičnih izdelkov. V nalogi smo obravnavali dišave amil cinamal, benzil cinamat, heksil cinamal, evgenol, izoevgenol, kumarin, cinamal in cinamilni alkohol ter ultravijolična filtra etilheksil metoksicinamat in izoamil *p*-metoksicinamat, saj smo tem spojinam lahko vsakodnevno izpostavljeni. Z izbranimi računalniškimi programi ToxTree, Derek Nexus in VegaNIC smo desetim derivatom cimetne kisline napovedali dražilni oziroma korozivni in senzibilizacijski potencial. S programoma ToxTree in Derek Nexus smo napovedali tako dražilni kot senzibilizacijski potencial, medtem ko smo s programom VegaNIC proučevali zgolj senzibilizacijski potencial spojin. Podatke, pridobljene z aplikacijami *in silico*, smo nato primerjali z rezultati že objavljenih študij *in vivo* ter *in vitro*. Rezultati programov ToxTree in Derek Nexus o dražilnem potencialu za spojine se pri devetih od desetih testiranih spojin razlikujejo. Pri oceni dražilne narave amil cinamala, izoevgenola, evgenola, heksil cinamala in kumarina si zaradi pomanjkanja že obstoječih literaturnih podatkov iz študij *in vivo* ter *in vitro* z napovedmi programov ToxTree in Derek Nexus nismo mogli pomagati, saj je njuna uporabnost v tem primeru omejena. Cinamalu sta obe aplikaciji pripisali dražilni potencial, kar so podprli tudi že znani podatki predhodnih raziskav. Derek Nexus ostalim spojinam, glede na podatke ostalih študij, ni pravilno pripisal dražilnega delovanja, medtem ko je ToxTree podal nasprotno napoved. Glede na vse podatke smo ocenili, da ima program Derek Nexus večjo napovedno moč kot ToxTree. Napoved senzibilizacijskega potenciala spojin je bila s strani vseh treh programov, torej Derek Nexus, ToxTree in VegaNIC, precej složna. Ustreznost njihovih napovedi smo zaradi večje količine literaturnih podatkov o senzibilizacijski naravi obravnavanih spojin tudi lažje ovrednotili.

Programi imajo dobro napovedno moč za predvidevanje senzibilizacije. Metode *in silico* so izjemen korak k zmanjšanju števila študij *in vivo* na živalih, vendar v danem trenutku še zdaleč niso na nivoju sposobnosti samostojne napovedi toksikoloških parametrov kemikalij.

ABSTRACT

Highly frequent use of cosmetic products brings along risk of developing different toxicological effects. Simultaneously, the awareness concerning animal rights has been brought forward, specifically with regard to their misuse during experimental procedures. The determination of toxicological effects of cosmetic products or their ingredients was based mainly on *in vivo* studies on animals and humans. Because of the European directive, which was legally implemented in 2009 and prohibits the sale of cosmetic products tested on animals, the search for alternative testing methods has begun, including the development of both *in vitro* as well as *in silico* testing methods. *In silico* methods are computer programmes, which are based on databases and provide predictions of different toxicological effects based mostly on the assumption that compounds with similar structure also have similar biological activity. Derivates of cinnamic acid are often a part of formulation of cosmetic products due to their specific scent or their ability to protect from UV radiation. In the scope of this thesis we examined certain toxicological aspects of amyl cinnamal, benzyl cinnamate, hexyl cinnamal, eugenol, isoeugeneol, coumarin, cinnamal and cinnamyl alcohol which are fragrance and two UV-filters, ethyl hexyl methoxycinnamate and isoamyl *p*-methoxy cinnamate, as we are likely to be exposed to them on a daily basis. Using the selected software applications, namely ToxTree, Derek Nexus and VegaNIC, we predicted irritation and sensitization potential of ten cinnamic acid derivates. With ToxTree and Derek Nexus we predicted both, irritation and sensitization, whereas we could only predict sensitization with VegaNIC programme. We then compared information obtained using *in silico* methodology with the already published results from *in vivo* and *in vitro* studies. The results for irritation potential from ToxTree and Derek Nexus contradicted each other in nine out of ten tested compounds. Evaluation of irritation potential of amyl cinnamal, isoeugenol, eugenol, hexyl cinnamal and coumarin is impossible, due to the lack of already existing literature data from *in vivo* and *in vitro* tests and the contradictory results obtained from ToxTree and Derek Nexus as the reliability of their predictions is limited. Both programmes characterised cinnamal as an

irritant, a finding that was also corroborated with previously reported studies. Derek Nexus did not characterise other compounds as irritants, a finding which is also substantiated by previous research. However, ToxTree did characterise those compounds as irritants. With regard to all collected data on irritation potential, Derek Nexus was found to have greater predictive power than ToxTree. Prediction of sensitisation potential was consistent across all three programmes, Derek Nexus, ToxTree and VegaNIC. The reliability of the obtained results was much easier to evaluate due to a large amount of literature data on sensitisation of the aforementioned compounds. The programmes all have good predictive power over sensitisation potential. *In silico* methods are a big step towards reducing reliance on data from *in vivo* studies conducted on animals, but currently they are not capable of producing fully robust predictions of the all-round toxicological effects of chemicals. *In silico* methods do, however, appear to have greater reliability in their predictions of sensitisation as compared to irritation potential.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADI	Indeks aplikacijske domene (angl. <i>Applicability Domain index</i>)
AOP	Potek neželenega/neugodnega končnega izida (angl. <i>Adverse outcome pathway</i>).
CAESAR	Računalniško podprto ovrednotenje skladnosti industrijskih kemikalij s predpisi (angl. <i>Computer assisted evaluation of industrial chemical substances according to regulations</i>)
COLIPA	Evropsko združenje proizvajalcev kozmetičnih izdelkov, izdelkov za osebno nego in dišav (angl. <i>European cosmetic, toiletry and perfumery association</i>)
DC	Dendritične celice (angl. <i>Dendritic cells</i>)
DEP	Dietil ftalat (angl. <i>Diethyl phthalate</i>)
DMF	Dimetilformamid (angl. <i>Dimethylformamide</i>)
DPRA	Test direktne peptidne reaktivnosti (angl. <i>Direct peptide reactivity assay</i>)
ECHA	Evropska agencija za kemikalije (angl. <i>European Chemicals Agency</i>)
ECVAM	Evropski center za validacijo alternativnih metod (angl. <i>European centre for the validation of alternative methods</i>)
EURL	Referenčni laboratorij Evropske unije (angl. <i>European union reference laboratory</i>)
FCA	Freundov popolni adjuvans (angl. <i>Freund's complete adjuvant</i>)
FDA	Administracija za hrano in zdravila (angl. <i>Food and drug administration</i>)
GPMT	Maksimizacijski test na morskih prašičkih (angl. <i>Guinea pig maximization test</i>)
h-CLAT	Test aktivacije človeških celic (angl. <i>Human cell line activation test</i>)
HMT	Človeški maksimizacijski test (angl. <i>Human maximization test</i>)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
HRIPT	Krpični test (angl. <i>Human Repeat Insult Patch test</i>)
ICDGR	Mednarodna raziskovalna skupina za kontaktni dermatitis (angl. <i>International Contact Dermatitis Research Group</i>)
IFRA	Mednarodno združenje za standarde dišav (angl. <i>International fragrance association standard</i>)

IUPAC	Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo (angl. <i>International union of pure and applied chemistry</i>)
LC	Langerhansove celice (angl. <i>Langerhans cells</i>)
LD50	Smrtni odmerek (angl. <i>Median lethal dose</i>)
LLNA	Analiza lokalnih limfnih vozlov (angl. <i>Local lymph node assay</i>)
LOEL	Najnižja koncentracija, pri kateri pride do učinka (angl. <i>Lowest observed effect level</i>)
MCA	Michaelov tip adicije (angl. <i>Michael addition</i>)
MW	Molekulska masa (angl. <i>Molecular weight</i>)
NESIL	Koncentracija, pri kateri indukcija senzibilizacije ni pričakovana (angl. <i>No expected sensitization induction level</i>)
NOEL	Najvišja koncentracija, pri kateri še ne pride do učinka (angl. <i>No-observed-effect level</i>)
OECD	Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj (angl. <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>)
OMC	Oktinoksat/etilheksil metoksicinamat/(<i>RS</i>)-2-etilheksil (2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enoat
OTC	Zdravila, dostopna brez recepta (angl. <i>Over the counter</i>)
PII	Primarni dražilni indeks (angl. <i>Primary irritation index</i>)
QRA	Kvantitativna ocena nevarnosti (angl. <i>Quantitative risk assessment</i>)
QSAR	Kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem (angl. <i>Quantitative structure-activity relationship</i>)
REACH	Registracija, evaluacija, avtorizacija in restrikcija kemikalij (angl. <i>Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals</i>)
RhE	Rekonstruiran človeški epidermis (angl. <i>Reconstructed human epidermis</i>)
RIFM	Raziskovalni inštitut za dišave (angl. <i>The research institute for fragrance materials</i>)
SAR	Odnos med strukturo in delovanjem (angl. <i>Structure-activity relationship</i>)
SCC	Znanstveni odbor za kozmetologijo (angl. <i>Scientific committee on cosmetology</i>)
SCCS	Znanstveni odbor za varnost potrošnikov (angl. <i>Scientific committee on consumer safety</i>)
SI	Stimulacijski indeks (angl. <i>Stimulation index</i>)

SICRET	Orodje za oceno dražilnega in korozivnega potenciala spojin (angl. <i>Skin irritation corrosion rules estimation tool</i>)
SMILES	Vrstični sistem znakov za kodiranje molekulskih struktur (angl. <i>Simplified molecular-input line-entry system</i>)
S _N 2	Nukleofilna alifatska substitucija drugega reda (angl. <i>Second-order nucleophilic substitution</i>)
S _N Ar	Nukleofilna aromatska substitucija (angl. <i>Aromatic nucleophilic substitution</i>)
TER	Transkutana električna odpornost (angl. <i>Transcutaneous electrical resistance</i>)
T.E.S.T.	Programska oprema za določanje toksičnosti (angl. <i>The toxicity estimation software tool</i>)
WoE	Teža dokazov (angl. <i>Weight of evidence</i>)

1 UVOD

1.1 METODE *IN SILICO*

Z novo regulacijo, poimenovano REACH (registracija, evaluacija, avtorizacija in restrikcija kemikalij), ki za evropski trg velja od leta 2006, je jamčenje varnosti kemikalij postalo odgovornost industrije. Glavni cilj regulacije je zagotavljanje visokega nivoja varnosti človeškega zdravja in okolja. Osrednje točke regulacije REACH so opredelitve fizikalno-kemijskih lastnosti, vpliva na okolje, toksikoloških lastnosti in ekotoksikoloških lastnosti. Zakon narekuje, da morajo biti vse kemikalije, proizvedene ali uvožene v Evropo v količinah nad eno tono, pred vstopom na evropski trg registrirane pri Evropski agenciji za kemikalije (ECHA). S sprejetjem regulacije REACH je posledično prišlo do večje obremenitve testiranja na živalih in višjih stroškov registracijskega procesa. (1) Poleg tega so s kozmetično direktivo Evropske unije (EU) leta 2009 prepovedali kakršnokoli trženje kozmetičnih sestavin, ki so testirane na živalih, z namenom ugotavljanja učinka na človeško zdravje. Izjemoma so do leta 2013 dovoljevali testiranje reproduktivne toksičnosti, toksikokinetike, razvojne toksičnosti in toksičnosti ponovljivih odmerkov na živalih, kar je zajemalo tudi študijo senzibilizacije kože in karcinogenosti. Strožje zahteve so klicale po načinih za zmanjšanje testiranja na živalih, kar so zapolnili s tako imenovanimi »non-testing« metodami, kamor spadajo tudi metode *in silico*. (2) Izraz *in silico* v grobem pomeni »nekaj, kar se izvaja na računalniku oziroma z računalniško stimulacijo«. Gre za široko področje, ki se v zadnjih letih aktivno razvija. Vse »non-testing« metode temeljijo na podobnem principu/predpostavki, in sicer da imajo strukturno podobne spojine tudi podobno biološko aktivnost. K »non-testing« metodam je ECHA v dokumentu »Guidance on information requirements and chemical safety assessment« tako uvrstila podatkovne baze (»read-across« in formacija kemijskih kategorij), ekspertne sisteme in različne vrste metod (Q)SAR (kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem; angl. (*quantitative*) *structure-activity relationship*). (3, 4) Kritična uporaba in razvoj novih modelov na osnovi metod *in silico* sta v današnjem času ključna za pridobitev podatkov, potrebnih za sprejetje s strani regulatornih organov. Drugo alternativno metodo *in vivo* določanju biološkega in/ali toksikološkega potenciala molekul predstavljajo testi *in vitro*. (1) Pojem *in vitro* dobesedno pomeni »v steklu«, nanaša pa se na eksperimentalne tehnike, ki se izvajajo v kontroliranem okolju, na primer petrijevkah, in temeljijo na uporabi tkiv ali celic, ki jih izpostavijo kemikalijam z namenom ugotovitve toksičnih učinkov. Vse pogosteje se za ta namen uporabljajo človeške celice, in sicer zaradi boljše korelacije in predvidevanja

možnih učinkov na ljudi. (5) Testi *in vivo* so sicer v primerjavi s testi *in silico* ter *in vitro* občutno dražji, časovno zamudni in etično vprašljivi, a so veliko zanesljivejši. (1)

1.1.1 SAR in QSAR

(Q)SAR je skupna kratica, ki združuje tako metode SAR kot QSAR. Modele (Q)SAR lahko delimo na tri oblike: (i) teoretični modeli QSAR, ki so osnovani na podlagi fizikalnih principov; (ii) statistični oziroma empirični modeli SAR ali QSAR, ki so zasnovani z apliciranjem statističnih metod na preiskovane kemikalije; (iii) modeli (Q)SAR, ki temeljijo na odločitvah na podlagi izkušenj ali mnenj strokovnjakov. SAR temelji na odnosu med strukturnimi elementi, prisotnimi v spojinah, in prisotnostjo oziroma odsotnostjo dotične biološke aktivnosti ali lastnosti. Pri modelu SAR gre le za kvalitativno oceno odnosa med strukturo in aktivnostjo snovi, medtem ko je QSAR matematični model, ki na osnovi kvantitativnih parametrov, izpeljanih iz kemijske strukture, poda kvantitativno oceno lastnosti ali biološke aktivnosti. Teoretični modeli (Q)SAR se uporabljajo za napovedovanje fizikalno-kemijskih in bioloških (toksikoloških) lastnosti spojin/molekul ter njihove razgradnje v okolju. Njihove napovedi temeljijo na poznavanju kemijske strukture molekule. Modeli (Q)SAR so sestavljeni iz treh glavnih elementov, in sicer lastnosti spojine, na kateri model temelji (opisni ali strukturni fragment), lastnosti oziroma učinka, ki ga model napoveduje (odziv; končna opazovana točka), in algoritma, ki prevede podstrukture ali deskriptorje v končno točko oziroma odziv, ki nas zanima. Da bi se lahko modeli uporabljali za regulatorno vrednotenje/ocenjevanje kemikalij, so pri Organizaciji za ekonomsko sodelovanje in razvoj (OECD; angl. *Organization for Economic Cooperation and Development*) in drugih internacionalnih regulatornih programih določili, da morajo biti najprej znanstveno utemeljeni oziroma validirani. V Evropi je koncept »znanstveno utemeljenega modela« del zakonskega zapisa uredbe REACH. Princip OECD za lažje obravnavanje primernosti modelov (Q)SAR za regulatorne namene zahteva opremljenost modelov (Q)SAR z naslednjimi informacijami:

- a) definirana končna točka,
- b) nedvoumen algoritem,
- c) definirana domena uporabnosti,
- d) primerna stopnja (mera) stabilnosti (ponovljivosti), napovedljivosti in ujemanja,
- e) če je možno, mehanska interpretacija (knjiga). (6)

Modelu QSAR pa je lahko v pomoč tudi druga metoda *in silico*, ki ji pravimo metoda »read-across«. Ta zapolni manjkajoče informacije določene kemikalije s podatkovnimi vrzeli, ki ji pravimo tarčna snov, z eksperimentalnimi podatki, dostopnimi za snovi, ki so kemijsko sorodne (podobne glede na strukturo) ali imajo podoben mehanizem delovanja kot tarčna spojina. Slednjim pravimo tudi »izvirne« sestavine. Napoved izvira bodisi iz projiciranja lastnosti izvorne sestavine na tarčno bodisi z identifikacijo trenda znotraj posamezne kategorije kemikalij. S pomočjo metode »read-across« lahko napovemo tako kvalitativne kot kvantitativne končne točke. Kljub vsem smernicam in priporočilom pa včasih tudi najboljši izmed modelov QSAR ne ustrezajo vsem zahtevam. Pomembno je, da modeli stojijo na trdnih temeljih in niso zgolj rezultat teoretičnega špekuliranja.

1.1.2 SICRET

SICRET (orodje za oceno dražilnega in korozivnega potenciala spojin; angl. *Skin irritation corrosion rules estimation tool*) je orodje, ki so ga razvili z namenom lažjega predvidevanja dražilnega in korozivnega potenciala spojin. Ustvarili so ga z namenom dopolnjevanja že obstoječih strategij OECD za napovedovanje dražilnega potenciala ali potenciala za dermalno korozijo. SICRET temelji na treh stopnjah. Najprej se prek ugotovljenih/izmerjenih fizikalno-kemijskih lastnosti identificirajo kemikalije, ki nimajo dražilnega ali korozivnega potenciala na koži. Fizikalno-kemijske mejne vrednosti so določili na podlagi serije 1833 spojin, pri čemer so upoštevali molekulsko maso, temperaturo tališča, površinsko napetost, parni tlak, hidrofilitnost, lipofilitnost in porazdelitveni koeficient oktanol/voda. Klasifikacijo in označevanje so poenostavili tako, da so aplikacijske domene omejitev sovpadale z evropskimi fazami tveganja za kemikalije, ki so klasificirane kot dermalno dražilne oziroma korozivne. Te faze so naslednje:

1. R 34 – povzročča opekline (dermalna korozija, povzročena po 4 urah stika s kožo),
2. R 35 – povzročča hude opekline (dermalna korozija, povzročena po 3 minutah stika s kožo),
3. R 38 – dermalna iritacija (draženje kože, povzročeno po 4 urah stika s kožo).

V primeru, da na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti kemikalije ne dosežejo predpisanih mej za uvrstitev k nedražilnim oziroma nekorozivskim spojinam, pa se uporabijo strukturni alarmi. Z njimi določimo kemikalijo, ki deluje dražilno ali korozivno. K strukturnim alarmom spadajo različne funkcionalne skupine, na primer anhidridi, izocianati, hidrazini, aziridini, izotiocianati, alifatski in α,β -nenasičeni aldehidi, kinoni, ki se prek tautomerije pretvorijo do

hidrokinonov, ter haloalkilni estri, ki dražijo kožo prek ekstrakcije lipidov. Pravila za identifikacijo snovi s potencialom za draženje kože ali dermalno korozijsko so razvili s pomočjo literaturnih virov. V izogib kakršnimkoli dvoumnostim v povezavi s strukturnimi alarmi so morali uvesti tudi standardizirano poimenovanje. Kemikalijo brez prisotnih strukturnih alarmov, ki bi nakazovali potencial za draženje ali korozijsko, se nato dodatno testira s testi *in vitro*. V primeru, da so testi *in vitro* za korozijsko ali draženje kože negativni, se ti podatki uporabijo pri izdelavi novih mejnih intervalov fizikalno-kemijskih lastnosti za prepoznavanje snovi, ki nimajo dražilnega ali korozivnega potenciala. V obratnem primeru, torej v primeru pozitivnega izida testiranja *in vitro*, pa se dobljeni podatki vključijo v razvoj seznama novih strukturnih alarmov, ki jih uporabimo za identifikacijo spojin z dražilnim potencialom oziroma potencialom za dermalno korozijsko. Testiranja *in vitro* uporabljamo kot nekakšno varno mrežo za ugotavljanje novih strukturnih alarmov za spojine s potencialom za draženje kože in fizikalno-kemijskih lastnosti za spojine, ki nimajo dražilnega potenciala. (1)

1.2 DRAŽENJE, SENZIBILIZACIJA IN KOROZIJA KOŽE

Koža kot eden izmed največjih in zunanjemu svetu najbolj izpostavljenih organov igra izredno pomembno vlogo v našem telesu. Opravlja številne funkcije, kot so uravnavanje telesne temperature, zaščita pred izgubo vode ali vdorom mikroorganizmov, organ za dotik (mrzlo, toplo) itd. Vse to pripomore k ohranjanju homeostaze našega telesa. Ena izmed njenih pglavitnih nalog je zagotovo zaščita pred potencialno škodljivimi vplivi iz okolja. Sem uvrščamo antigene, mikroorganizme, toksine, ultravijolično (UV) sevanje in majhne delce, ki so sposobni penetrirati skozi njo. Poleg tega pa kožo dnevno izpostavljamo številnim kemikalijam bodisi prek uporabe različnih potrošniških izdelkov, kot je kozmetika, ali prek izpostavitve na delovnem mestu. Lokalna izpostavitve kemikalijam lahko vodi do draženja, korozijske ali senzibilizacije kože.

1.2.1 DRAŽENJE

Draženje kože je reverzibilen proces. Na mestu stika kože z dražilno snovjo pride do lokalnega vnetja, ki ga sproži primarni, nespecifični imunski odziv. (7) Po definiciji OECD je draženje kože produkcija reverzibilne poškodbe na koži do 4 ure po aplikaciji testne substance na kožo. Dražilne snovi delimo na dve kategoriji. Prve so kumulativne, ki povzročijo draženje kože zgolj po večkratnem stiku kože, in to vedno na istem predelu, druge pa so akutne dražilne snovi, ki vzbudijo vnetni odziv že po prvem stiku s kožo. (8) Značilni mehanizmi za nastanek draženja so naslednji:

- a) reakcija s proteini v koži in interakcije z lipidi v poroženeli plasti (*stratum corneum*) (površinsko aktivne snovi s površinsko napetostjo, nižjo od 50 nm/m, pri skoraj nasičenih vodnih raztopinah pri sobni temperaturi),
- b) raztapljanje kožne maščobe in razpad kože (molekule z nizko molekulsko maso $MW < 200$ in $\log P > 2$),
- c) penetracija skozi poroženelo plast (anionske ali površinsko neaktivne organske spojine s primernimi hidrofilnimi in lipofilnimi lastnostmi),
- d) izzvan citotoksični odziv v povrhnjici ali usnjici, pri čemer obseg citotoksičnega odziva odloča, ali gre za draženje ali korozijo. (9)

Zaradi velike dnevne izpostavljenosti številnim snovem je testiranje potencialnih dražilnih snovi izredno pomembno za zagotavljanje varnosti. Trenutno so mednarodno sprejete tako testne metode *in vitro* kot *in vivo* za določanje kožnega draženja. Klasična metoda je Draizov test *in vivo*, ki se izvaja na kuncih. Ta tip testov, torej testov na živalih, je od leta 2009 dovoljen zgolj za zdravilne učinkovine in kemikalije, ne pa za kozmetične sestavine. Vse validirane testne metode *in vitro* (validacija s strani Evropskega centra za validacijo alternativnih metod (ECVAM; angl. *European centre for the validation of alternative methods*)) so osnovane na tehnologiji rekonstruiranega človeškega epidermisa RhE, pri kateri se uporabljajo normalni človeški keratinociti, ki delujejo kot bariera pred zunanjimi vplivi. Potrjene metode *in vitro*, ki so že v uporabi, so Episkin™, Epiderm™ in SkinEthic™. (7) Draženje pa lahko določamo tudi s krpičnimi testi. (8)

1.2.2 KOROZIJA

Korozija se od draženja razlikuje po obsegu povzročene škode na koži. Korozija kože je namreč ireverzibilna poškodba kožnega tkiva na mestu stika, pri čemer se poškodujeta tako povrhnjica kot usnjica. Korozijo spremljajo krvavenje, rane, razjede, kasneje pa se na mestu lahko pojavijo razbarvana koža in brazgotine. (8) Značilni mehanizmi nastanka korozije so naslednji:

- a) erozija poroženele plasti kot posledica vpliva močne baze ali kisline (je irelevantna, saj nastane pri ekstremno visokih ali nizkih vrednostih pH),
- b) vezava na komponente kože v poroženeli plasti,
- c) penetracija skozi poroženelo plast (anionske ali površinsko neaktivne organske spojine s primernimi hidrofilnimi in lipofilnimi lastnostmi),
- d) izzvan citotoksični odziv v povrhnjici ali usnjici, pri čemer obseg citotoksičnega odziva odloča ali gre za iritacijo ali draženje. (9)

Prav tako kot pri draženju kože se tudi dermalna korozija testira z Draizovim testom *in vivo*, ki se izvaja na kuncih. Testiranje *in vitro* pa poleg rekonstruiranih človeških kožnih modelov zajema tudi teste transkutane električne odpornosti (TER; angl. *Transcutaneous electrical resistance*) in metode testiranja CORROSITEX. (8)

1.2.2.1 Draizov test

Draizova metoda se uporablja za testiranje potenciala določenih snovi za draženje in korozijo kože. Raziskava poteka tako, da na pristriženo kožo kunca nanesejo točno določeno količino snovi, ki jo prekrijejo s semiokluzivno prevezo. Če gre za suhe snovi, morajo biti te navlažene, tekoče pa aplicirajo brez predhodne priprave. 4 ure po nanosu testno snov odstranijo s površine kože in nato opazujejo obseg eritema in/ali edema, kar ocenijo po 60 minutah ter 24, 48 in 72 urah po odstranitvi snovi. V primeru, da so posledice še vedno prisotne po 72 urah, živali opazujemo še 14 dni za oceno reverzibilnosti, če izginejo prej kot v 2 tednih, pa takrat tudi zaključimo eksperiment. (10) Draizov model uporablja točkovni sistem za izračun primarnega dražilnega indeksa (PII; angl. *Primary irritation index*), ki temelji na obsegu eritema in edema na vseh področjih, kamor smo nanесли testno snov. Vsota povprečnih vrednosti eritema in edema nam poda končno vrednost PII, s čimer klasificiramo snovi glede na naslednjo lestvico:

- $x < 2 \rightarrow$ nedražilna snov,
- $2 < x < 5 \rightarrow$ srednje dražilna snov,
- $x > 5 \rightarrow$ močno dražilna snov. (11)

Metodo so leta 2002 nadgradili, predvsem z vidika zmanjšanja števila uporabljenih živali in obsega bolečine, ki jo doživljajo/čutijo posamezne živali. Priporočili so določeno zaporedje testov z namenom pridobitve čim večje količine informacij in posledično v izogib nepotrebnih testiranj. Za snovi, ki imajo eno izmed naslednjih lastnosti:

- a) visoka dermalna toksičnost,
- b) znane dražilne ali korozijske lastnosti,
- c) velika kemijska reaktivnost, na primer $\text{pH} \leq 2$ ali $\text{pH} \geq 11,5$,
- d) SAR, ki nakazuje podobnost z znanimi dermalnimi dražilnimi snovmi,
- e) podatki iz testov *in vitro* ali *ex vivo*, ki izkazujejo potencial za hudo draženje ali korozijo,

nadaljnji testi niso potrebni. V primeru, da navedeni podatki niso na voljo, izvedejo opisan test najprej na enem kuncu, nato pa odvisno od rezultatov nadaljujejo študijo v dveh smereh:

1. rezultati nakazujejo, da ima snov koroziven potencial → nadaljnji testi niso potrebni,
2. v nasprotnem primeru morajo izvesti test še na eni ali dveh dodatnih živalih.

1.2.2.2 Krpični test

Krpične teste so v diagnostične namene začeli uporabljati že v poznem 19. stoletju in se, sicer nekoliko spremenjeni in posodobljeni, pogosto uporabljajo še danes, najpogosteje prav za identifikacijo alergijskega kontaktnega dermatitisa in dražilnega potenciala kemikalij. (12) Velika prednost človeških modelov za testiranje draženja in senzibilizacije pred testi na živalih oziroma testi *in vitro* je v tem, da po testiranju ni treba izvajati ekstrapolacije podatkov, s čimer je omogočena lažja in boljša interpretacija rezultatov. Poleg tega so zahtevana področja nanosa testne snovi majhna, zato lahko hkrati testiramo bodisi različne snovi bodisi različne koncentracije določene snovi in rezultate zlahka primerjamo. Za izločitev toksičnih snovi ali koncentracij spojin se predhodno običajno izvedejo testi na živalih ali testi *in vitro*. Metoda poteka tako, da okluzivne obliže nanesejo na notranjo stran lopatic na hrbtu. Čas izpostavljenosti je različen od študije do študije. Priporoča se 4-urna izpostavitve, a je pri novih ali hlapnih spojinah morda boljša krajša, od polurna do enourna izpostavljenost. Odziv kože se oceni od 30 minut do 1 uro po odstranitvi obliža, in sicer na podlagi skale, ki se uporablja za Draizov test. S podatki iz krpičnih testov se lahko s statistično analizo, ki sta jo opisala Kilgman in Wooding, določijo tudi:

- a) IT50 – čas izpostavitve, potreben za nastanek draženja pri 50 % testirancev,
- b) ID50 – odmerek, potreben za nastanek draženje pri 50 % testirancev po 24-urni izpostavitvi. (11)

1.2.3 SENZIBILIZACIJA


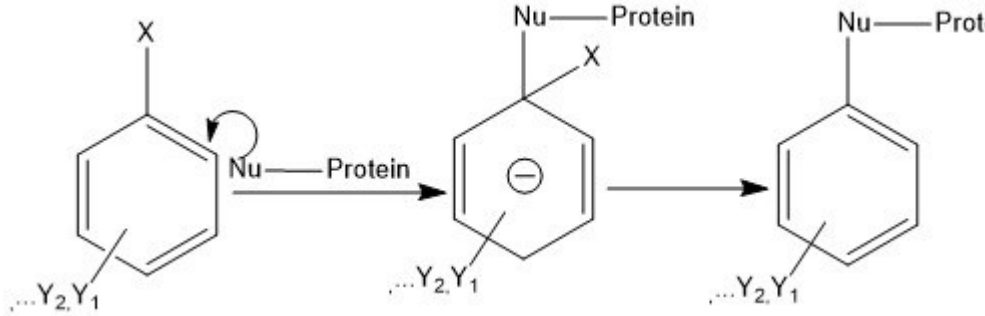

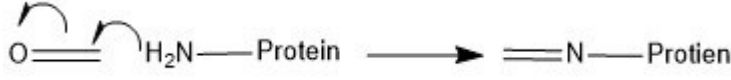
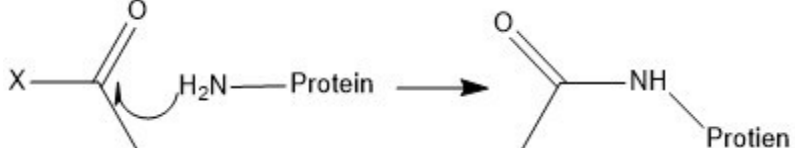
Senzibilizacija kože je alergijski odziv organizma na določeno snov, pravimo mu tudi alergijski kontaktni dermatitis, ki ga pogosto spremljajo srbečica, edem ali eritem. Do kontaktnega dermatitisa pride, ko senzibilizacijska snov, v veliki večini primerov nek elektrofil, reagira s proteinom v koži. Kovalentna povezava majhne molekule in proteina vodi do nastanka antigena/imunogena. Ta aktivira dendritične celice, čemur sledi proliferacija specifičnih T-celic ubijalk. Senzibilizacija je proces, ki poteka v dveh stopnjah. V prvi se po primarni izpostavitvi posameznika alergenu odzove pridobljeni imunski odziv in pride do indukcije imunskega spomina. Nato sledi druga stopnja, pri kateri pride do celično izzvine/posredovane alergijske reakcije (občutljivih) posameznikov ob ponovni izpostavitvi alergeni snovi. (13) Večina senzibilizatorjev izzove alergijsko reakcijo prek kovalentne vezave na kožne proteine, pri čemer pride do nastanka imunogenega proteina. Gre za

kemijsko dobro poznane in definirane kemijske reakcije med nukleofili in elektrofilni. Do zdaj so s študijami potrdili pet potencialnih elektrofilnih mehanizmov, ki vodijo do senzibilizacije:

1. Michaelov tip adicije (MCA),
2. formacija Schiffove baze,
3. aciliranje,
4. nukleofilna aromatska substitucija (S_NAr),
5. nukleofilna alifatska substitucija drugega reda (S_N2). (14)

Njihov potek je prikazan tudi v spodnji tabeli (tabela 1).

Tabela 1: Prikaz potencialnih mehanizmov senzibilizacije kože (14)

Mehanska domena	Reakcija vezave proteina	Spremenjen protein
Michaelov akceptor		Nu—Protein
Elektrofil S _N Ar		Nu—Protein
Elektrofil S _N 2		—Nu—Protein
Tvorec Schiffove baze		Protein
Sredstva za aciliranje		Protein

Zaradi kompleksnosti mehanizma, ki je v ozadju kožne senzibilizacije, trenutno na trgu ni validiranih alternativnih metod *in vitro* ter *in silico* za testiranje senzibilizacije. V uporabi pa so testi *in vivo*: *maksimizacijski test na morskih prašičkih* (GMPT; angl. *Guinea pig maximization test*), Buehlerjev test in tri različice testov analize lokalnih limfnih vozlov

(LLNA; angl. *Local lymph node assay*). V bližnji prihodnosti najverjetneje ne bo zgolj ena metoda *in vitro/in silico* zamenjala trenutnih testnih metod, temveč bo za popolno zamenjavo živalskih metod potrebna kombinacija različnih metod, ki bodo pokrile glavne mehanizme senzibilizacije poteka neželenega/neugodnega končnega izida (AOP; angl. *Adverse outcome pathway*).

1.2.3.1 Analiza lokalnih limfnih vozlov

Test analize limfnih vozlov (LLNA) so razvili v 80. letih 20. stoletja kot alternativo splošno uporabljenemu testu GPMT. (15) LLNA se za razliko od GPMT konča že v začetni fazi senzibilizacije, zato je signifikantno zmanjšan čas študije na živalih. Poleg tega živali niso podvržene neprijetnostim, ki jih prinaša vnetje v fazi elicitacije, ki je nujna v sklopu testa GPMT. Če povzamemo, test LLNA v primerjavi s testom GPMT potrebuje manjše število živali, izboljša njihove pogoje in hkrati skrajša čas testiranja ter je cenovno manj potraten. Gre za testno metodo, ki jo je potrdil tako ameriški odbor Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods kot Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM; angl. European Center for the Validation of Alternative Methods), kasneje pa ga je kot samostojno metodo privzela tudi OECD. Glede na novo evropsko regulacijo REACH predstavlja primarno metodo za testiranje senzibilizacije. (16) Metoda uporablja miši seva CBA ženskega spola, stare 6–12 tednov. Pri študijah, katerih podatki niso uporabljeni za regulatorne namene, so lahko miši stare tudi tja do 20 tednov. Živali so v prostorih z nadzorovanimi pogoji (temperatura, vlaga, cikli teme in svetlobe) v skupinah po 4–5 miši. Najprej se pripravijo raztopine snovi in primerna podlaga za nanos. Običajno izberejo tri zaporedne koncentracije iz sveže pripravljenih raztopin s koncentracijo 50, 25, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 in 0,1 % (w/v). Uporabljene koncentracije raztopin izberejo bodisi glede na podatke peroralne toksičnosti bodisi izvedejo preliminarne teste na živalih, saj ni vedno smotrno uporabiti najvišje koncentracije. Vsako testno miš najprej stehtajo in njeno težo spremljajo med testiranjem, saj je sprememba teže lahko pokazatelj sistemske toksičnosti. Najprej 3 zaporedne dni vsak dan z avtomatsko pipeto na hrbtišče obeh ušes vsake živali nanesejo 25 μ l kemikalije ali samo podlage. Sledita 2 dneva počitka, nato pa mišim v rep injicirajo 0,25 ml radioaktivnega timidina (80 μ Ci/ml). Po 5 urah jih usmrtijo in jim odstranijo lokalne bezgavke. Razmerje proliferacije limfocitov v bezgavkah med testno skupino, ki je prejela kemikalijo, in kontrolno skupino, ki ji je bil nanesen zgolj vehikel, se izrazi s stimulacijskim indeksom (SI). Rezultate proliferacije podajo kot skupen razpad na minuto na bezgavko (dpm/node).

$$SI = \frac{\text{test dpm/node}}{\text{vehikel dpm/node}}$$

V primeru, da dermalna izpostavitve pri eni ali večjih koncentracijah testne kemikalije pripelje do $SI = 3$ ali več, ima kemikalija velik potencial, da bo pri ljudeh sprožila kontaktno senzibilizacijo. (15)

LLNA temelji na indukciji primarne proliferacije limfocitov v lokalnih bezgavkah glede na mesto nanosa kemikalij kot posledici izpostavitvi kemičnim senzibilizatorjem. To se kvantitativno lahko izmeri z uporabo radioaktivnega timidina, ki se vključi v celično DNA limfocitov. Nizkomolekularne molekule so običajno premajhne, da bi bile alergene same po sebi (npr. hapteni), zato se morejo najprej vezati na proteine. Glavno vlogo pri prepoznavanju, procesiranju in transportu alergenov od kože do bezgavk imajo Langerhansove celice (LC). Te potujejo do bezgavk, pri čemer postanejo zrele dendritične celice (DC). DC nato predstavijo hapten, vezan na krajše peptidne fragmente, limfocitom T, čemur sledita aktivacija T-limfocitov in njihova diferenciacija v spominske T-celice in efektorske T-celice, kar vodi v osrednjo fazo senzibilizacije. LLNA kot indikator za senzibilizacijo izkorišča prav proliferacijo limfocitov v bezgavkah. (16) LLNA je navadno primarna metoda izbora za preverjanje in kategorizacijo učinka kožne senzibilizacije. (17)

1.2.3.2 TESTI NA MORSKIH PRAŠIČKIH

a) Maksimizacijski test (GPMT)

GPMT je zlati standard za testiranje senzibilizacijskega potenciala spojin, ki se prakticira že 25 let. (18) Njegov razvoj in široka uporabnost sta predvsem posledica nezmožnosti zaznavanja šibkih alergenov z ostalimi testnimi metodami. Problem GPMT je, da producira veliko lažno pozitivnih rezultatov. Vnetni odziv po preizkusu je namreč lahko posledica inducirane pretiranega draženja in ne alergene reakcije. Za GPMT se uporabljajo mladi albino morski prašički, ki tehtajo 300–500 gramov. (19) Navadno so ženskega spola. Teste se izvede v skupinah po 10 živali. Živalim dajo najprej sprožitveni odmerek, po določenem času, ko je omogočen razvoj imunskega odgovora in je indukcijska faza končana, pa morske prašičke izpostavijo še provokacijskemu/obnovitvenemu odmerku testne substance. Kožne reakcije opazujejo in ocenjujejo 48 in 72 ur po aplikaciji provokacijske doze ter jih primerjajo s kontrolno skupino, ki so ji aplicirali zgolj vehikel brez testne substance. Uporabljene koncentracije slednjih se izberejo v predhodno izvedenih testih. (10) Kot testne substance uporabljajo tako sestavine, ki so znane kot nealergene, na primer aluminijev klorid, tween 80

in natrijev lauril sulfat, kot tudi močne senzibilizatorje, formalin itd. (19) Pri metodi GPMT se poleg testne substance injicira tudi Freundov popolni adjuvans (FCA), ki potencira senzibilizacijo tako, da poveča telesni imunski odziv na antigen. Testna substanca se obravnava kot senzibilizator, če se pozitivna reakcija pojavi pri vsaj 30 % testiranih živali. (10)

b) Buehlerjev test

Buehlerjev test je izjemno podoben metodi GPMT, vendar pri njem ne uporabimo adjuvansa FCA. (10) Z njim lahko proučujemo navzkrižno reaktivnost med strukturno podobnimi snovmi, senzibilizacijski potencial kemikalij ter povezavo med odzivom in količino uporabljene sestavine. Metoda temelji na topikalni aplikaciji testne substance pod okluzivnim obližem, s katerim izvedemo indukcijo in elicitacijo kontaktne senzibilizacije. Potrebni sta testna skupina 20 morskih prašičkov in kontrolna skupina, ki jo sestavlja 10 živali. Indukcijske obliže aplicirajo vedno na isto mesto, in sicer trikrat za 6 ur s približno 6 dnevi presledka, nato pa živali počivajo približno 14 dni, čemur sledi aplikacija obliža na naključno mesto. Po 30 in 54 urah se oceni stopnja eritema na skali od 1 do 5. Metoda je sicer živalim prijaznejša od metode GPMT, vendar je slednja občutljivejša. (20)

1.2.3.3 Test h-CLAT

Ena izmed metod *in vitro* testiranja senzibilizacijskega potenciala, ki jo je potrdil ECVAM, je test aktivacije človeških celic (h-CLAT; angl. *human cell activation test*). Metoda po 24-urni izpostavitvi celic testni substanci preverja ekspresijo površinskih celičnih markerjev, kot so CD86 in CD54 na celicah THP-1 (celice humane akutne monocitne levkemije). CD86 in CD54 so površinske molekule, ki so tipični markerji za aktivacijo DC in imajo pomembno vlogo pri aktivaciji T-celic. Ekspresijo površinskih celičnih označevalcev izmerijo s pretočno citometrijo, ki ji sledi fluorescentno obarvanje s protitelesi, ki so označeni s fluorokromi. Nato sledi izračun relativne intenzitete fluorescence površinskih označevalcev, ki ga primerjajo z rezultati kontrole. Kot kontrolo se uporabi zgolj vehikel. S pomočjo napovednega modela h-CLAT na podlagi teh podatkov odločijo, ali je spojina senzibilizator ali ne. (21, 22)

1.2.3.4 Test direktne peptidne reaktivnosti

Test direktne peptidne reaktivnosti (DPRA; angl. *Direct peptide reactivity assay*) je metoda *in vitro*, ki se uporablja za napoved vezanja epidermalnih proteinov. To predstavlja začetno molekulsko fazo poteka neželenega izida. Meritve se izvajajo z metodo tekočinske

kromatografije visoke ločljivosti (HPLC; angl. *High performance liquid chromatography*). Po izpostavitvi testni kemikaliji z metodo HPLC merijo zmanjšanje količine peptidov, ki vsebujejo aminokislini cistein ali lizin, v raztopini. UV-detekcijo merijo pri 220 nm z elucijskim gradientom. Iz rezultatov izračunajo odstotek zmanjšanja količine peptidov, ki se uporabi v napovednem modelu, ki ga sestavljajo štirje razredi, ki se razlikujejo po stopnji reaktivnosti. Prikazani so v tabelah 2 in 3. (23, 24)

Tabela 2: Cistein 1 : 10/lizin 1 : 50 – napovedni model testa DPRA (24)

% delecije cistein in lizin-vsebujočih peptidov	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA
$0\% \leq \% \text{ delecije} \leq 6,38\%$	Nereaktivnost ali minimalna reaktivnost	Negativen rezultat
$6,38\% < \% \text{ delecije} \leq 22,62\%$	Nizka reaktivnost	Pozitiven rezultat
$22,62\% < \% \text{ delecije} \leq 42,47\%$	Srednja reaktivnost	
$42,47\% < \% \text{ delecije} \leq 100\%$	Visoka reaktivnost	

Tabela 3: Cistein 1 : 10 – napovedni model testa DPRA (24)

% delecije cistein vsebujočih peptidov	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA
$0\% \leq \% \text{ delecije} \leq 13,89\%$	Nereaktivnost ali minimalna reaktivnost	Negativen rezultat
$13,89\% < \% \text{ delecije} \leq 23,09\%$	Nizka reaktivnost	Pozitiven rezultat
$23,09\% < \% \text{ delecije} \leq 98,24\%$	Srednja reaktivnost	
$98,24\% < \% \text{ delecije} \leq 100\%$	Visoka reaktivnost	

Na podlagi razvrstitve je razvidno, ali ima spojina senzibilizacijski potencial. Metodo sta odobrila in preverila Referenčni laboratorij Evropske unije (EURL; angl. *European union reference laboratory*) in ECVAM ter se lahko uporablja za razlikovanje med senzibilizatorji in nesenzibilizatorji.

1.3 CIMETNA KISLINA IN NJENI DERIVATI

Derivate cimetne kisline uvrščamo k fenolnim kislinam, kamor spadajo tudi derivati benzojske kisline. Gre za dva velika razreda kislin, ki so v rastlinskem svetu zelo razširjene. Cimetna kislina ima v svoji strukturi dvojno vez, zato lahko obstaja v dveh geometričnih konformacijah: *trans* in *cis*. V naravi je prisotna zgolj v obliki *trans*, po nomenklaturi IUPAC pa jo imenujemo *trans*-3-fenil-2-propenojska kislina. Skupaj z njenimi derivati jo v različnih koncentracijah najdemo v večini sadežev in zelenjave, kjer se pojavlja v obliki estrov z različnim derivati sladkorjev ali z drugimi hidrokislinami. Cimetna kislina in njeni derivati imajo različne študijsko potrjene biološke učinke, kot so antioksidativno, protivnetno, protitumorno, protivirusno, protibakterijsko, protiglivično, hepatoprotektivno, antidiabetično, hipolipemično in hipoholesterolemično delovanje, zaradi katerih jih pogosto uporabljamo v farmaciji in kozmetiki.

1.3.1 VLOGA V KOZMETIČNIH IZDELKIH

Izraziti in prijetni vonji cimetne kisline in njenih derivatov so najpogosteje razlog, da so uporabljeni v kozmetičnih izdelkih. Najdemo jih v različnih parfumi, gelih za tuširanje, šamponih itd., kjer poskrbijo za omamne dišave. Nekateri derivati cimetne kisline pa delujejo zaščitno pred škodljivimi vplivi sonca. Gre predvsem za organske UV-filtre, ki absorbirajo svetlobo v območju UVB-spektra. Oktil metoksicinamat se pogosto uporablja kot UV-filter in je odobren tako v Ameriki (FDA) kot v Evropi (COLIPA). Njegov strukturno soroden derivat, izoamil-*p*-metoksicinamat, je dovoljen zgolj v Evropi, saj ga v Združenih državah Amerike FDA še ni odobrila. Problem organskih UV-filtrov je njihova vprašljiva stabilnost, saj so podvrženi fotodegradaciji, posledično pa se njihova učinkovitost pri zaščiti pred sončnim sevanjem zmanjša, poleg tega lahko na novo nastale spojine na koži delujejo dražilno oziroma povzročijo senzibilizacijo kože.

2 NAMEN DELA

Večina derivatov cimetne kisline je zaradi svojega specifičnega vonja pogosto v raznih kozmetičnih izdelkih, kjer igra vlogo dišave. Najdemo jih v šamponih, milih, parfumi in številnih drugih izdelkih. Poleg tega se derivati cimetne kisline uporabljajo tudi kot UV-filtri, ki so dodani vedno večjemu številu kozmetičnih izdelkov zaradi vse večjega zavedanja negativnega vpliva sončnega sevanja. Posledično je izpostavljenost ljudi derivatom cimetne kisline visoka. V diplomskem delu bomo z različnimi metodami *in silico* napovedali dražilni in senzibilizacijski potencial izbranih derivatov cimetne kisline:

- a) s programi Derek Nexus, ToxTree ter VegaNIC bomo napovedali različne vidike dražilnega in senzibilizacijskega potenciala kozmetičnih sestavin, derivatov cimetne kisline,
- b) dobljene rezultate bomo primerjali z že znanimi podatki iz literature (*in vivo*, *in vitro*) in ocenili tudi napovedno moč programov,
- c) iz literaturnih virov in baz podatkov bomo ocenili izpostavljenost ljudi derivatom cimetne kisline.

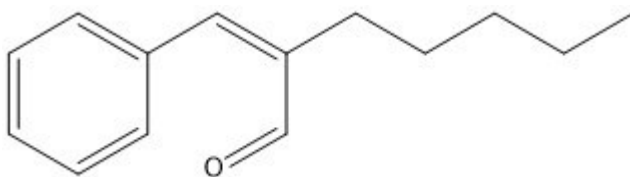
3 METODE IN MATERIALI

3.1 IZBRANI DERIVATI CIMETNE KISLINE

3.1.1 DIŠAVE

3.1.1.1 Amil cinamal

- Empirična formula: $C_{14}H_{18}O$
- Strukturna formula:



Slika 1 Amil cinamal

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,7 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: C1=CC=CC(/C=C(\C=O)/CCCCC)=C1
- LogP= 4.801
- Molekulska masa: 202.292 g/mol
- Temperatura tališča: 33,9 °C
- Parni tlak (T = 20 °C): 0,03173 Pa
- Površinska napetost: 35,9 mN/m

Amil cinamal je tekoč blede rumen aldehyd, ki je poznan tudi kot α -amil cinamaldehyd. V naravi je v nekaterih rastlinah, običajno pa ga za uporabo v potrošniških izdelkih pridobivamo sintezno. V kozmetiki ima vlogo dišave, najpogosteje je v šamponih, losjonih, raznih kremah in izdelkih za kopanje. Njegov cvetlični vonj spominja na vonj jasmina. Njegova negativna lastnost je dražilno delovanje, je namreč dobro poznana dražilna snov. Skupaj z osmimi drugimi sestavinami sestavlja dišavno mešanico, ki so jo izdelali izrecno za namen detekcije kontaktne alergije na parfume. Evropska kozmetična direktiva je amil cinamal uvrstila v razred alergenih snovi. Internacionalno združenje za standarde dišav (IFRA; angl. *International fragrance association standard*) pa je zaradi možnosti senzibilizacije omejila njegovo uporabo v dišavah. Na podlagi različnih študij *in vivo* so prišli do zaključka, da je

vrednost NESIL 23.600 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 4. Za enajst različnih kategorij so priporočili kritične koncentracije, pri katerih se negativni učinki še ne pojavijo. (25, 26)

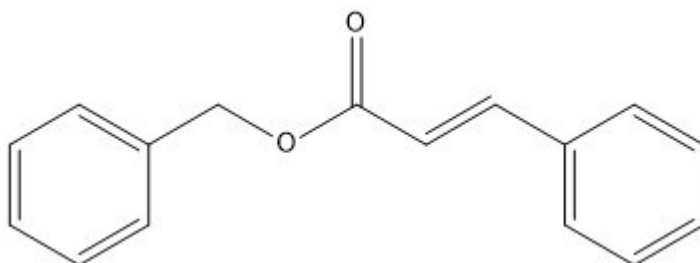
Tabela 4: Povzetek študij RIFM za amil cinamat (25)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			****WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		*NOEL – HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	**NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	***LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
2.942	Izjemno šibek	23.622	/	/	23.600

NOEL – najvišja koncentracija, pri kateri še ne pride do reakcije; LOEL – najnižja koncentracija, pri kateri pride do efekta; HRIPT – krpični test (angl. Human Repeat Insult Patch test); HMT – človeški maksimizacijski test (angl. Human maximization test); / – podatki niso na voljo; NESIL – koncentracija, pri kateri indukcija senzibilizacije ni pričakovana (angl. no expected sensitization induction level)

3.1.1.2 Benzil cinamat

- Empirična formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2$
- Strukturna formula:



Slika 2: Benzil cinamat

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,1 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=C(OCc1ccccc1)C=Cc2ccccc2
- Log P = 4,23
- Molekulska masa: 238,28 g/mol
- Temperatura tališča: 37 °C
- Parni tlak (T = 20 °C): <0,133 Pa
- Površinska napetost: 45 mN/m

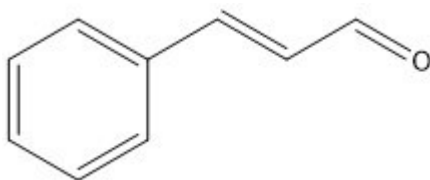
Benzil cinamat je bela ali blede rumena kristalinična snov, ki se zaradi svojega sladkega balzamičnega vonja pogosto uporablja kot dišava v kozmetičnih izdelkih. Gre za ester benzilnega alkohola in cimetne kisline. Nahaja se v izdelkih za uporabo po britju, parfumih, kolonjskih vodicah, izdelkih za lase in kožo. Benzil cinamat je v naravi prisoten v različnih balzamih, kot so perujski balzam, balzam copaiba in balzam tolu. Za uporabo v kozmetičnih in drugih potrošniških izdelkih pa se benzil cinamat proizvaja sintezno. Benzil cinamat so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša $4.700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 5. (27, 28)

Tabela 5: Povzetek študij RIFM za benzil cinamat (27)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL – HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
4.600	Šibek	4.720	5.517	/	4.700

3.1.1.3 Cinamal

- Empirična formula: $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$
- Strukturna formula:



Slika 3 Cinamal

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,02 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=CC=Cc1ccccc1
- Log P = 2,05
- Molekulska masa: 134,18 g/mol
- Temperatura tališča: 7,5 °C
- Parni tlak (T = 20 °C): 2,666 Pa
- Površinska napetost: 39 mN/m

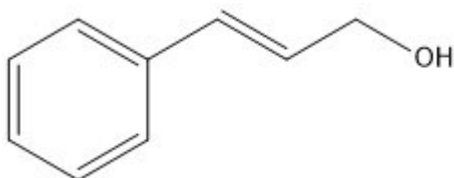
Cinamal ali cinamal aldehid je rumen oljnat aromatski aldehid, ki je odgovoren za značilno aromo cimeta. Naravno je v lubju dreves cimeta, lahko pa se ga proizvaja tudi sintezno. Pogosto ga najdemo v losjonih za uporabo po britju, izdelkih za kopanje, šminkah, ustnih vodicah, zobnih pastah in kremah. Opravlja lahko funkcijo dišave, sredstva za okus ali denaturanta. Včasih ga najdemo tudi v parfumih, ki imajo sladek ali sadni vonj, saj pripomore k prijetni aromi. Cinamal so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša $590 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 6. (29, 30)

Tabela 6: Povzetek študij RIFM za cinamal (29)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL – HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
262	Srednje močan	591	/	775	590

3.1.1.4 Cinamilni alkohol

- Empirična formula: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}$
- Strukturna formula:



Slika 4: Cinamilni alkohol

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,09 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: OCC=Cc1ccccc1
- Log P = 1,61
- M = 134,18 g/mol
- Temperatura tališča: 30 °C
- Parni tlak (T = 20 °C): 0,3573 Pa
- Površinska napetost: 42,7 mN/m

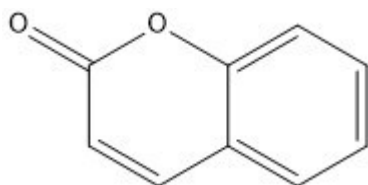
Cinamilni alkohol je blede rumena tekočina z vonjem po hijacintah. Prav tako kot benzil cinamat se tudi cinamilni alkohol nahaja v lubju cimetovih dreves, najdemo pa ga tudi v listih čajevca, hijacintah in narcisah. Uporabljamo ga kot dišavo ali kot sredstvo za izboljšanje okusa. Največkrat se pojavlja v naslednjih kozmetičnih izdelkih: izdelkih za kopanje, parfumih, tonikih, pripomočkih za oblikovanje las ter raznih kremah in losjonih za telo in roke. Cinamilni alkohol so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša $3.000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 7. (31, 32)

Tabela 7: Poveztek študij RIFM za cinamilni alkohol (32)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
5.250	Šibek	3.000	2.759	4.724	3.000

3.1.1.5 Kumarin

- Empirična formula: $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$
- Strukturna formula:



Slika 5: Kumarin

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,029 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=C1Oc2ccccc2(C=C1)
- Temperatura tališča: $33,4 \text{ }^\circ\text{C}$
- Parni tlak ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$): 40,08 Pa
- Površinska napetost: 46,6 mN/m

Kumarin je bela trda kristalinična snov s sladkim vonjem po vanilji in oreščkih. Vonj močno razredčenega kumarina spominja na aromo sveže pokošene trave. Je pogosta sestavina

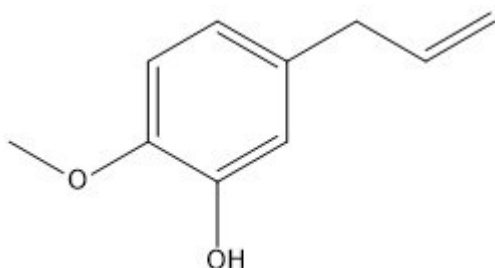
kozmetičnih izdelkov, kot so losjoni za uporabo po britju, čistilni izdelki, kreme, izdelki za sončenje, izdelki za kopeli itd. Kumarin je v naravi prisoten v številnih rastlinah, med drugimi tudi v sivki, oreščku tonka in luštreku. Po kemizmu gre za aromatski lakton, ki je pomembna sestavina parfumov že od leta 1882. Na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da je kumarin senzibilizator. Vrednost NESIL je $1.000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 8. (33, 34)

Tabela 8: Povzetek študij RIFM za kumarin (33)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
1.070	Srednje močan	/	/	2.000	1.000

3.1.1.6 Evgenol

- Empirična formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$
- Strukturna formula:



Slika 6 Evgenol

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,2 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: Oc1ccc(cc1(OC))CC=C
- Log P = 2,4
- M = 164,2 g/mol
- Temperatura tališča: $-10 \text{ }^\circ\text{C}$
- Parni tlak (T = $20 \text{ }^\circ\text{C}$): 0,765 Pa
- Površinska napetost: 36,6 mN/m

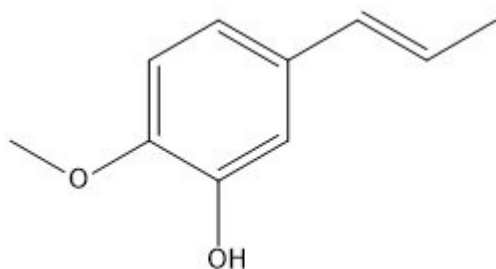
Evgenol je transparentna do blede rumena tekočina, katere vonj spominja na klinčke. V naravi se pojavlja v številnih rastlinah, med drugimi v eteričnem olju klinčkov, cimeta, muškarnega oreščka in lovorovem listu. V končnih izdelkih igra vlogo dišave, sredstva za okus in denaturanta. Evgenol je del izdelkov, kot so losjoni po britju, parfumi, izdelki za nego las, za kopanje, kreme, losjoni in šamponi. Evgenol so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša $5.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 9. (35, 36)

Tabela 9: Povzetek študij RIFM za evgenol (35)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL – HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
2.703	Šibek	5.906	/	/	5.900

3.1.1.7 Izoevgenol

- Empirična formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$
- Strukturna formula:



Slika 7: Izoevgenol

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,01 %
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: Oc1ccc(C=CC)cc1(OC)
- Log P = 2,58
- M = 164,2
- Temperatura tališča: $-10 \text{ }^\circ\text{C}$
- Parni tlak (T = $20 \text{ }^\circ\text{C}$): 0,399 Pa
- Površinska napetost: 39,0 mN/m

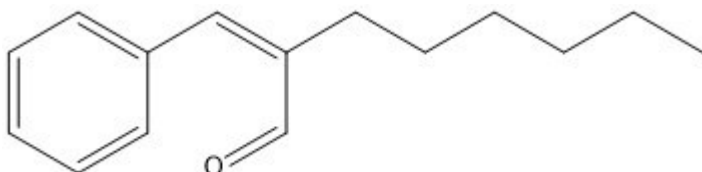
Izoevgenol je po kemizmu substituiran fenol in je tekočina transparentne do blede rumene barve z značilnim vonjem, ki spominja na nagelj. V kozmetiki se uporablja v formulacijah parfumov, izdelkih za britje in izdelkih za nego kože. Igra vlogo dišave ali sredstva za okus. V naravi je prisoten v cimetu, klinčkih, muškarnem orešku in sandalovini. Izevgenol so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij *in vivo* so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša $250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kar je prikazano v tabeli 10. (37, 38)

Tabela 10: Povzetek študij RIFM za izoevgenol (37)

LLNA utežena vrednost EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJE NA LJUDEH			WoE NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		NOEL HRIPT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NOEL – HMT (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	LOEL (indukcija) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
498	Srednje močan	250	/	775	250

3.1.1.8 Heksil cinamal

- Empirična formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$
- Strukturna formula:



Slika 8 Heksil cinamal

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 0,7%
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=CC(=Cc1ccccc1)CCCCCC
- Log P= 5
- M=216,32 g/mol
- Temperatura tališča: $39,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- Parni tlak ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$): 0,066 Pa
- Površinska napetost: 35,7 mN/m

Heksil cinamal je blede rumena do transparentna tekočina. Ima cvetlični vonj, ki spominja na jasmin. Heksil cinamal so ocenili kot potencialni senzibilizator in na podlagi različnih študij

in vivo so pri IFRA prišli do zaključka, da vrednost NESIL znaša 23.600 µg/cm², kar je prikazano v tabeli 11. (39)

Tabela 11: Povzetek študij RIFM za heksil cinamal (39)

LLNA utežena vrednost EC3 (µg/cm ²)	Klasifikacija učinka na podlagi študij na živalih	PODATKI IZ ŠTUDIJ NA LJUDEH			WoE NESIL (µg/cm ²)
		NOEL HRIPT (indukcija) (µg/cm ²)	– NOEL – HMT (indukcija) (µg/cm ²)	LOEL (indukcija) (µg/cm ²)	
2.372	Šibek	23.622	/	/	23.600

3.1.1.9 OMEJITVE UPORABE DIŠAV

Evropska kozmetična direktiva uvršča večino spojin, strukturno podobnih cimetni kislini, na seznam alergenih snovi, izmed katerih je večina dišav. Amil cinamal, benzil cinamat, cinamal, cinamilni alkohol, kumarin, evgenol, izoevgenol in heksil cinamal morajo biti glede na Aneks III kozmetične direktive (40) v primeru, da presegajo določene koncentracije, vedno navedeni na seznamu sestavin kozmetičnih izdelkov. Za vse zgoraj navedene sestavine velja obvezna navedba v seznamu sestavin v primeru:

- a) uporabe koncentracij, višjih od 0,001 % v »leave-on« izdelkih, ki se ne spirajo,
- b) uporabe koncentracij, višjih od 0,01 % v »rinse-off« izdelkih, ki jih s kože speremo.

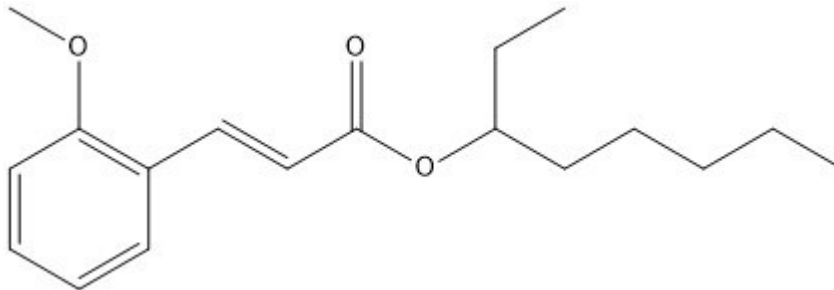
3.1.1.10 NESIL

Pri razvoju metod kvantitativne ocene nevarnosti (QRA; angl. *Quantitative risk assessment*) za senzibilizacijski potencial dišav so poleg standardnih izrazov (npr. NOEL) dodali še nekaj novih, med njimi tudi NESIL (angl. *No expected sensitizing induction level*). Nove strokovne izraze so sprejeli prav zaradi edinstvenih elementov QRA za kožno senzibilizacijo. NESIL so izračunali na podlagi podatkov, pridobljenih iz živalskih (LLNA, GPMT) in človeških študij (HRIPT). Pri tem so upoštevali pristop teže podatkov (WoE; angl. *weight of evidence*), saj se podatki o senzibilizacijskem potencialu spojin lahko razlikujejo po kakovosti in verodostojnosti. Ta pristop vzame v sliko vse podatke, ki so na voljo, in na podlagi teh določi NESIL. (41)

3.1.2 UV-FILTRI

3.1.2.1 Etilheksil metoksicinamat

- Empirična formula: $C_{18}H_{26}O_3$
- Strukturna formula:



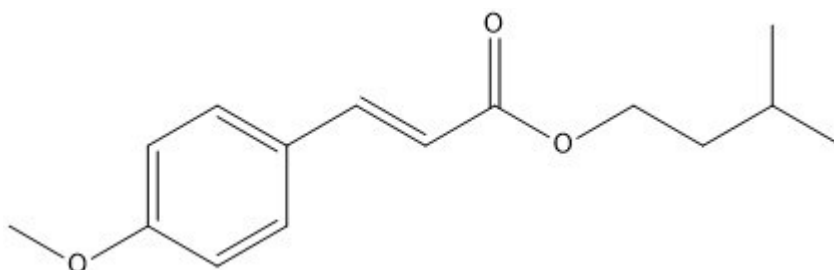
Slika 9 Etilheksil metoksicinamat

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 10 % (EU), 7,5 % (USA)
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=C(OCC(CC)CCCC)C=Cc1ccc(OC)cc1
- Log P = 5,96
- M = 290,4 g/mol
- Temperatura tališča: $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Parni tlak (T = $20\text{ }^{\circ}\text{C}$): 119,99 Pa
- Površinska napetost: 35,7 mN/m

Etilheksil metoksicinamat ali oktinoksat (OMC) je brezbarvna oljnata tekočina, netopna v vodi. Najpogosteje se uporablja v kremah za sončenje in drugih dekorativnih izdelkih. Uvrščamo ga k organskim UV-filtrom, katerih namen je zaščita pred škodljivimi učinki sončnega sevanja. UV-svetloba je namreč glavni krivec za fotostarjanje. Žarki imajo krajšo valovno dolžino kot vidna svetloba in v koži inducirajo oksidacijske reakcije, ki posledično uničujejo kolagen in druge strukturne faktorje kože. Ti predvsem prek absorpcije UV-svetlobe ščitijo kožo pred opeklinami, prehitrim staranjem in nastankom kožnega raka, ki ima v zadnjih letih naraščajočo incidenco. Hkrati pa zaščiti tudi kozmetične izdelke pred morebitnim razpadom zaradi vplivov sevanja. Uporaba etilheksil metoksicinamata v kozmetičnih izdelkih je omejena tako na ameriškem kot evropskem trgu. Administracija za hrano in živila (FDA) dovoljuje koncentracije do 7,5 %, medtem ko je lahko po evropski direktivi v izdelkih do 10 % etilheksil metoksicinamata (v Kanadi pa 8,5 %). Njegova uporaba ni omejena zgolj zaradi možne senzibilizacije, temveč tudi zaradi potencialnega estrogenega delovanja. (42, 43, 44)

3.1.2.2 Izoamil *p*-metoksicinamat

- Empirična formula: C₁₅H₂₆O₃
- Strukturna formula:



Slika 10 Izoamil *p*-metoksicinamat

- Priporočila: omejena uporaba, v končnem produktu do 10 % (EU)
- Kritični učinek: senzibilizacija
- SMILES: O=C(OCCC(C)C)C=Cc1ccc(OC)cc1
- Log P = 4,37
- M = 248,32
- Temperatura tališča: 16 °C
- Površinska napetost: 35,7 mN/m

Izoamil *p*-metoksicinamat oziroma amiloksat je ester izoamilnega alkohola in *p*-metoksicimene kisline. V kozmetičnih izdelkih ima vlogo organskega UV-filtra, ki se uporablja v kremah za sončenje in raznih dekorativnih kozmetičnih izdelkih. Izoamil *p*-metoksicinamat je za uporabo kot UV-filter odobren le v Evropi, medtem ko ga FDA v Ameriki še ni potrdila. Sončne kreme v Združenih državah Amerike spadajo v kategorijo zdravil »over-the-counter« (OTC), zato morajo biti vsi UV-filtri odobreni s strani FDA, ki oceni tako njihovo varnost kot učinkovitost. V Združenih državah Amerike se izoamil *p*-metoksicinamat tako lahko uporablja zgolj za zaščito izdelkov pred razpadom zaradi vpliva UV-sevanja. V Evropi je Znanstveni odbor za kozmetologijo (SCC; angl. Scientific Committee on Cosmetology) po evalvaciji izoamil *p*-metoksicinamata odobril njegovo uporabo kot UV-filter pri maksimalni koncentraciji 10 %. Prišli so do zaključka, da do te vrednosti snov ne povzroča draženja ali alergijskih reakcij. (44, 45, 46)

3.2 UPORABLJENI RAČUNANIŠKI PROGRAMI ZA NAPOVED DRAŽILNEGA IN SENZIBILIZACIJSKEGA POTENCIALA

3.2.1 VEGA

- Uporabljen program: VegaNIC, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano, Italija
- Različica: 1.2.4
- Dostop: program je brezplačno na voljo za prenos na <https://www.vegahub.eu/login/>, potrebna je registracija
- Uporabljene nastavitve: Model – Skin Sensitization model (CAESAR) 2.1.6

VEGA je kompleksen računalniški program, ki združuje QSAR in orodja »read-across« za napovedovanje lastnosti kemikalij *in silico*. Vključuje namreč tako samostojni pripomoček za evalvacijo rezultatov prek indeksa aplikacijske domene (ADI) kot tudi številne modele QSAR, ki izhajajo iz razvitih aplikacij CAESAR, T.E.S.T, ToxTree, EPISuite in drugih. ADI je neodvisen algoritem, ki omogoča ovrednotenje zanesljivosti napovedi modelov QSAR in nam pokaže podobne snovi, oceni rezultate QSAR podobnih snovi in analizira ustrezne kemijske značilnosti testne spojine in njenih sorodnih komponent. Vsi modeli QSAR so zasnovani na treh stebrih:

- a) lastnost, ki jo bomo proučevali (v našem primeru senzibilizacijski potencial),
- b) kemijskih informacijah,
- c) funkciji, ki povezuje proučevano lastnost in testno snov.

Vsa tri področja, torej lastnost, kemijska informacija in algoritem, so nato združena v eno vrednost, ki jo imenujemo ADI. Nekateri programi uporabljajo aplikacijsko domeno na kvalitativni način (je ali ni), nekateri pa podajo rezultat tudi na kvantitativni način v obliki numerične vrednosti. Posebnost pripomočka pri programski opremi VEGA je upoštevanje vseh vej modela QSAR, torej lastnosti, kemijskih informacij in algoritma, medtem ko se jih večina nanaša zgolj na kemijsko podobnost. Pri VEGI dobimo napoved modelov QSAR, ki jih je nato treba ustrezno oceniti. Če so na voljo, se priporoča uporaba različnih modelov, saj v primeru, da se predvidevanja ujemajo, s tem pridobimo verodostojnost rezultatov. Za ugotavljanje senzibilizacijskega potenciala je na voljo zgolj model CAESAR, kar nam zmanjša možnosti ovrednotenja rezultatov. Program ugotavlja tudi podobnost snovi, in sicer jo izračuna na skali od 1 (identična) do 0 (snovi nimata nobenih podobnih lastnosti). V

splošnem velja, da vrednosti, manjše od 0,75, nakazujejo veliko razliko v strukturi med testno substanco in podobno snovjo, ki lahko vpliva na njeno obnašanje. Oceni se tudi:

- podobnost s snovmi, za katere imamo eksperimentalne podatke, pri čemer se uporablja tehnika »read-across«;
- prisotnost neobičajnih strukturnih fragmentov, kar se nanaša na kemijske informacije testne spojine. VEGA identificira nenavadne strukturne fragmente, ki odstopajo od seta spojin, ki predstavljajo bazo določenega modela. Faktor nam sporoča pomanjkanje informacij za element, ki je prisoten v molekuli;
- pregled razpona deskriptorjev, kar se nanaša na informacijo o algoritmu modela. VEGA presodi, ali so vrednosti deskriptorjev in vrednost molekulske mase testne snovi znotraj razpona vrednosti spojin, ki so v kontrolnem setu;
- analiza občutljivosti deskriptorjev, kar se prav tako nanaša na informacije o algoritmu modela. VEGA oceni, če 10-odstotna sprememba vrednosti deskriptorjev testne snovi sproži signifikantno variacijo napovedane vrednosti;
- ujemanje med pridobljeno vrednostjo testne substance in eksperimentalno določenimi vrednostmi podobnih snovi glede toksičnosti oziroma drugih lastnosti. V idealni situaciji se napovedana vrednost testne spojine in eksperimentalno določene vrednosti podobnih snovi ujemajo. Ta parameter je od vseh najbolj kritičen, saj se vsi ostali nanašajo zgolj na zanesljivost ocene;
- prisotnost strukturnih alarmov.

VEGA poda rezultate bodisi na podlagi eksperimentalnih podatkov bodisi naredi napoved glede na podobnost z drugimi komponentami, za katere obstajajo eksperimentalni podatki. V tem primeru poda zanesljivost podatkov s številom zvezdic, ki so rumeno obarvane. Tri rumeno obarvane zvezdice pomenijo, da je napoved zanesljiva, saj je testna spojina v območju uporabnosti modela. Dve obarvani zvezdici pomenita, da je napoved dvomljiva, saj bi snov lahko bila zunaj predela uporabnosti modela. Nezanjektivost napovedi pa predstavlja ena obarvana zvezdica, kar pomeni, da je spojina zunaj območja uporabnosti modela. Gre za izredno pregledno aplikacijo, saj nazorno nakaže tudi toksičnost spojine; zeleno obarvano krogec pomeni, da spojina ni toksična, rdeče obarvan krogec pa pomeni, da je spojina toksična. (47)

3.2.2 TOXTREE

- Uporabljen program: ToxTree, IdeaConsult Ltd, Sofia, Bolgarija
- Različica: ToxTree v.2.6.133
- Dostop: program je na voljo brezplačno za prenos na <http://toxtree.sourceforge.net/download.html>
- Uporabljene nastavitve: Skin sensitisation reactivity domains, Skin irritation / skin corrosion

ToxTree je uporabniku prijazna aplikacija, ki je na podlagi pristopa odločitvenega drevesa zmožna napovedati toksičnost testne snovi. Je prosto dostopna aplikacija, ki je kompatibilna z vsemi osebnimi računalniki, ki podpirajo Java 1.6 ali več. ToxTree je združljiv s številnimi tipi datotek, molekule pa se lahko vnesejo bodisi v obliki kode SMILES ali z uporabo že vgrajenega 2D-strukturnega diagrama. Sestavljen je iz sedemnajstih »vtičnikov«, uporabili pa smo naslednje tri:

- Predvidevanje dražilnega ali korozivnega potenciala kože, ki temelji na fizikalno-kemijskih lastnosti in strukturnih pravilih
Dostopno: od verzije ToxTree 1.12
Izdelava: IdeaConsult Ltd., (Sofia, Bulgaria) for JRC
- Predvidevanje dražilnega in korozivnega potenciala za oči, ki temelji na fizikalno-kemijskih lastnostih in strukturnih pravilih
Izdelava: I. Tsakovska in IdeaConsult Ltd., (Sofia, Bolgarija) za JRC
- Identifikacija mehanizmov toksičnih reakcij, ki povzročijo kožno senzibilizacijo prek uporabe modela SMARTS
Dostopno: od verzije ToxTree 2.1.0, a pod drugačnim imenom
Izdelava: IdeaConsult Ltd., (Sofia, Bolgarija), ob sodelovanju in podpori Procter in Gamble 2010 (17)

3.2.3 DEREK NEXUS

- Uporabljen program: Derek Nexus, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK
- Različica: Derek Nexus: 4.1.0, Nexus: 2.0.0
- Dostop: plačljiv program – dostop na računalniku Fakultete za farmacijo
- Uporabljene nastavitve: Species – Mammals; Selected Knowledge base – Derek KB 2014 1.0; Reasoning Level – at least DOUBTED; Perceive tautomers – Yes; Perceive mixtures – Yes; Match alerts without rule – No; Show open likelihood – No; Show negative predicitions – Yes; Show rapid prototypes – Yes

Derek Nexus je računalniški program podjetja Lhasa, za uporabo katerega je potrebna licenca, in je eden izmed priljubljenih sistemov *in silico* za napoved toksičnosti. Z uporabo metode SAR omogoča zgodnjo napoved potencialne toksičnosti testne snovi. Napoved je podprta z grafično obrazložitvijo odnosa med strukturo in delovanjem (SAR), podatki o toksičnosti spojin znotraj SAR, ključnimi referencami in mehanističnimi razlogi. Uporablja se v številnih panogah, kot so kozmetika, farmacija, kemikalije, regulativa itd., predvsem z namenom zapolnitve lukenj pri informacijah o določeni snovi. Program se izvaja že 30 let in se konstantno nadgrajuje z najnovejšimi toksikološkimi ugotovitvami, ki so v določenem trenutku na voljo. Derek omogoča hitro pridobitev rezultatov posamezne proučevane snovi ali skupine snovi. Njegova »opozorila« temeljijo na regulativnih, javnih in patentiranih podatkih, vključno s tistimi iz baze FDA. Z modulom Derek Nexus lahko napovemo potencialno toksičnost za številna in raznolika področja, kot so karcinogenost, mutagenost, genotoksičnost, teratogenost, draženje, reproduktivna toksičnost in senzibilizacija kože. Za napoved senzibilizacije Derek uporablja kvantitativno napoved. EC3 je zgrajena na tako imenovanem modelu »najbližjega soseda (angl. *nearest neighbour*)«, pri katerem so iz Lashine baze podatkov EC3 z več kot 650 spojinami izbrane najsorodnejše spojine, ki sprožijo izključno tak alarm kot testna substanca. Izmed teh je nato izračunana podobnost spojin, pri kateri je lahko izbranih tudi do deset spojin, ki sprožijo enako reakcijo in so testni substanci najbolj strukturno podobni. Na podlagi teh se nato izvede napoved EC3. Če so pri pregledu podobnosti izbrane le tri spojine ali manj, napovedi ne moremo izvesti. Derek razvrsti verjetnost napovedi na devet stopenj: *certain* – zagotovo, *probable* – verjetno, *plausible* – možno, *equivocal* – dvoumno, *doubted* – dvomljivo, *improbable* – težko verjetno, *impossible* – nemogoče, *open* – ni podatkov, ki bi podprli ali zavrgli predvidevanje/napoved, in *contradicted* – obstajajo tako dokazi, ki podpirajo napoved, kot dokazi, ki nasprotujejo dani napovedi. Uporabili smo ga za preverjanje dražilnega in senzibilizacijskega potenciala snovi, strukturno sorodnih cimetni kislini. Za napoved smo za vrsto izbrali sesalce, pri čemer je morala biti stopnja verjetnosti vsaj dvomljiva – *doubted*. (49, 50, 51, 52)

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Amil cinamal

Tabela 12: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov *in silico* za amil cinamal

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Koroziven	Senzibilizator	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

Podatki iz literature (53):

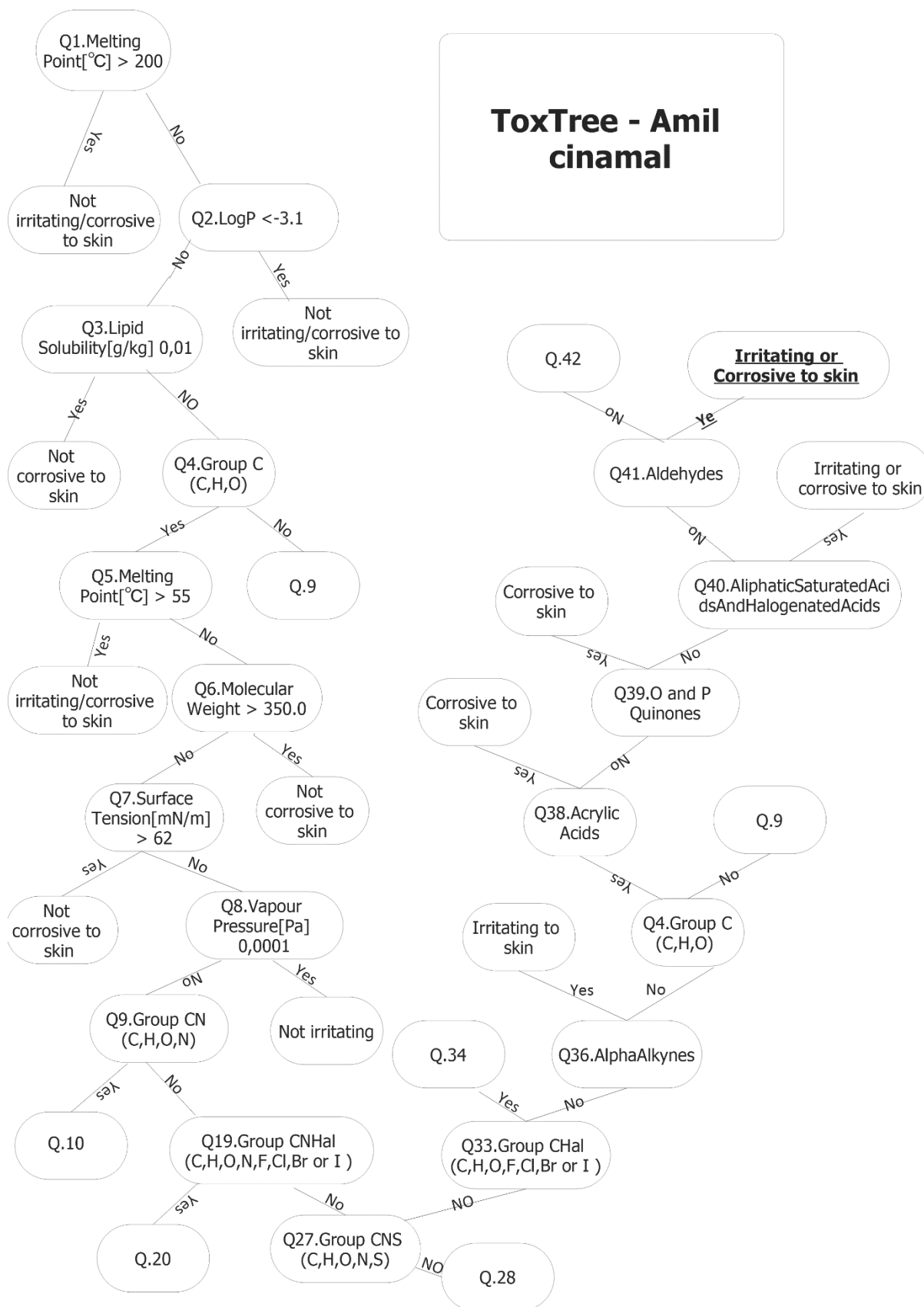
- Letna poraba: <1000 t
- Dermalna izpostavitvev: 0,1396 mg/kg/dan
- Sistemska izpostavitvev: 0,022 mg/kg/dan
- Sprejemljive meje uporabe v različnih kozmetičnih izdelkih:

Tabela 13: Meje uporabe amil cinamala v kozmetičnih izdelkih (53)

Primeri izdelkov	Izračunan QRA
Šminke	0,7 %
Dezodoranti	0,9 %
Kreme za obraz	5,6 %
Ustne vodice	17,1 %
Balzami za lase	5,0 %
Intimni robčki	1,8 %
Izdelki za uporabo po britju	3,6 %

a) Draženje

Amil cinamal je aplikacija ToxTree razvrstila kot dražilno ali korozivno spojino, in sicer na podlagi aldehydne funkcionalne skupine, ki je prisotna v osnovni strukturi. Derek Nexus je podal kontradiktorno napoved, saj amil cinamalu na podlagi odsotnosti strukturnih alarmov ni pripisal dražilnega potenciala (tabela 12). Zaradi pomanjkanja podatkov iz študij *in vivo* ter *in vitro* je težko zaključiti, kateri izmed programov je podal pravilno napoved in ali amil cinamal deluje dražilno.



Slika 11: Odločitveno drevo programa ToxTree za spojino amil cinamal

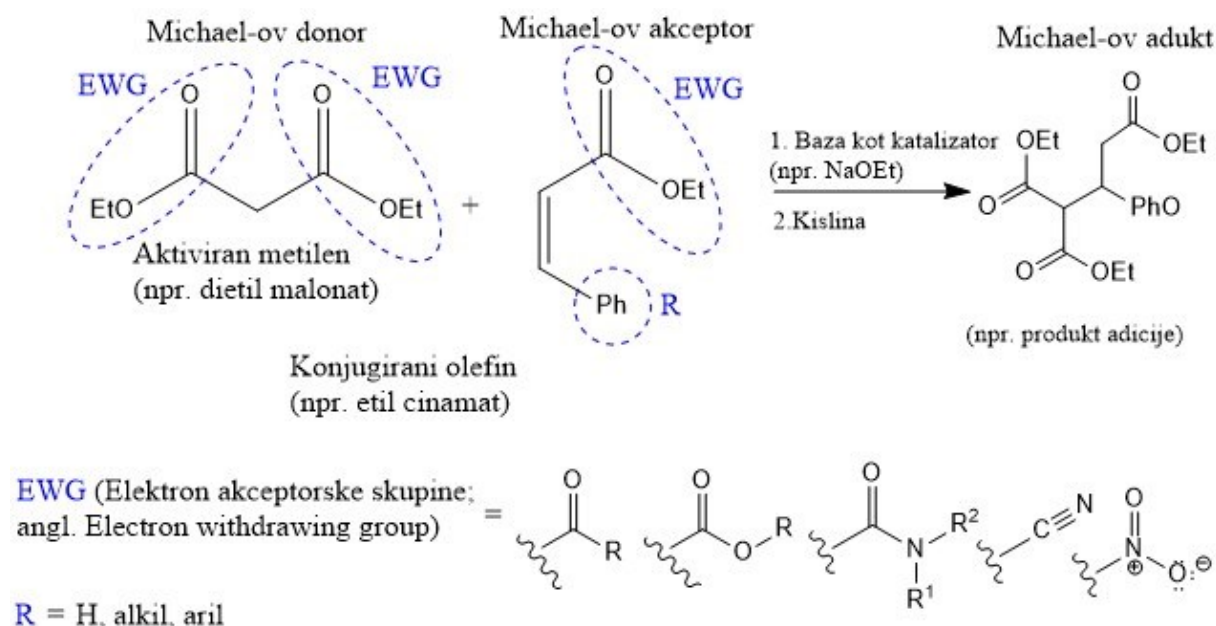
b) Senzibilizacija

Senzibilizacijski potencial amil cinamala so ovrednotili v številnih študijah GPMT in LLNA. Povzetek študij nam razkrije, da je amil cinamal izjemno šibek senzibilizator. Pri testu LLNA je vrednost EC3 znašala 11,7 % (2942 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Alergenost te dišave so testirali tudi na ljudeh s testom HRIPT (krpični test; angl. *Human repeated insult patch test*) in tako prišli do podatka za NOEL = 23.622 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. (53) Tudi aplikacije Derek Nexus, ToxTree in VegaNIC so amil cinamalu pripisale senzibilizacijski potencial. ToxTree in Derek Nexus sta napovedala delovanje po mehanizmu Michaelove adicije. Derek Nexus je označil svojo napoved za sesalce kot možno (angl. *plausible*), in sicer na podlagi vsebovane podstrukture α,β -nenasičenega aldehida. Program VegaNIC je napoved podal na podlagi eksperimentalnih podatkov in jo označil kot zanesljivo, saj je spojina v območju aplikacijske domene modela (tabela 12). Amil cinamal so torej tako testi *in silico* kot *in vivo* označili kot senzibilizator, a so mu slednji določili šibek potencial. Glede na količine, ki smo jim izpostavljeni (tabela 13), in mejne vrednosti senzibilizacije, pridobljene s testi *in vivo*, lahko sklenemo, da je verjetnost pojava alergijske reakcije/senzibilizacije zaradi uporabe kozmetičnega izdelka z amil cinamalom izredno majhna.

4.1.1 Michaelova adicija (angl. *Michael addition*)

Reakcija MCA je »1,4-adicija« ali »konjugirana adicija« nukleofilov na α,β -nenasičeno karbonilno spojino. Primer poteka reakcije je prikazan na spodnji sliki (slika 12). Pri senzibilizaciji pride do nastanka kovalentne vezi med senzibilizatorjem in kožnimi proteini. Senzibilizator igra vlogo elektrofila, ki se veže na nukleofilne skupine proteinov v koži. V nekaterih primerih sam senzibilizator nima elektrofilnih lastnosti, temveč jih pridobi po metabolnih reakcijah, ki jim je podvržen v koži. Takim elektrofilom pravimo tudi »proelektrofil«. Michaelovi adiciji so navadno podvrženi alifatski aldehidi, SN2 pa halogenirane spojine. Izredno reaktivni Michaelovi akceptorji so benzokinon, dihidrokinon, *p*-fenilendiamin in lavrilgalat, bodisi sami po sebi ali pa so reaktivni njihovi oksidativni produkti. Dihidrokinon se na primer lahko oksidira do benzokinona itd. Aktivacija dvojne vezi $\text{C}^\beta = \text{C}^\alpha - \text{X}$ za napad elektrofila je odvisna od sposobnosti skupine X za stabiliziranje negativnega naboja intermediata. Prav tako lahko skupine na C^β , ki so elektron privlačne, aktivirajo dvojno vez, a v manjšem obsegu kot skupine C^α . Zgoraj omenjene spojine so reaktivnejše prav zaradi njihovih skupin X in odsotnosti kakršnihkoli deaktivirajočih substituentov. To tudi pojasni, zakaj je cinamal dovzetenjši za Michaelovo reakcijo kot heksil cinamal. Pri slednjem je dvojna vez deaktivirana s strani alkilne skupine. Pri izevgenolu je

kemizem dokaj zapleten. Predvidevajo, da se oksidira do kinon metida, ki je močan Michaelov akceptor. Njegova elektrofilnost je predvsem zasluga aromatske narave intermedija. (54, 55)



Slika 12: Prikaz poteka Michaelove adicije (56)

4.2 Benzil cinamat

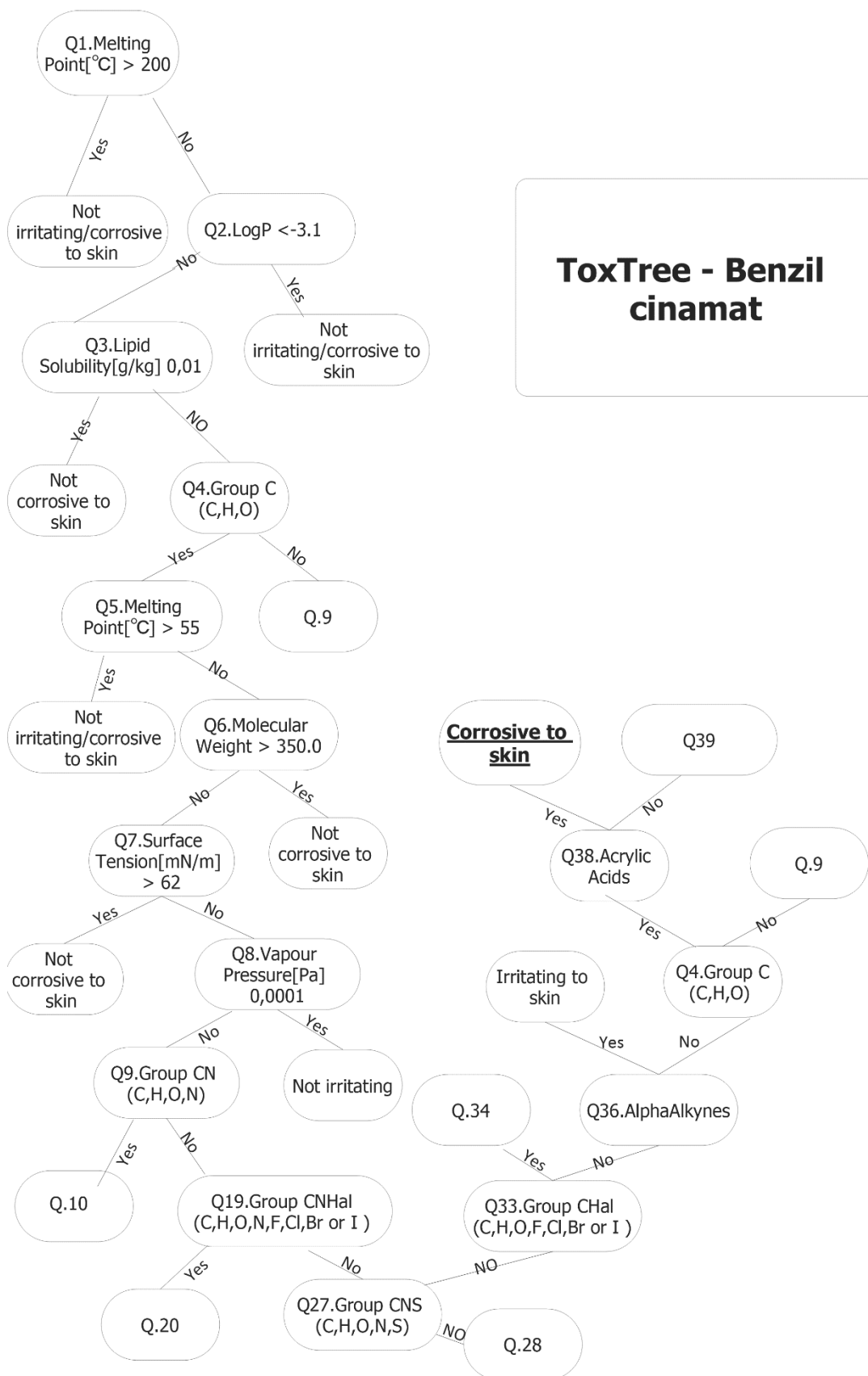
Tabela 14: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov in silico za benzil cinamat

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Koroziven	Šibek senzibilizator – SN2	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA, SN2

a) Draženje

Benzil cinamat je po napovedih aplikacije ToxTree koroziven, kar pomeni, da povzroča ireverzibilne poškodbe kože. Do takšnega zaključka je aplikacija prišla na podlagi prisotnosti fragmenta akrilne kisline. Ravno nasprotno pa računalniški program Derek Nexus na podlagi odsotnosti kakršnihkoli strukturnih alarmov ni spojini pripisal ne dražilnega ne korozivnega potenciala (tabela 14). Glede na temo draženja benzil cinamata je v literaturi kar nekaj podatkov (57, 58) tako iz študij, izvedenih na ljudeh, kot iz študij, izvedenih na živalih.

Dražilni potencial so na ljudeh preverjali s testom HRIPT in preliminarnim maksimizacijskim testom. Pri prvem so uporabili 4-odstotno raztopino benzil cinamata v mešanici dietilftalata : etanola (3 : 1), ki so jo okluzivno nanegli za 24 ur in nato to ponovili devetkrat. Pri ocenjevanju niso opazili nikakršnega draženja. Pri drugem pa so 8-odstotni benzil cinamat v parafinu okluzivno nanegli na 5 moških prostovoljcev. Po 48 urah so ga odstranili in ocenili stanje. Rezultat je bil negativen, saj se draženje ni pojavilo pri nobenem testirancu. Dražilni potencial različnih koncentracij benzil cinamata so pred indukcijsko fazo odprtega epikutanega testa testirali tudi na 8 morskih prašičkih, pri čemer so mesto nanosa pustili nepokrito in po 24 urah ocenili reakcije. Prišli so do zaključka, da je najnižja koncentracija, ki je sprožila blag eritem pri vsaj 25 % testiranih živalih, 3-odstotna raztopina benzil cinamata. Slednjo so označili kot najnižjo dražilno koncentracijo. Potencial draženja so ocenili tudi med študijo akutne dermalne LD₅₀. Študija je potekala na 12 zajcih, pri čemer so rahel eritem opazili pri opazovanju po 1 dnevu. Stopnja eritema se je po 24 urah bistveno zmanjšala, po 48 urah pa so se mesta testiranja vrnila v prvotno stanje. Študije *in vivo* na ljudeh nakazujejo, da benzil cinamat nima dražilnega potenciala, a moramo v zakup vzeti dejstvo, da je število testirancev nizko, torej nam ne pokažejo širše slike. Iz testov *in vivo* na živalih pa lahko sklepamo, da ima benzil cinamat šibko dražilno delovanje. Glede na količine dovoljene uporabe v kozmetičnih izdelkih sklepamo, da spojina na splošno ne povzroča draženja, je pa verjetno lahko problematična za ljudi z občutljivo kožo. Zaključimo lahko, da izmed uporabljenih modelov *in silico* ne Derek Nexus ne ToxTree nista podala točne napovedi. Če bi rezultate primerjali zgolj s podatki iz študij na ljudeh, bi Derek Nexus podal pravilnejšo napoved. Medtem pa se napoved programa ToxTree ne ujema s podatki iz literature, saj ni nobena študija benzil cinamatu pripisala korozivnega delovanja.



Slika 13: »Odločveno drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojino benzil cinamat

b) Senzibilizacija

Pri senzibilizaciji so Derek Nexus, ToxTree in VegaNIC podali složno napoved (tabela 14). Derek Nexus je razvrstil benzil cinamat kot šibek senzibilizator, napoved za ljudi je označil kot dvoumno. ToxTree je prav tako razvrstil benzil cinamat kot senzibilizator, ki lahko reagira tako po mehanizmu MCA kot SN2, slednje pa sovpada z napovedjo programa Derek Nexus. Pri aplikaciji VegaNIC je bil benzil cinamat razvrščen z rdeče obarvano piko, kar pomeni, da je toksičen. Napoved je dobila dve zvezdici, kar pomeni, da je lahko spojina zunaj območja uporabnosti aplikacijske domene. Sicer jo je razvrstil kot senzibilizator, a se fragment OCc (SMILES) pojavi v manj kot treh spojinah iz seta pozitivnih kontrol (angl. *training set*), zato je predvidevanje nezanesljivo. Tudi senzibilizacijski potencial benzil cinamata so testirali tako na ljudeh kot na živalih. S testom HRIPT so ugotavljali senzibilizacijo na 101 prostovoljcu moškega in ženskega spola. Uporabili so 4-odstotni benzil cinamat in kot pri ugotavljanju draženja devetkrat ponovili 24-urni nanos. Po 10–14 dneh počitka so 4-odstotni benzil cinamat nanесли na območje, ki mu predhodno ni bilo izpostavljeno, obliže so odstranili po 24 urah. Področja so ovrednotili 24, 48 in 72 ur po aplikaciji. Senzibilizacije niso zaznali pri nobenem prostovoljcu. Za oceno senzibilizacije so na ljudeh izvedli tudi maksimizacijski test. Uporabili so 8-odstotno raztopino benzil cinamata na 25 prostovoljcih. Tudi pri tej raziskavi so bili rezultati negativni, senzibilizacije pa niso opazili. S 5-odstotnim benzil cinamatom so z okluzivnim obližem testirali tudi 110 pacientov z ekcemi, pri katerih so predhodni krpični testi s perujskim balzomom izzvali reakcijo. Po 48 urah so obliže odstranili in testna območja ovrednotili 10–20 minut ter nato še 72 in 96 ur po odstranitvi. Reakcije na benzil cinamat so opazili pri 21 od 110 pacientov, v drugi podobno izvedeni študiji pa pri 19 od 103 testiranih pacientov. Na 182 pacientih, za katere so sumili, da imajo kontaktno preobčutljivost na kozmetične izdelke, so izvedli krpične teste s standardno serijo Internacionalne skupine za raziskave kontaktnega dermatitisa (ICDRG; angl. *International contact dermatitis research group*) in parfomom, ki vsebuje 22 aromatičnih naravnih sestavin. Reakcije na 8-odstotnem benzil cinamatu v parafinu so opazili pri 3,2 % pacientov. (57, 58)

Tabela 15: Testi senzibilizacije benzil cinamata na morskih prašičkih (57)

Metoda	Koncentracija	Rezultati
GPMT	5 % interdermalna indukcija in 5 % topikalna indukcija FCA; 25 % v parafinu kot testna (angl. <i>challenge</i>) koncentracija	Opazili so senzibilizacijo
Odprt epikutani test	3 % (vehikel ni opisan)	Ni reakcije
Odprt epikutani test	8 % (vehikel ni opisan)	Ni reakcije
Odprt epikutani test	0,0 3–100 % (vehikel ni opisan)	0,3 % je minimalna koncentracija elicitacije; 3 % je minimalna koncentracija, pri kateri je prišlo do senzibilizacije
FCAT (angl. Freund's complete adjuvant test)	Indukcija 50 %; izziv FCA <10 %	Opazili so senzibilizacijo
Modificiran FCAT	Indukcija 1 %, 3 % in 10 % v FCA; izziv 3 % in 10 % v acetonu	Šibek alergen pri 3 % v acetonu → 2/10, pri 10 % → 4/10
Modificiran FCAT	3 % in 10 % v acetonu	Šibka senzibilizacija
Modificiran Draizov test	0,1 % v izotonični raztopini	Opazili so senzibilizacijo

Tabela 16: testi LLNA za napoved senzibilizacije benzil cinamata (57)

Koncentracija (%)	Vrsta	Rezultati
2,5 %, 5 %, 10 %, 25 % in 50 % m/v v zmesi etanol : dietilftalat (1 : 3)	Ženske CBA miši	EC ₃ = 18,4 % (4.600 µg/cm ²) → ocenili so, da je benzil cinamat senzibilizator

Tako Derek Nexus kot VegaNIC sta benzil cinamatu sicer pripisala senzibilizacijski potencial, a sta svoje napovedi podala kot dvoumne. Napovedi programov VegaNIC in Derek Nexus sta tako primerljivi s podatki iz študij *in vivo*. Iz študij na ljudeh lahko povzamemo, da je benzil cinamat verjetno šibek senzibilizator, ki alergijske reakcije sproži predvsem pri ljudeh, ki so bili predhodno nagnjeni k pojavu ekcemov in alergij. Testi senzibilizacije na morskih prašičkih (tabela 15) in testi LLNA (tabela 16) prav tako nakazujejo šibek alergijski potencial benzil cinamata. Tudi ToxTree je spojini pripisal senzibilizacijski potencial, kar je v grobem pravilno, a sta ostali dve metodi *in silico* podali točnejšo napoved.

4.3 Cinamal

Tabela 15: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov *in silico* za cinamal

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
Verjetnost dražilnega potenciala – α,β -nenasičen aldehyd	Koroziven	Senzibilizator	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

a) Draženje/korozija

Cinamal ima po napovedi programa Derek Nexus potencial za draženje, kar aplikacija pripisuje elektrofilni naravi α,β -nenasičenega aldehyda, ki lahko reagira s kožnimi proteini prek mehanizma MCA. ToxTree mu je prav tako napovedal dražilni in korozivni potencial, in sicer na podlagi prisotnosti aldehydne skupine (tabela 17). Pogosta uporaba cinamaldehyda se kaže tudi v številnih študijah *in vivo* dražilnega in senzibilizacijskega potenciala. Študije na živalih (tabela 19) so pokazale, da 3–5-odstotni cinamaldehyd sproži blago draženje pri morskih prašičkih in miših. Pri zajcih pa draženje sproži že 1-odstotni cinamal. Z raziskavami na ljudeh (tabela 18) so prišli do zaključka, da 0,125–1,25-odstotne koncentracije ne povzročajo draženja, 3-odstotni cinamaldehyd ima blag dražilni potencial, 8-odstotna koncentracija pa sproži močno draženje. Povzamemo lahko, da cinamal povzroča draženje, tako da sta Derek Nexus kot ToxTree podala pravilno napoved.

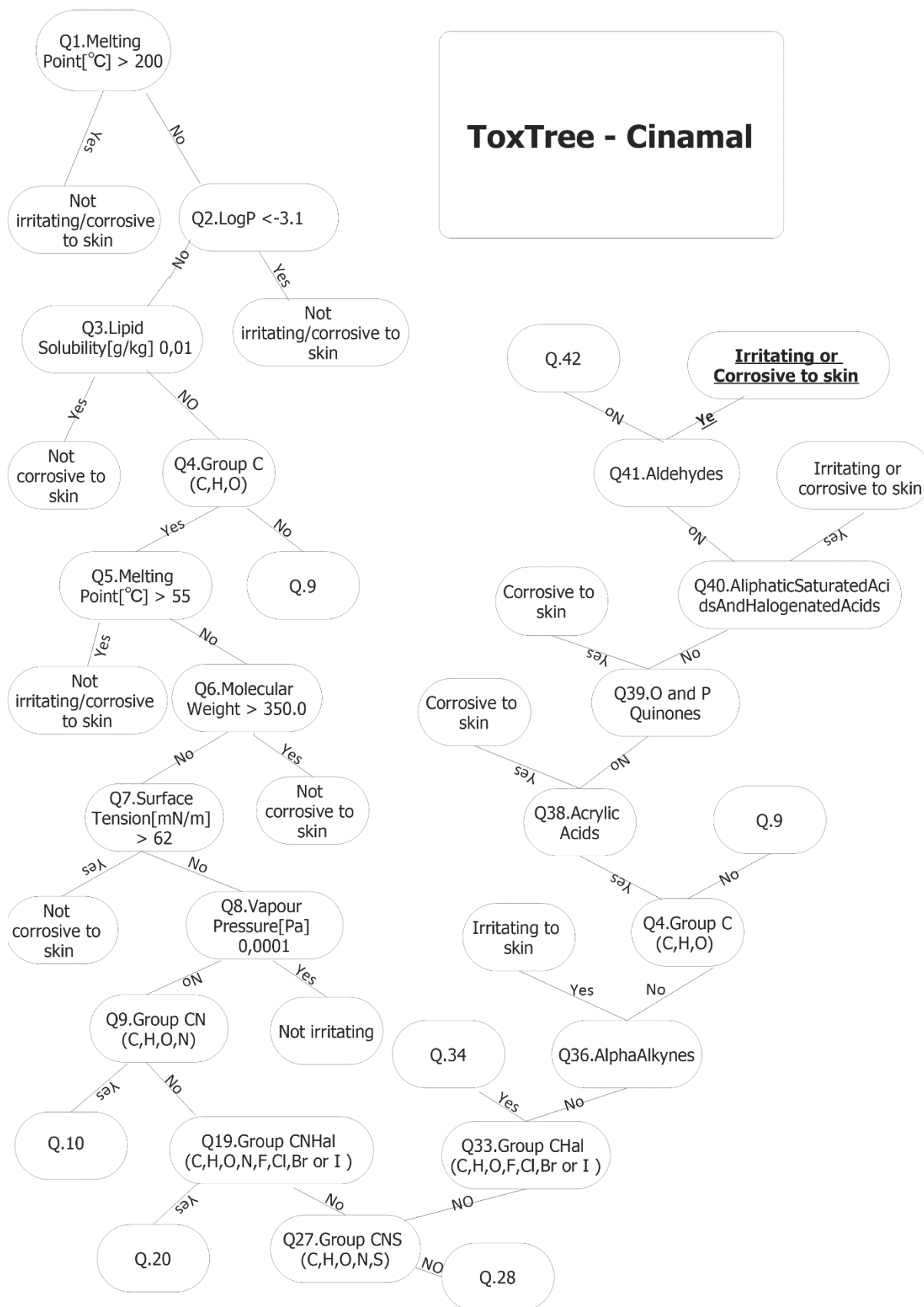
Tabela 16: Testi draženja cinamala na ljudeh (60)

Metoda	Odmerek (%)	Čas izpostavitve (h)	Vehikel	Rezultati
Indukcijska faza (HRIPT)	3 % + α -tokoferol	9 x 24	3 : 1 DEP : EtOH	2/28
Indukcijska faza (HRIPT)	3 % + α -tokoferol	9 x 24	1 : 3 DEP : EtOH	8/30
Indukcijska faza (HRIPT)	1,25	9 x 24	Etanol	0/10
Indukcijska faza (HRIPT)	1,0	9 x 24	Alkohol SDA 39C	0/41
Indukcijska faza (HRIPT)	0,5	9 x 24	Etanol	0/38
Indukcijska faza (HRIPT)	0,5 % + α -tokoferol	9 x 24	3:1 DEP:EtOH	0/22
Indukcijska faza (HRIPT)	0,5 % + α -tokoferol	9 x 24	1:3 DEP:EtOH	0/19
Indukcijska faza (HRIPT)	0,125	9 x 24	Etanol	0/41
Predhodni maksimizacijski test	8	48	Parafin	Hudo draženje 5/5
Predhodni maksimizacijski test	3	48	Butilen glikol	0/5
Predhodni maksimizacijski test	0,5	48	Parafin	0/25
Predhodni maksimizacijski test	0,5	48	Parafin	0/25
Predhodni maksimizacijski test	0,5	48	Parafin	0/25
Predhodni maksimizacijski test	0,5	48	Parafin	0/25

Tabela 17: Testi draženja cinamala na živalih (60)

Metoda	Vrsta	Koncentracija	Rezultati
Evalvacija draženja med akutno dermalno študijo LD ₅₀	Zajci	/	– 1. dan: močen eritem in edem (10/10) – 7. dan: hud eritem + nekrotična koža – 10. dan: nekrotična koža (10/10) + rahel edem (4/10)
Draizov test	9 albino zajcev ženskega spola	0,5 ml nerazredčenega cinamalaldehida za 24 ur	Močno draženje (indeks 4.0) Eritem = 2
Okluzivni krpčni testi	3 albino zajci	1-odstotna raztopina cinamalaldehida za 24 ur	/
Evalvacija draženja med indukcijsko fazo epikutanega testa	6–8 morskih prašičkov	Različne koncentracije cinamalaldehida	Najnižija koncentracija, ki povzroči minimalno iritacijo pri 25 % testiranih živali, je 3 %

ToxTree - Cinamal



Slika 14: »Odločitveno drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojino cinamal

b) Senzibilizacija

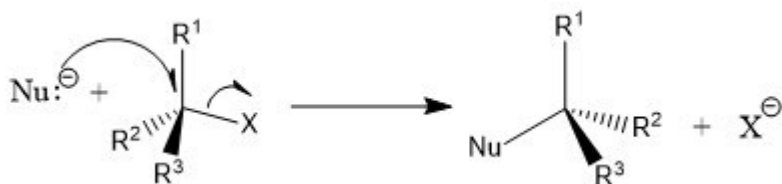
Cinamal se je v napovedi vseh treh aplikacij izkazal kot senzibilizator (tabela 17). Derek Nexus in ToxTree sta napovedala delovanje po mehanizmu MCA. Pri napovedi programa VegaNIC je bil označen z rdeče obarvanim krožcem – toksičen. Gre za zanesljivo predvidevanje na podlagi eksperimentalnih podatkov, spojina je znotraj območja aplikacijske domene. Potencial za senzibilizacijo so potrdili tako s testi LLNA in GPMT, prav tako pa je bila opisana senzibilizacija pri ljudeh (tabela 20). Slednjo so do sedaj preverjali z dvema maksimizacijskima testoma in devetimi testi HRIPT, pri katerih so uporabljali različne vehikle in koncentracije 0,125–3 % na skupno 451 ženskih in moških prostovoljcih. Senzibilizacijo so opazili pri 29 testirancih pri koncentracijah, višjih od 1 %, medtem ko 0,125–0,5-odstotne koncentracije niso sprožile reakcije. Izvedli so tudi študije, kjer so preverjali elicitacijske sposobnosti cinamaldehida pri pacientih, ki so bili že predhodno nanj preobčutljivi. Zanimal jih je pojav alergijskega kontaktnega dermatitisa. Pacienti so 2 tedna dvakrat dnevno uporabljali dezodorant, ki je vseboval 0,032-odstotni cinamaldehyd. V primeru, da po 2 tednih niso opazili nobene reakcije, so v 3. in 4. tednu koncentracijo povišali na 0,1 %, v 5. in 6. tednu pa na 0,32 %. V prvi študiji je vseh 8 testirancev reagiralo na dezodorant (2 pri najnižji, 4 pri srednji in 2 pri najvišji koncentraciji). V drugi študiji so uporabili enako metodo. Ta se je od predhodne razlikovala le po izbranih koncentracijah, uporabili so koncentracije 0,01 %, 0,032 % in 0,1 %, in okluzivnih pogojih. Na 0,01-odstotni cinamal je reagiral 1 od 9 testirancev, na 0,32-odstotnega 4 od 9, na 0,1-odstotnega pa 3 od 9. Prišli so do zaključka, da je majhna nevarnost, da bo pacient, alergičen na cinamaldehyd, razvil klinično alergijsko reakcijo na koncentracije, nižje od 0,01 %, v tipu izdelka, kot je dezodorant. Testi HRIPT so pokazali, da je NOEL za cinamaldehyd za indukcijo senzibilizacije 0,5 %. Senzibilizacijski potencial cinamaldehida so ocenili v 42 študijah na morskih prašičkih ali miših z uporabo testov, kot so maksimizacijski test, Buehlerjev test, modificiran Draizov test, test FCA, zaprti/odprti epikutani test in test LLNA. Uporabljene koncentracije so variirale od 0,1 % do 40 % v različnih vehiklih. Do senzibilizacije je prišlo pri vseh koncentracijah v skoraj vsaki študiji. (59, 60) S primerjavo že znanih podatkov o senzibilizaciji cinamala iz literature z napovedmi, pridobljenimi z metodami *in silico*, lahko zaključimo, da so tako Derek Nexus, ToxTree in VegaNIC podali pravilno napoved. Cinamalu so namreč vsi testi pripisali senzibilizacijski potencial.

Tabela 18: Testi senzibilizacije cinamala na ljudeh (60)

Metoda	Koncentracija (%)	Vehikel	Rezultati
HRIPT	0,5	1 : 3 EtOH : DEP	0/94
HRIPT	3 % + α -tokoferol	1 : 3 EtOH : DEP	4/28
HRIPT	1,25	Etanol	5/10
HRIPT	1,0	Alkohol SDA 39C	5/41
HRIPT	1,0	Etanol	1/55
HRIPT	1,0	Petrolej	0/53
HRIPT	0,5	Etanol	0/38
HRIPT	0,5 % + α -tokoferol	1 : 3 EtOH : DEP	0/22
HRIPT	0,5 % + α -tokoferol	3 : 1 EtOH : DEP	0/19
HRIPT	0,125	Etanol	0/41
HRIPT	0,1	Etanol	0/41
MAX	3	Butilen glikol	3/25
MAX	2	Parafin	11/25

4.3.1 SN_2

SN_2 je ena izmed pomembnejših reakcij v organski kemiji. Gre za nukleofilno substitucijo, pri kateri sodelujeta dve reaktivni spojini – bimolekularna nukleofilna substitucija. Za potek reakcije, ki je prikazana na spodnji sliki (slika 14), sta potrebni elektron donorska spojina (nukleofil) in elektron akceptorska spojina (elektrofil), nujno pa je potreben hibridiziran elektrofil sp^3 z izstopajočo skupino X. Vrsten red reaktivnosti: $CH_3^- > CH_3CH_2^- > (CH_3)_2CH^- > (CH_3)_3C^-$ (61)



Slika 15: Potek reakcije SN_2

4.4 Cinamilni alkohol

Tabela 19: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov in silico za cinamilni alkohol

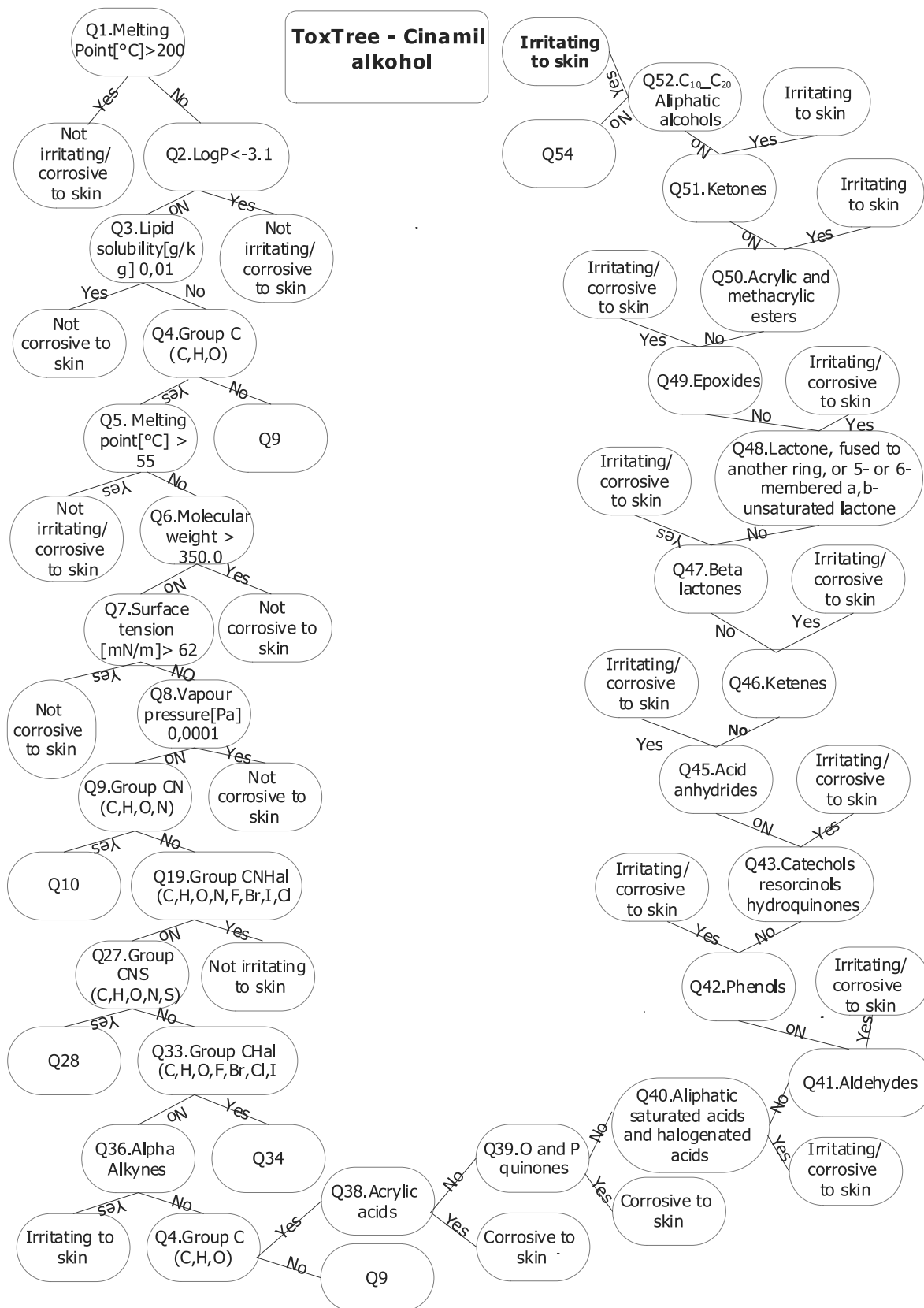
DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Dražilen	/	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

a) Draženje

Tabela 20: Testi draženja cinamilnega alkohola na ljudeh (62)

Metoda	Odmerek (%)	Čas izpostavljenosti (h)	Podlaga	Rezultati
Indukcijska faza (HRIPT)	4	9 x 24	3 : 1 DEP : EtOH	0/54
Indukcijska faza (HRIPT)	4	9 x 24	1 : 3 DEP : EtOH	0/55
Predhodni maksimizacijski test	10	48	Parafin	0/182
Predhodni maksimizacijski test	10	48	Hidrofilno mazilo	0/25
Predhodni maksimizacijski test	10	48	DEP	0/284

Pri ugotavljanju draženja cinamilnega alkohola si rezultata, pridobljena s programoma Derek Nexus in ToxTree, nasprotujeta (tabela 21). Derek Nexus ni zaznal strukturnih alarmov, ki bi kazali na dražilno delovanje cinamilnega alkohola, medtem ko je ToxTree zanj predvidel dražilni potencial. S študijami na ljudeh (tabela 22) so prišli do zaključka, da cinamilni alkohol v koncentracijah do 10 % ne povzroča draženja. Pri testih *in vivo* na zajcih so se reakcije razlikovale od izredno blagega do močnega draženja, 10-odstotni cinamilni alkohol je na primer pri morskih prašičkih povzročil blago draženje. (62) Zaključili bi lahko, da cinamilni alkohol v kozmetiki ne predstavlja dražilnega potenciala. V tem primeru je točnejši rezultat podal Derek Nexus.



Slika 16: »Odločitvenego drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojino cinamilni alkohol

b) Senzibilizacija

Podobno je tudi pri napovedi senzibilizacijskega potenciala. Derek Nexus ni zaznal nobenih senzibilizacijskih alarmov, ToxTree in VegaNIC pa sta napovedala potencial za senzibilizacijo (tabela 21). ToxTree je predvidel delovanje po mehanizmu MCA. Program VegaNIC je napoved podal na osnovi eksperimentalnih podatkov. Označil jo je kot zanesljivo, saj je v območju aplikacijske domene. Izvedene so bile tudi številne študije z namenom ugotavljanja senzibilizacijskega potenciala cinamil alkohola tako pri ljudeh kot pri živalih. Skupno so izvedli 23 maksimizacijskih testov na ljudeh. 21 testov so izvedli na 527 testirancih z 10-odstotnim cinamilnim alkoholom in 2 dodatna maksimizacijska testa s 4-odstotnim cinamilnim alkoholom na 49 testirancih. Pri 10-odstotnem cinamilnem alkoholu je prišlo do senzibilizacije pri 79 ljudeh od 527, pri testih s 4-odstotnim alkoholom pa senzibilizacijskih reakcij niso opazili pri nobenem testirancu. Podatki iz testa HRIPT so pokazali, da je 4-odstotni cinamilni alkohol v podlagi iz EtOH/DEP povzročil reakcijo pri 3 subjektih od skupnih 109 testirancev. Ob ponovnem 24-urnem testiranju pri treh različnih pogojih (okluziven, semiokluziven in odprt test) je prišlo do reakcije zgolj pri okluzivnem testu. Senzibilizacijski potencial cinamilnega alkohola so ocenili v 24 študijah na morskih prašičkih ali miših z uporabo testov, kot so maksimizacijski test, Buehlerjev test, modificiran Draizov test, test FCA, zaprti/odprti epikutani test. Uporabljene koncentracije so variirale od 1 % do 100 %. Senzibilizacijo so opazili pri vseh koncentracijah, višjih od 1 %. (59, 62) Rezultati študij si nasprotujejo in jih je posledično težko dati na skupni imenovalec. Glede na teste *in vivo* na živalih, pri katerih je prišlo do senzibilizacije, bi lahko povzeli, da sta programa ToxTree in VegaNIC podala točnejšo napoved od programa Derek Nexus. Po drugi strani pa izredno nizka frekvenca pojava alergijskih reakcij na cinamilni alkohol v študijah *in vivo* na ljudeh bolj podpira negativno napoved aplikacije Derek Nexus.

4.5 Kumarin

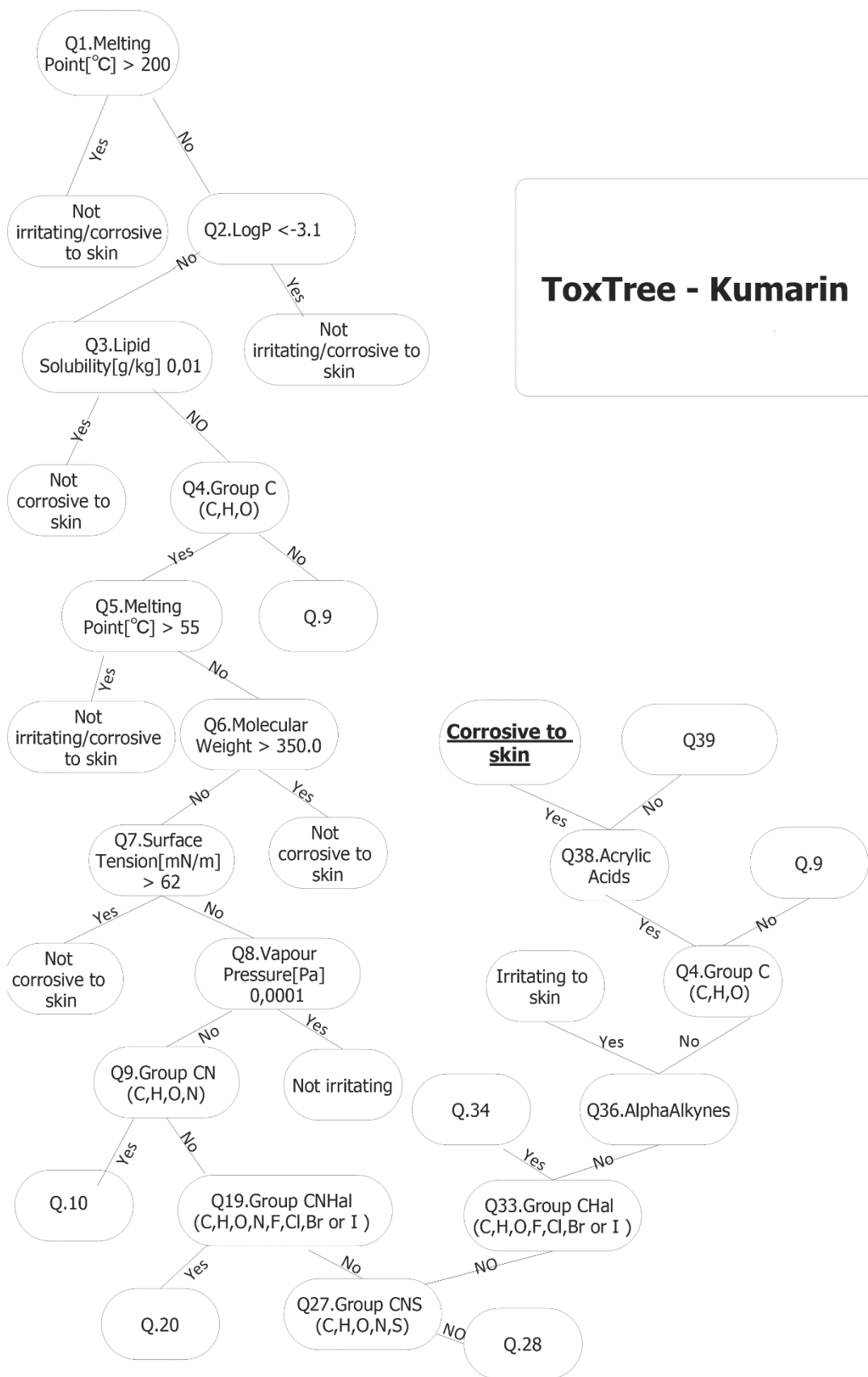
Tabela 21: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov in silico za kumarin

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Koroziven	Fotosenzibilizator	Ni senzibilizator	Senzibilizator – MCA

Kumarin se v kozmetičnih izdelkih pojavlja v koncentracijah od 0,5 % do 6,4 %. V študiji iz leta 1998 so ugotovili, da je bil kumarin prisoten v kar 57 od 73 dezodorantov, takrat dostopnih na evropskem trgu. (66)

a) Draženje

ToxTree je kumarin na podlagi prisotnosti skupine, ki spominja na akrilno kislino, razvrstil kot korozivnega. Ponovno je Derek Nexus podal nasprotno napoved (tabela 23), saj ni zaznal strukturnih alarmov, ki bi nakazovali dražilno delovanje kumarina. O dražilnem potencialu kumarina nismo našli drugih literaturnih podatkov in posledično ne moremo oceniti zanesljivosti napovedi uporabljenih računalniških programov.



Slika 17: »Odločitveno drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojino kumarin

b) Senzibilizacija

Napovedi programov za senzibilizacijski potencial se razlikujejo (tabela 23). ToxTree je kumarin razvrstil kot senzibilizator, ki deluje po mehanizmu MCA, medtem ko je VegaNIC presodil, da kumarin nima alergenegega potenciala. Derek Nexus je kumarinu pripisal možno (angl. *plausible*) fotoalergeno delovanje, in sicer na podlagi fotomaksimizacijskih študij *in vivo* fotoalergenosti derivatov kumarina na ljudeh. Na temo senzibilizacije so bile prav tako izvedene študije *in vivo* na ljudeh in živalih. Prišli so do zaključka, da 99,9-odstotni čisti kumarin ne povzroča senzibilizacije.

1. Študije na ljudeh

1.1 Maksimizacijski test (Kligman 1966), ki so ga izvedli na 25 prostovoljcih z 8-odstotnim kumarinom v petroleju, ni pri nobenem od testirancev sprožil alergijske reakcije.

1.2 379 pacientov, ki so prišli na evaluacijo potencialnega kontaktnega dermatitisa, so testirali z različnimi potencialno alergeni snovmi. Prvih 100 so testirali s »patch« testom z 1-odstotnim in 10-odstotnim kumarinom, ostalih 279 pa samo z 2-odstotnim kumarinom. Zgolj 1 pacient je reagiral na številne kemikalije, vključno z 2-odstotnim kumarinom. Drugih reakcij na kumarin niso zaznali.

1.3 Testirali so 100 pacientov, alergičnih na standardno dišavno mešanico, s »patch« testom. Uporabili so 2-odstotni kumarin. Zgolj 1 pacient je imel pozitiven odziv.

1.4 S krpičnim testom so testirali 30 pacientov, alergičnih na svoje lastne parfume, z 2-odstotnim kumarinom. Noben pacient ni pozitivno reagiral na kumarin. (63, 64, 65)

2. Študije na živalih

Izvedli so študijo LLNA (tabela 24), pri kateri so uporabili štiri skupine po 4 živali. Testirali so 25 µL 10-, 25- in 50-odstotnega kumarina v N,N-dimetilformamidu (DMF). Testno spojino so mišim 3 zaporedne dni aplicirali na hrbtišče obeh ušes. Po 5 dneh prvotne aplikacije so živali žrtvovali in jim odstranili limfne vozle.

Tabela 22: Test LLNA senzibilizacije za kumarin (66)

Koncentracija (%)	Stimulacijski indeks (SI)		
	99,9-odstotni kumarin	Kumarin A	Kumarin B
10	1,9	0,9	1,9
25	1,8	2,05	3,7
50	2,4	3,2	3,5

Prišli so do zaključka, da zgolj kumarina A in B, ki imata primesi, sprožita kontaktno hipersenzibilizacijo ($SI > 3$ pri 25 % in 30 %), medtem ko 99,9-odstotni čisti kumarin ne izzove senzibilizacije ($SI < 3$). Izvedli so večje število študij LLNA s kumarini, katerih čistota ni bila deklarirana, nekateri so sprožili hipersenzibilizacijo, nekateri pa ne. Zaključimo lahko, da 99,9-odstotni čisti kumarin ne sproži alergijske reakcije pri testih LLNA. (66)

Težko je primerjati rezultate in sestaviti končno sliko senzibilizacijskega potenciala kumarina, saj se na evropskem tržišču pojavljajo kumarini z različnimi vrstami in koncentracijami primesi. To predstavlja problem tudi pri primerjanju rezultatov različnih študij. Prav tako je posledično težko reči, kateri izmed uporabljenih računalniških programov/ekspertnih sistemov je podal pravilno napoved.

4.6 Evgenol in izoevgenol

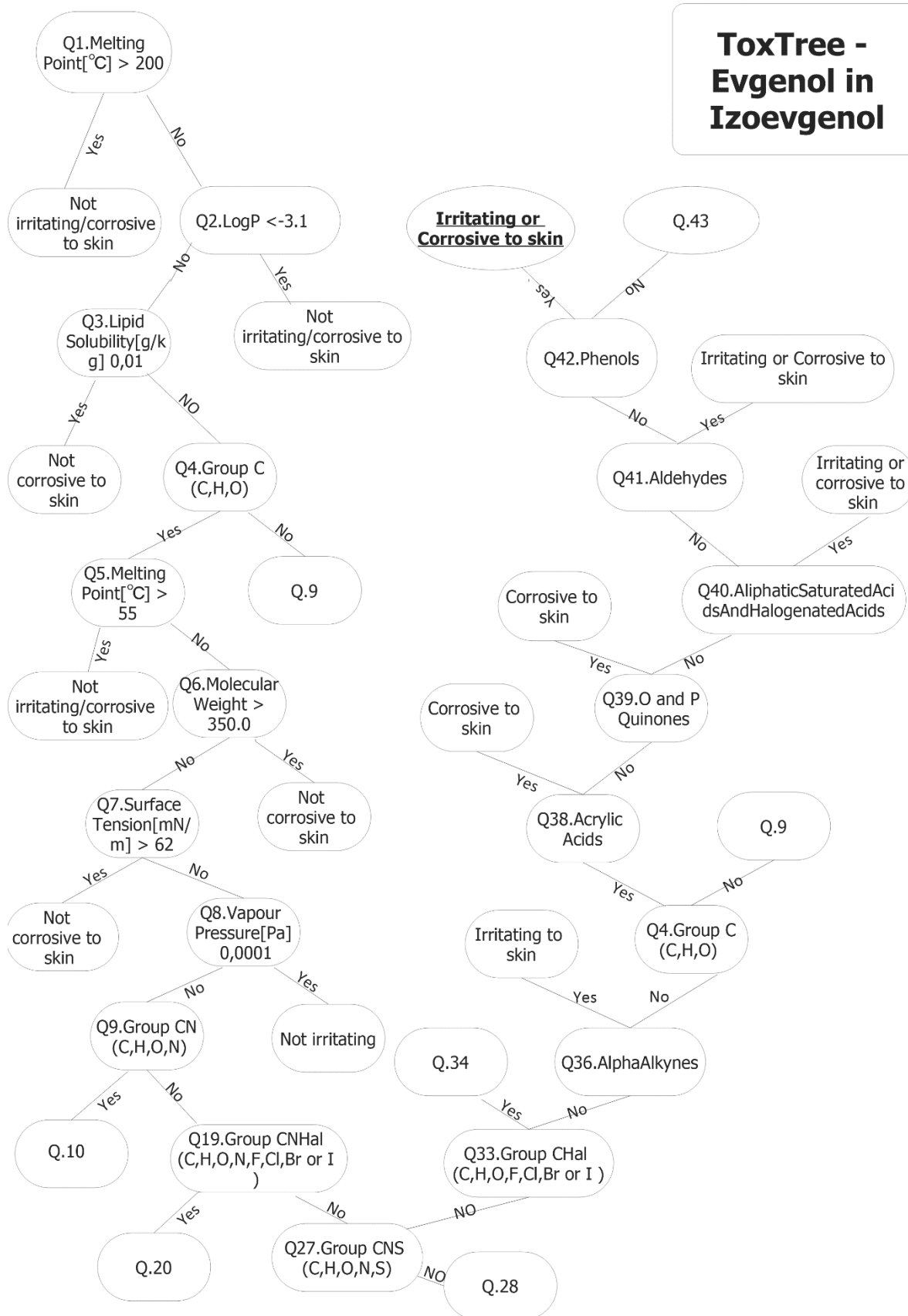
Tabela 23: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov *in silico* za evgenol in izoevgenol

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Dražilen/koroziven	Srednje močan senzibilizator	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

a) Draženje

Evgenol je po napovedi aplikacije ToxTree dražilen oziroma koroziven, in sicer na podlagi prisotnosti fenolne skupine v osnovni strukturi. Derek Nexus ni zaznal strukturnih fragmentov, ki bi namigovali na kakršenkoli dražilni potencial. Enake izide testov dobimo tudi za izoevgenol. Zaradi nasprotujočih si rezultatov uporabljenih metod *in silico* (tabela 25) in odsotnosti drugih študij *in vivo* ali *in vitro* težko zaključimo, ali imata izoevgenol in evgenol dražilni potencial ali ne.

ToxTree - Evgenol in Izoevgenol



Slika 18: »Odločitveno drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojini evgenol in izoevgenol

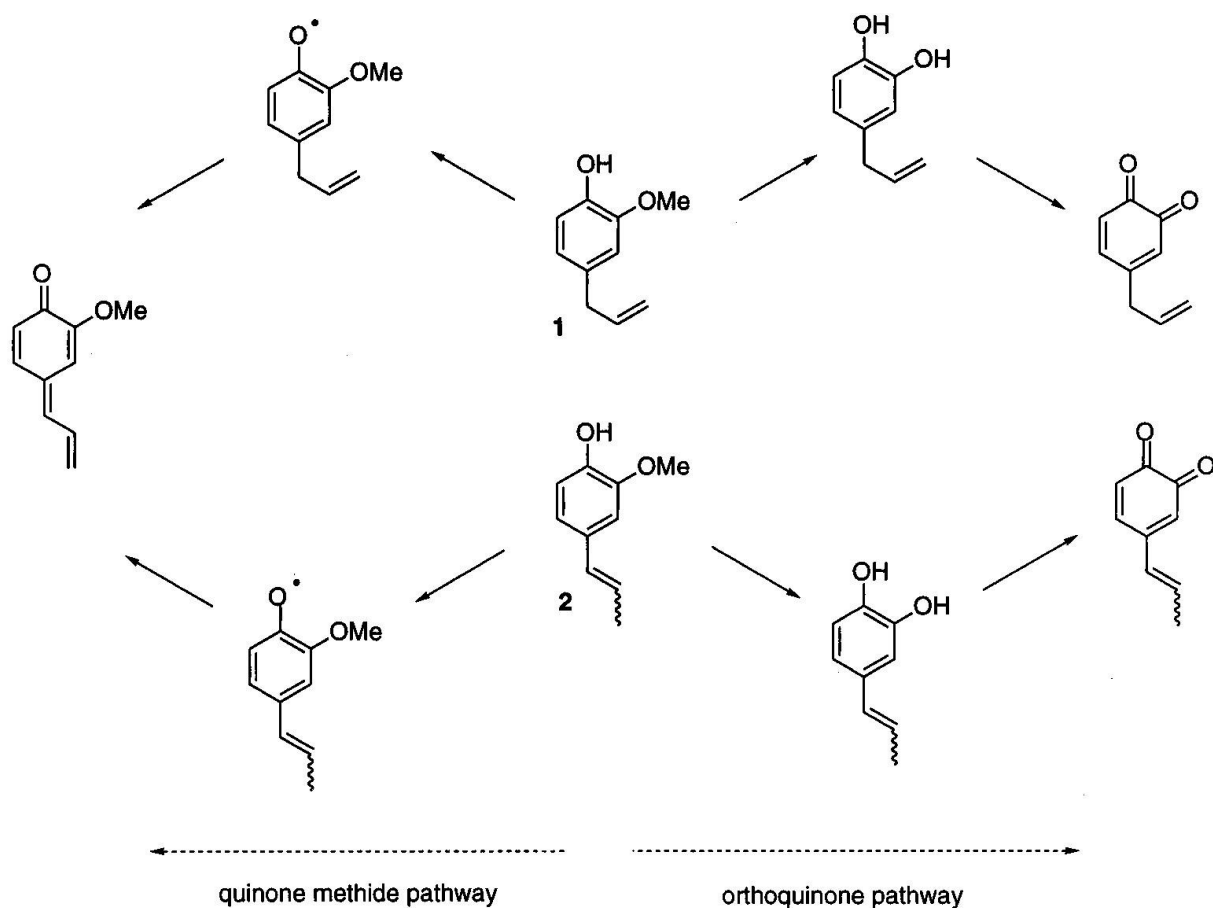
b) Senzibilizacija

Izoevgenol in evgenol sta kategorizirana kot alergene spojine, ki povzročajo alergeni kontaktni dermatitis. Izmed omenjenega para je izoevgenol veliko močnejši alergen in je zato njegova uporaba v potrošniških izdelkih bolj omejena. Tako evgenol kot izoevgenol s proteini v koži ne reagirata neposredno, temveč lahko konjugate tvorita po različnih metabolnih aktivacijah. Prek raziskav so prišli do zaključka, da sta dve najverjetnejši metabolni poti, po kateri izoevgenol in evgenol tvorita haptene, oksidacija in tako imenovan »mehanizem strupenega bršljana« (angl. *poison ivy mechanism*) (slika 15).

1. Oksidacija: nastanek fenolnega radikala, ki lahko tvori haptene bodisi prek reakcije na nesubstituirani *ortopoziciji* bodisi prek tvorbe reaktivnega intermediata – kinon metida.

2. »Poison ivy mechanism«: tvorba 4-alkilkateholov prek demetilacije *in vivo*. Ti nato tvorijo haptene prek mehanizma »poison ivy«. Ta vključuje oksidacijo do *o*-kinona, ki igra vlogo elektrofilnega Michaelovega akceptorja za nukelofilne proteine.

Pri napovedi senzibilizacije evgenola so se napovedi vseh treh programov ujemale. Derek Nexus je evgenol označil kot močan ali srednje močan senzibilizator. Do senzibilizacije pride prek tvorbe novih antigenov po reakciji haptena s kožnimi proteini bodisi po radikalnem fenolnem mehanizmu bodisi po metabolni pretvorbi v aktivne *ortokinone*. ToxTree je predvidel, da evgenol povzroča alergijo po mehanizmu MCA. Napoved aplikacije VegaNIC, narejena na osnovi eksperimentalnih podatkov, sovпада z ostalimi. Substanca je v območju aplikacijske domene, torej je napoved zanesljiva. Identične podatke iz vseh treh aplikacij smo dobili tudi za izoevgenol. S testi GPMT (tabela 26) in LLNA (tabela 27) so prišli do zaključka, da sta evgenol in izoevgenol potencialna senzibilizatorja, pri čemer se je tako pri študijah na miših kot pri študijah na morskih prašičkih izoevgenol izkazal kot močnejši alergen. (67, 68, 69, 70, 71) V primeru evgenola in izoevgenola se podatki iz študij *in vivo* ujemajo z rezultati vseh treh uporabljenih računalniških programov, kar pomeni, da so Derek Nexus, ToxTree in VegaNIC podali zanesljivo napoved. Vse študije so jima namreč pripisale senzibilizacijski potencial.



Slika 19: Potencialne reakcijske poti za senzibilizacijo kože evgenola (1) in izoevgenola (2) (68)

Tabela 24: Rezultati testa GPMT za evgenol in izoevgenol (67)

Spojina	Koncentracije			Rezultati (% morskih prašičkov, pri katerih je prišlo do reakcije)	Nastanek eritema
	Indukcijska injekcija	Indukcijski obliž	Izzivni obliž		
Izoevgenol	0,15 %	25 %	5,0 %	100 %	1,6
Evgenol	0,05 %	75 %	25 %	30 %	1,1

Tabela 25: Rezultati testov LLNA za evgenol in izoevgenol (68)

Spojina	Koncentracija (w/w%)	SI (stimulacijski indeks)
Evgenol	Kontrola	/
	10 (0,61M)	5,4
	25 (1,52M)	5,5
	50 (3,05M)	16,1
Izoevgenol	Kontrola	/
	2,5 (0,15M)	8,5
	5 (0,30M)	12,1
	10 (0,61M)	16,5

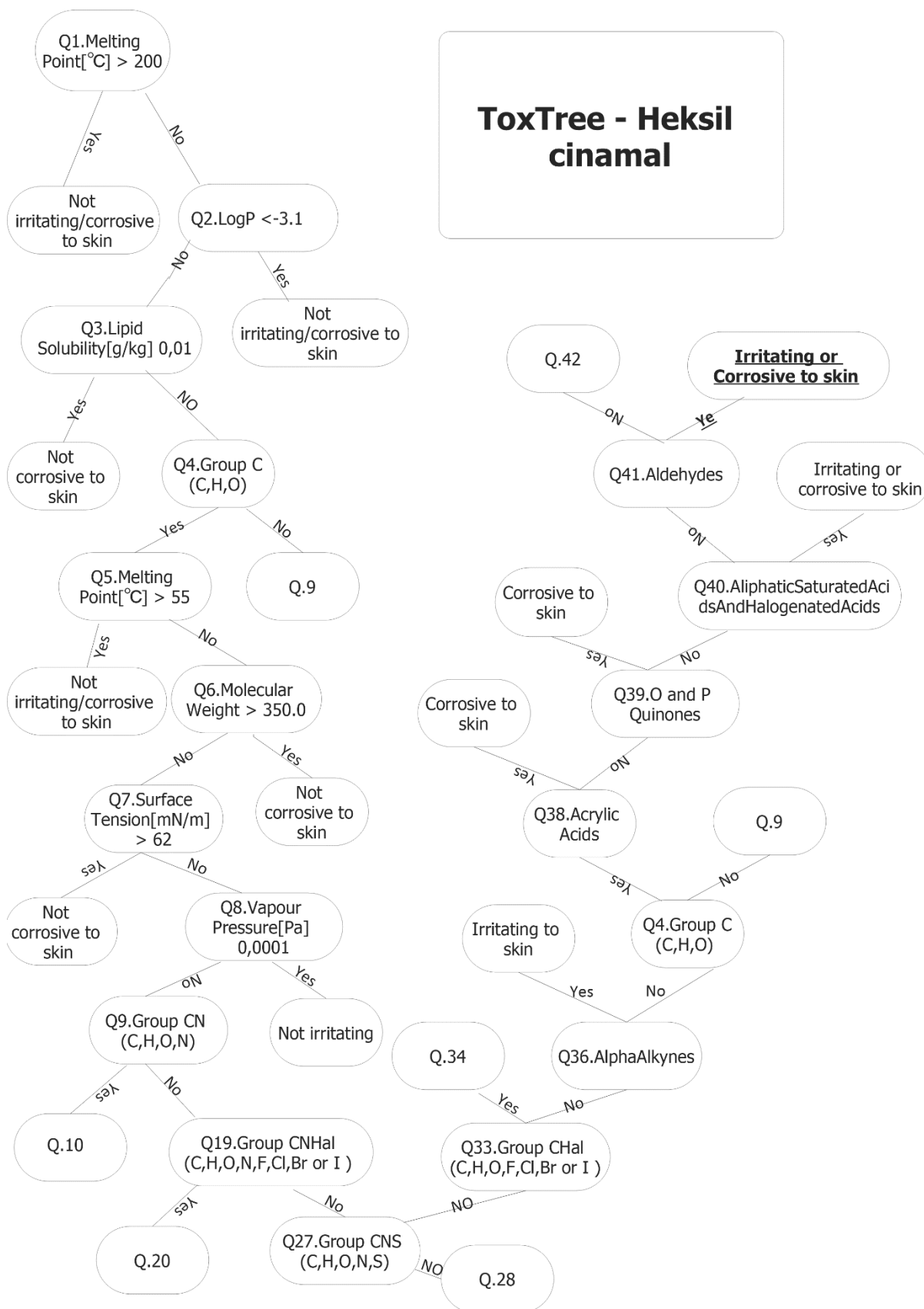
4.7 Heksil cinamal

Tabela 26: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov in silico za heksil cinamal

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Dražilen/koroziven	Možen senzibilizator – MCA	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

a) Draženje

Za heksil cinamal aplikacija Derek Nexus ni zaznala strukturnega alarma, po katerem bi presodili, da ima spojina dražilno/koroziven potencial. Nasprotno je računalniški program ToxTree za heksil cinamal napovedal dražilno oziroma celo korozivno delovanje (tabela 28). Do takšnega zaključka je prišel na podlagi prisotnosti aldehidne skupine v strukturi spojine. Na voljo ni bilo nobenih podatkov iz študij *in vivo*, *in vitro* ali drugih študij *in silico* o dražilnem potencialu heksil cinamala. Posledično težko zaključimo, katera napoved je pravilnejša.



Slika 20: »Odločitveno drevo« (angl. Decision tree) programa ToxTree za spojino heksil cinamal

b) Senzibilizacija

Heksil cinamal je pogosta sestavina v parfumih, saj ga letno na svetovni ravni porabimo več kot 5000 ton. Spojina je splošno poznana kot senzibilizator. Leta 1992 je bila vključena v smernice OECD kot pozitivna kontrola za senzibilizacijski potencial dišav. Heksil cinamal ima strukturne elemente, ki lahko kovalentno reagirajo s kožnimi proteini. Potencialna mehanizma vezave sta bodisi Michaelova adicija ali nastanek Schiffove baze. Ta lahko vodi zgolj do izjemno šibkega senzibilizacijskega potenciala. Prav tako je zmožnost poteka Michaelove adicije heksil cinamala omejena s strani elektron donorskih sposobnosti heksilne verige, saj ta močno zmanjša dipol α,β -nenasičene dvojne vezi, ki je središče reakcijskega mehanizma. Senzibilizacijo heksil cinamala so preverjali tako s testi *in vitro* kot *in vivo*. *In vitro* so spojino testirali s testom DPRA – Keratinosens® in testom h-CLAT. Izida testov sta si nasprotujoča, saj so pri metodi DPRA dobili pozitiven rezultat, pri testu h-CLAT pa negativen rezultat. Iz metod *in vitro* je tako težko karkoli zaključiti. Heksil cinamal izzove pozitivne rezultate tako pri testu GPMT kot pri testu Buehler. Ponovljivost slednjih testov je relativno slaba, uporabljene koncentracije pa dokaj visoke (10–50 %). Prav tako kot pri testih na morskih prašičkih pa so pozitivne rezultate za senzibilizacijski potencial dobili tudi pri testih LLNA, ki imajo za razliko od GPMT in Buehler-jevega testa boljšo ponovljivost. S testom LLNA so dobili vrednost EC3 okoli 10 %, kar ga uvršča med šibke senzibilizatorje. Heksil cinamal so testirali tudi na ljudeh, in sicer so s testom HRIPT, pri katerem so uporabili 20-odstotni heksil cinamal, določili, da je NOAEL $2.314,622 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Pri tem moramo upoštevati, da ne poznamo obnašanja spojine pri višjih koncentracijah in da je moč napovedi nizka, saj je pri testu sodelovalo le okoli 100 osebkov. V razmeroma veliki raziskavi v Nemčiji so identificirali le tri primere pozitivnega odziva na heksil cinamal. V madžarski selektivni študiji osebkov, alergičnih na dišave, pa je prišlo do alergijskega odziva pri 20 testirancih – 3,5 %. Zaradi nizkega števila pozitivnih diagnostičnih krpičnih testov se lahko vprašamo, ali bi lahko prišlo do reakcij zaradi navzkrižne reaktivnosti s spojinami, ki imajo močnejši senzibilizacijski potencial, na primer amil cinamal, cinamal in cinamilni alkohol. (72) Vsi trije testi *in silico* so ga uvrstili med senzibilizatorje. ToxTree je predvidel, da senzibilizacijo sproži po mehanizmu Michaelove adicije. Derek Nexus ga je označil kot možnega (angl. *plausible*) senzibilizatorja. VegaNIC je heksil cinamalu na podlagi eksperimentalnih podatkov prav tako napovedal senzibilizacijsko delovanje. Napoved je označil kot zanesljivo, saj je spojina v aplikacijskem območju modela. Na podlagi rezultatov iz testiranj *in vitro*, *in vivo* ter *in silico* bi lahko zaključili, da ima heksil cinamal nedvomno

alergeni potencial. Nasprotno si podatke nekaterih študij pa bi lahko pripisali dejstvu, da je heksil cinamal verjetno izredno šibek senzibilizator.

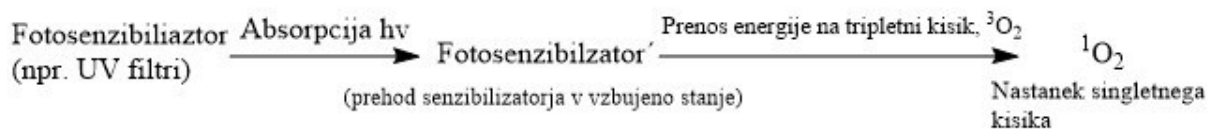
4.8 Etilheksil metoksicinamat in izoamil *p*-metoksicinamat

Tabela 27: Napovedi dražilnega in senzibilizacijskega potenciala programov in silico za etilheksil metoksicinamat in izoamil *p*-metoksicinamat

DRAŽENJE/KOROZIJA		SENZIBILIZACIJA		
DEREK NEXUS	TOXTREE	DEREK NEXUS	VEGANIC	TOXTREE
/	Koroziven	Fototoksičnost	Senzibilizator	Senzibilizator – MCA

Za oba UV-filtra smo s programi dobili enake rezultate. Zopet sta si v napovedi dražilnega/korozivnega potenciala nasprotovala Derek Nexus in ToxTree (tabela 29). Prvi za omenjeni spojini ni napovedal dražilnega delovanja, saj ni zaznal nobenih strukturnih alarmov. ToxTree pa je obema spojinama pripisal korozivni potencial in potencial za senzibilizacijo po mehanizmu MCA. Derek Nexus je napovedal, da sta spojini fotosenzibilizatorja, kar pomeni, da povzročata fotoalergijske reakcije. Gre za reakcijo, ki nastane po absorpciji svetlobe fotoalergenih snovi, prisotnih na koži. Svetloba primerne valovne dolžine povzroči prehod snovi v aktivno stanje in posledično najpogosteje vodi v nastanek radikalnih zvrsti, ki nato reagirajo s proteini v koži, kar povzroči indukcijo ali elicitacijo alergijskega odziva, ki je identičen odzivu pri kontaktni alergiji. Reakcija lahko poteče neposredno ali posredno po metabolizmu. Alkil metoksicinamati so pogoste sestavine v kremah za zaščito pred soncem in igrajo vlogo UV-filtrov, ki zmanjšajo obseg UV-sevanja, ki doseže poroženelo plast kože. Številni UV-filtri so fotoalergeni oziroma povzročajo alergijske kontaktne reakcije. Kljub porastu uporabe sončnih krem pa ostaja incidenca alergij precej nizka. Za oba estra je študija Nernmanna in Spelmannna pokazala, da povzročata fotoalergijsko reakcijo. Pri predhodno fotosenzibiliziranih posameznikih so bili namreč opisani pozitivni fotokrpični testi. Kljub temu pa mehanizem, po katerem ti dve spojini delujeta, še ni popolnoma razjasnjen. Raziskave nakazujejo, da pride do tvorbe singletnega kisika in potencialno tudi do nastanka haptenov. Slednji so proteinski adukti, ki so posledica vključitve 4-metoksicimetne kisline v DNA pod vplivom UV-sevanja. Najpogostejša pot nastanka singletnega kisika je prav fotosenzibilizacija. Fotosenzibilizator absorbira UV-svetlobo, kar povzroči prehod spojine v vzbujeno stanje. Posledično pride do prenosa energije na tripletni kisik in do nastanka singletnega kisika. (71)

Nastanek singletnega kisika s fotokemijsko reakcijo

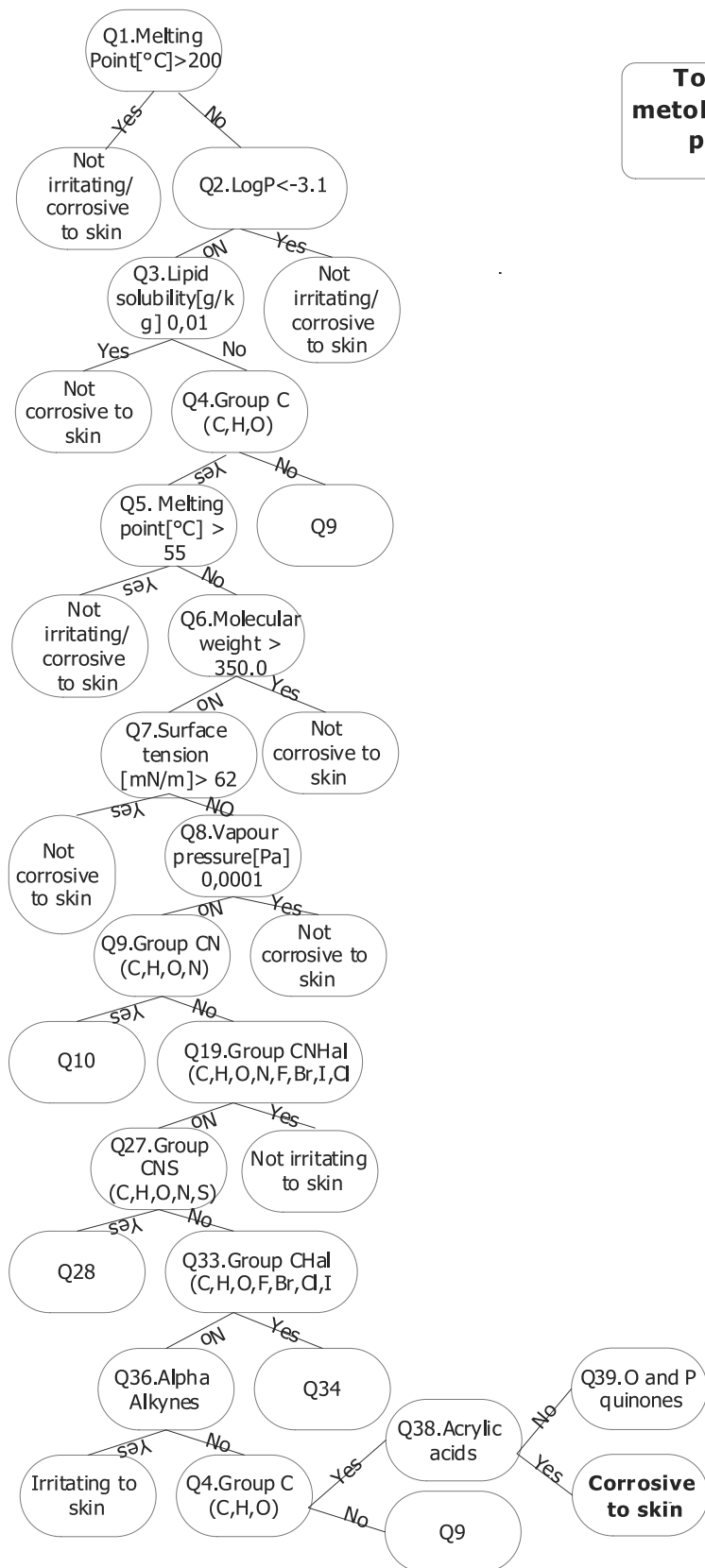


Slika 21: Fotokemijski nastanek singletnega kisika v koži (74)

Tudi VegaNIC je za UV-filtra napovedal, da imata senzibilizacijski potencial. Pri obeh so bile tri rumeno obarvane zvezdice, kar pomeni, da gre za zanesljivo napoved, saj sta spojini znotraj območja aplikacijske domene. Oktil metoksicinamat je eden izmed najpogosteje uporabljenih UV-filtrov, ki primarno ščitijo pred UVB-sevanjem. Med letoma 1989 in 1996 je na primer bil kar v 65 % sončnih krem na nemškem trgu. Kljub njegovi visoki frekvenci pojavnosti pa je incidenca alergijskih/fotoalergijskih reakcij v povezavi z njim razmeroma nizka. Pojavnost izoamil *p*-metoksicinamata je na splošno nižja. Sprožil je 4 alergijske in 10 fotoalergijskih reakcij. V raziskavah so pri 6 pacientih opazili navzkrižne reakcije. Pacient, občutljiv na izoamil *p*-metoksicinamat, se je alergijsko odzval na cinamilni alkohol in cinamaldehyd, drugi na perujski balzam in tretji le na cinamaldehyd. (75) Mnenje o izoamil *p*-metoksicinamatu je podal tudi Znanstveni komite za varstvo potrošnikov (SCCS; angl. *Scientific committee on consumer safety*). Menijo, da so bile za draženje/korozijo izvedene primerne raziskave, ki so podale negativne rezultate. Izvedeni so bili tudi testi na ljudeh, ki prav tako niso pokazali nobenih škodljivih učinkov. Podali so tudi mnenje o senzibilizacijskem potencialu. Na podlagi eksperimentov na živalih in ljudeh so prišli do zaključka, da izoamil *p*-metoksicinamat ne sproži alergijske reakcije. Enako velja za fotoalergijske reakcije. (76) Izvedli so tudi študijo, v kateri so ugotavljali, ali posamezniki, alergični na derivate cimetine kisline, reagirajo tudi na cinamatne UV-filtre. Uporabili so fotokrpični test na 18 testirancih. 13 ljudi je imelo pozitiven odziv na eno ali več spojin, kot so cinamilni alkohol, cinamal, izoevgenol, nobeden izmed 18 testirancev pa ni pozitivno reagiral ne na izoamil *p*-metoksicinamat ne na etilheksil metoksicinamat. Povzamemo lahko, da je pojav alergijskega kontaktnega dermatitisa s strani teh UV-filtrov malo verjeten. V zakup pa je treba vzeti dejstvo, da je bila študija izvedena na majhnem številu ljudi. (77) Ob primerjavi podatkov iz literature z rezultati uporabljenih testov *in silico* lahko zopet zaključimo, da je aplikacija Derek Nexus podala zanesljivejšo napoved za dražilni potencial UV-filtrov kot ToxTree. Vse študije *in vivo* so izoamil-*p*-metoksicinamat in etilheksil metoksicinamat označile za nedražilni substanci, kar se ujema z napovedjo programa Derek Nexus. ToxTree pa jima je napovedal dražilni potencial, kar se z že obstoječimi literaturnimi

podatki ne ujeta. Podatki *in vivo* za senzibilizacijski potencial se nekoliko razlikujejo, nekateri se ujemajo z rezultati uporabljenih metod *in silico*, ki so podali složno napoved. Medtem ko druge študije, med drugimi tudi mnenje SCCS, spojin ne označujejo kot senzibilizatorja. Posledično je zaradi nasprotujočih si podatkov težko priti do skupnega zaključka.

ToxTree - Etilheksil metoksicinamat in izoamil p-metoksicinamat



Slika 22: »Odločitveno telo« (angl Decision tree) programa ToxTree za spojini etilheksil metoksicinamat in izoamil p-metoksicinamat

5 SKLEP

Metode *in silico* so lahko dostopen, preprost in cenovno ugoden način napovedovanja toksikoloških parametrov kemikalij. Programi so, z izjemo aplikacije Derek Nexus, brezplačni in tako na voljo širši množici. ToxTree in Derek Nexus lahko ocenita dražilni in senzibilizacijski potencial, aplikacija VegaNIC pa ima zgolj modul za napoved senzibilizacijskega potenciala.

Za dražilni/korozivni potencial je na voljo nekoliko manj znanih podatkov spojin, zato je bilo težje primerjati napovedi, pridobljene z metodami *in silico*. V kar 9 od 10 primerov si rezultati napovedi potenciala draženja programov Derek Nexus in ToxTree nasprotujejo:

- amil cinamalu, izoevgenolu, evgenolu, heksil cinamalu in kumarinu program Derek Nexus na podlagi odsotnosti strukturnih alarmov ni pripisal dražilnega delovanja. ToxTree pa jih je označil za dražilne oziroma celo korozivne spojine. Zaradi odsotnosti kakršnihkoli podatkov o dražilnem potencialu teh spojin v literaturi ne moremo oceniti, kateri izmed programov je podal pravilnejšo napoved;
- etilheksil metoksicinamatu, izoamil *p*-metoksicinamatu, cinamilnemu alkoholu in benzil cinamatu aplikacija Derek Nexus prav tako ni pripisala dražilnega potenciala, medtem ko jim je ToxTree pripisal dražilni oziroma korozivni potencial. Že znani podatki študij *in vivo* ter *in vitro* nakazujejo, da spojine ne delujejo dražilno oziroma korozivno. V navedenih primerih je torej napoved programa Derek Nexus zanesljivejša od napovedi programa ToxTree;
- cinamalu sta obe aplikaciji pripisali dražilno delovanje, kar se ujema tudi z že znanimi podatki iz študij *in vivo*. Tako ToxTree kot Derek Nexus sta podala zanesljivo napoved.

Pri napovedi senzibilizacije spojin je bilo na voljo veliko več podatkov iz obstoječih študij:

- amil cinamalu, benzil cinamatu, cinamalu, evgenolu, izoevgenolu in heksil cinamalu so tako vsi trije računalniški programi kot tudi večina testov *in vivo* ter *in vitro* pripisali senzibilizacijsko delovanje. Pri benzil cinamatu in heksil cinamalu so nekateri podatki iz literature testov *in vivo* na ljudeh nasprotovali podatkom iz študij na živalih, iz česar lahko sklepamo, da sta spojini verjetno šibka senzibilizatorja. To lahko povežemo tudi z dvoumnimi rezultati, do katerih sta pri benzil cinamatu prišla programa Derek Nexus in VegaNIC. Veliko verjetneje je, da bosta ti spojini povzročali alergije predvsem pri že občutljivih posameznikih;

- pri cinamilnemu alkoholu, kumarinu in obeh UV-filtrih so si napovedi računalniških programov nasprotovale. Prav tako si tudi s podatki iz literature nismo mogli pomagati, saj so različne študije prišle do različnih ugotovitev. Zanesljivost napovedi uporabljenih metod *in silico* je posledično težko oceniti.

Zaključimo lahko, da ima Derek Nexus večjo napovedno moč od programa ToxTree za napoved draženja in korozije. Pri senzibilizaciji pa imajo vsi trije programi dokaj dobro napovedno moč in so v večini primerov podali složno napoved. Nasprotujoči si rezultati iz študij *in vivo* ter *in vitro* ter pomanjkanje teh pri določenih spojinah nam onemogočajo ovrednotenje verodostojnosti napovedi uporabljenih metod *in silico*. Glede na podatke o količini izpostavitve derivatom cimetine kisline predvidevamo, da je pojav senzibilizacije kot posledice uporabe kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo preiskovane spojine, redek. Do alergijskih reakcij pride verjetno najpogosteje pri občutljivejših/bolj alergičnih posameznikih.

6 LITERATURA

1. J. D. Walker, I. Gerner, E. Hulzebos, K. Schlegel. The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool (SICRET). *QSAR & Combinatorial science*. 2005, 24: 378–384.
2. O. Nicolotti, E. Benefati, A. Carotti, D. Gadaleta, A. Gissi, G. F. Mangiardi, E. Novellino. REACH and in silico methods: an attractive opportunity for medicinal chemists. *Drug Discovery Today*. Nov. 2014 (19); 1757–1768.
3. H. Raunio. In silico toxicology – non-testing methods. *Frontiers in pharmacology*. 2011.
4. <https://echa.europa.eu/sl/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>. Zadnjič dostopano 7. 6. 2017.
5. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/glossary/glossary/in-vitro-methods>. Zadnjič dostopano 6. 4. 2017.
6. https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_sl.pdf. Zadnjič dostopano 4. 4. 2017.
7. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-irritation>. Zadnjič dostopano 5. 4. 2017.
8. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-corrosion>. Zadnjič dostopano 5. 4. 2017.
9. E. Hulzebos, J. D. Walker, I. Gerner, K. Schlegel. Use of structural alerts to develop rules for identifying chemical substances with skin irritation or skin corrosion potential. *QSAR and Combinatorial Science*; Vol. 24; 2005; 332–384.
10. H. Greim, R. Synder. Februar 2018. *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd, 359–363 .
11. A. O. Bare, M. Paye, H. I. Maibach. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2009. Informa Healthcare USA, 3rd ed..
12. R. Lazzarini, I. Duarte, A. L. Ferreira. Patch tests. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2013; 88(6): 879–888.
13. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-sensitisation>. Zadnjič dostopano 5. 4. 2017.
14. S. J. Enoch, J. C. Madden, M. T. D. Cronin. Identification of mechanisms of toxic action for skin sensitisation using a SMARTS pattern based approach. *SAR and QSAR in Environmental Research* Vol. 19; Jul.–Sept. 2008; 555–578.

15. G. F. Berberick, C. A. Ryan, R. J. Dearman, I. Kimber. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 41; 2007; 54–60.
16. S. E. Anderson, P. D. Siegel, B. J. Meade. The LLNA: A Brief Review of Recent Advances and Limitations. *Journal of Allergy*; Vol. 2011; 1–10.
17. <http://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/DOC-0431.pdf>. Zadnjič dostopano 19. 6. 2017.
18. A. M. Kligman, D. A. Basketter. A critical commentary and updating of the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis*, 1995, 32; 129–134.
19. B. Magnusson, A. M. Kligman. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1969, 52 (3): 268–276.
20. M. K. Robinson, T. L. Nusair, E. R. Fletcher, H. L. Ritz. A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization. *Toxicology*, Vol. 19: 1990: 91–107.
21. <http://www.mbresearch.com/hclat.htm>. Zadnjič dostopano 26. 9. 2017.
22. OECD guideline for the testing of chemicals (TG 442E). In *Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*, 29. 7. 2016 .
23. <http://www.mbresearch.com/dpra.htm>. Zadnjič dostopano 26. 9. 2019.
24. OECD guideline for the testing of chemicals (TG 442C). In *Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*, 4. 2. 2015.
25. IFRA STANDARD. 47th Amendment. – alpha-Amyl cinnamic aldehyde. 10. 6. 2013.
26. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/amyl-cinnamal-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
27. IFRA STANDARD. 42th Amendment – Benzyl cinnamate. 14. 10. 2009.
28. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/benzyl-cinnamate-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
29. IFRA STANDARD. 47th Amendment – Cinnamic aldehyde. 10. 6. 2013.
30. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/cinnamal-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
31. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/cinnamyl-alcohol-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
32. IFRA STANDARD. 43th Amendment – Cinnamic alcohol. 14. 10. 2009.
33. IFRA STANDARD. 47th Amendment – Dihydrocoumarin. 10. 6. 2013.
34. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/coumarin-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.

35. IFRA STANDARD. 43th Amendment – Eugenol. 14. 10. 2009.
36. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/eugenol-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
37. IFRA STANDARD. 43th Amendment – Isoeugenol. 14. 10. 2009.
38. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/isoeugenol-0>. Zadnjič dostopano 22. 6. 2017.
39. IFRA STANDARD. 47th Amendment – alpha-Hexyl cinnamic aldehyde. 10. 6. 2009.
40. http://europa.eu/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/co0013_en.htm. Zadnjič dostopano 16. 7. 2017.
41. A. M. Api, D. A. Basketter, P. A. Cadby, M. F. Cano, G. Ellis, G. F. Gerberick, P. Griem, P. M. McName, C. A. Ryan, R. Safford. Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. Regulatory toxicology and pharmacology. Oct. 2008: 52(1): 3–23.
42. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/ethylhexyl-methoxycinnamate-0>. Zadnjič dostopano 22. 7. 2017.
43. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=352.10>. Zadnjič dostopano 1. 7. 2017.
44. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=celex:32009R1223>. Zadnjič dostopano 1. 7. 2017.
45. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccs_opinions_97_04/sccp_out06_en.htm. Zadnjič dostopano 1. 7. 2017.
46. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/isoamyl-p-methoxycinnamate-0>. Zadnjič dostopano 22. 7. 2017.
47. <https://www.vegahub.eu/download/vega-interpretation/>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
48. <http://toxtree.sourceforge.net/>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
49. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Derek%20Nexus.pdf>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
50. <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
51. <https://www.lhasalimited.org/products/EC3-predictions-for-skin-sensitisation.htm>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
52. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Skin%20Sensitisation.pdf>. Zadnjič dostopano 27. 6. 2017.
53. A. M. Api, D. Belsito, S. Bhatia, M. Bruze, P. Calow, M. L. Dagli, W. Dekant, A. D. Fryer, L. Kromidas, S. La Cava, J. F. Lalko, A. Lapczynski, D. C. Liebler, Y.

- Miyachi, V. T. Politano, G. Ritacco, D. Salvito, J. Shen, T. W. Schultz, I. G. Sipes, B. Wall, D. K. Wilcox. RIFM fragrance ingredient safety assessment, α -amylcinnamaldehyde, CAS registry number 122-40-7. *Food and Chemical toxicology*, 2015.
54. T. Poon, B. P. Mundy, T. W. Shattuck. The Michael reaction. *Journal of Chemical Education*, 2002; 79 (2): 264–267.
55. A. O. Aptula, G. Patlewicz, D. W. Roberts. Skin sensitization: Reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chemical research toxicology*. 2005, 18: 1420–1426.
56. A. J. Michael. *Prakt. Chem.* 1887, 35, 349–356.
57. S. P. Bhatia, G. A. Wellington, J. Cocchiara, J. Lalko, C. S. Letizia, A. M. Api. Fragrance material review on benzyl cinnamate. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) S40–S48.
58. D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, P. Calow, H. Greim, J. M. Hanifin, A. E. Rogers, J. H. Saurat, I. G. Sipes, H. Tagami. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) S1–S23.
59. D. Bickers, P. Calow, H. Greim, J. M. Hanifin, A. E. Rogers, J. H. Saurat, I. G. Sipes, R. L. Smith, H. Tagami. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 799–836.
60. J. Cocchiara, C. S. Letizia, J. Lalko, A. Lapczynski, A. M. Api. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 867–923.
61. <https://www.masterorganicchemistry.com/2012/07/04/the-sn2-mechanism/>. Zadnjič dostopano 6. 5. 2017.
62. C. S. Letizia, J. Cocchiara, J. Lalko, A. Lapczynski, A. M. Api. Fragrance material review on cinnamyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 837–866.
63. P. Tai-Long, W. Pei-Wen, A. Ibrahim. Aljuffali, Yann-Lii Leue, Yi-Yun Hungf, Jia-You Fang. Coumarin derivatives, but not coumarin itself, cause skin irritation via topical delivery. *Toxicology Letters* 226 (2014) 173–181.
64. A. J. Cohen. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Cosmetic Toxicology*, 1979; 17: 217–289.

65. M. Vocanson, M. Valeyrie, A. Rozieres, A. Hennino, F. Floch, A. Gard, J. F. Nicolas. Lack of evidence for allergenic properties of coumarin in a fragrance allergy mouse model. *Contact Dermatitis* 2007: 57: 361–364.
66. SCCS (Scientific committee on consumer products). Opinion on Coumarin (sensitisation only). 2006.
67. M. D. Barratt, D. A. Basketter. Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds – preliminary studies of potential reaction mechanisms. *Contact Dermatitis*, 1992: 27; 98–104.
68. F. Bertrand, D. A. Basketter, D. W. Roberts, J.-P. Lepoittevin. Skin Sensitization to Eugenol and Isoeugenol in Mice: Possible Metabolic Pathways Involving ortho-Quinone and Quinone Methide Intermediates. *Chemical Research Toxicology*, 1997: 10; 335–343.
69. A. M. Api, D. Belsito, S. Bhatia, M. Bruze, P. Calow, M. L. Dagli, W. Dekant, A. D. Fryer, L. Kromidas, S. La Cava, J. F. Lalko, A. Lapczynski, D. C. Liebler, Y. Miyachi, V. T. Politano, G. Ritacco, D. Salvito, T. W. Schultz, J. Shen, I. G. Sipes, B. Wall, D. K. Wilcox. RIFM fragrance ingredient safety assessment, isoeugenol, CAS Registry Number 97-54-1. *Food and Chemical Toxicology*, 2015:1–8.
70. A. M. Api, D. Belsito, S. Bhatia, M. Bruze, P. Calow, M. L. Dagli, W. Dekant, A. D. Fryer, L. Kromidas, S. La Cava, J. F. Lalko, A. Lapczynski, D. C. Liebler, Y. Miyachi, V. T. Politano, G. Ritacco, D. Salvito, T. W. Schultz, J. Shen, I. G. Sipes, B. Wall, D. K. Wilcox. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Eugenol, CAS Registry Number 97-53-0. *Food and Chemical Toxicology*, 2005.
71. Masahiro Takeyoshi, Shuji Noda, Shunsuke Yamazaki, Hiroshi Kakishima, Kanji Yamasaki, Ian Kimber. Assessment of the Skin Sensitization Potency of Eugenol and its Dimers using a Non-radioisotopic Modification of the Local Lymph Node Assay. *Journal of applied toxicology*, 2004: 24; 77–81.
72. D. Basketter, I. R. White, J. P. McFadden, I. Kimber. Hexyl cinnamal: consideration of skin-sensitizing properties and suitability as a positive control. *Cutaneous and ocular toxicology*, 2014.
73. C. Schweitzer, R. Schmidt*. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews*, 2003: 103 (5): 1685–1758.
74. <http://www.calstatela.edu/dept/chem/selke/r-1.htm>. Zadnjič dostopano 25. 9. 2016.

75. S. Schauder, H. Ippen. Contact and photocontact sensitivity to sunscreen – Review of a 15-year experience and of the literature. *Contact Dermatitis*, Nov. 1997, 37 (5): 221–232.
76. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccs_opinions_97_04/sccp_out06_en.htm. Zadnjič dostopano 12. 9. 2017.
77. S. E. Pentinga, D. J. Kuik, D. P. Bruynzeel, T. Rustemeyer. Do »cinnamon – sensitive« patients react to cinnamate UV filters?. *Contact dermatitis*, 2009; 60: 210–213.