

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA LAH TOMŠIČ (LAH)

NAPOVEDOVANJE DRAŽILNOSTI IN JEDKOSTI SPOJIN NA KOŽI IN
OČEH Z RAČUNALNIŠKO APLIKACIJO TOXTREE

UP FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA LAH TOMŠIČ (LAH)

**NAPOVEDOVANJE DRAŽILNOSTI IN JEDKOSTI SPOJIN NA KOŽI
IN OČEH Z RAČUNALNIŠKO APLIKACIJO TOXTREE**

**PREDICTION OF SKIN AND EYE IRRITATION AND CORROSION
WITH THE TOXTREE SOFTWARE**

UP FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Zahvala

Posebna zahvala gre najprej mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za vse spodbude, strokovno pomoč, nasvete in neizmerno potrpežljivost.

Hvala tudi možu Jožetu, ki me je tekom študija bodril s svojo potrpežljivostjo in vseskozi verjel, da mi bo uspelo dokončati študij. Velika zahvala gre tudi staršem, ki so mi omogočili študij. Posebej hvaležna sem mami Slavki za vsakodnevno varstvo štiriletnega Timoteja in dvoletnega Tomija. Nazadnje gre zahvala tudi prijateljici Katarini za spodbudo ob nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem, ki so mi pomagali in me spodbujali pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Rok Šibanc, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Alternativne metode določanja toksičnih lastnosti snovi in REACH	1
1.2	Določanje draženja kože in povzročanja opeklin na koži	5
1.2.1	Vrednotenje kožnega draženja in povzročanja opeklin.....	7
1.2.1.1	Tradicionalni Draizov test na kuncih	7
1.2.1.2	Testi <i>in vitro</i> oz. <i>ex vivo</i> za določanje draženja kože in povzročanja opeklin na koži.....	8
1.2.1.3	Določanje draženja kože/povzročanja opeklin na koži s pomočjo metod <i>in silico</i>	9
1.2.1.4	ITS in/ali IATA za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.....	10
1.3	Določanje očesnega draženja in povzročanja hudih poškodb na očeh.....	10
1.3.1	Vrednotenje očesnega draženja in povzročanja hudih poškodb oči.....	11
1.3.1.1	Tradicionalni Draizov test na zajcih.....	12
1.3.1.2	Alternativne metode za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh.....	13
1.3.1.3	Določanje draženja oči/povzročanja hudih poškodb oči s pomočjo metod <i>in silico</i>	15
2	NAMEN DELA.....	16
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	Toxtree.....	17
3.1.1	Opis programa	18
3.1.2	Razvojna orodja.....	20
3.1.3	Osnova za delovanje modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži (draženje kože/povzročanje opeklin na koži).....	20
3.1.3.1	Splošen opis pravil	20
3.1.3.2	Mehanistična razlaga kožnega draženja/povzročanja opeklin	22
3.1.4	Osnova za delovanje modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh (draženje oči/povzročanje hudih poškodb oči).....	23
3.1.4.1	Splošen opis pravil	23
3.1.4.2	Mehanistična razlaga očesnega draženja.....	24
3.2	Izbor spojin za testiranje.....	25

3.3	Testiranje spojin	27
3.4	Analiza rezultatov testiranja.....	32
3.4.1	Izračun napovednosti programskih modulov za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh	32
3.4.1.1	Občutljivost za napovednost	34
3.4.1.2	Specifičnost za napovednost	36
3.4.1.3	Točnost za napovednost	37
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
4.1	Ocena napovednosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.....	39
4.1.1	Občutljivost za napovednost	39
4.1.2	Specifičnost za napovednost	42
4.1.3	Točnost za napovednost	44
4.1.4	Povzetek in primerjava rezultatov testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.....	45
4.2	Ocena napovednosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh	47
4.2.1	Občutljivost za napovednost	47
4.2.2	Specifičnost za napovednost	51
4.2.3	Točnost za napovednost	53
4.2.4	Povzetek in primerjava rezultatov testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh	54
4.3	Rezultati in zaključki, ki se nanašajo na oba vrednotena Toxtreejeva programska modula	55
5	SKLEP	59
6	LITERATURA	61
7	PRILOGA 1	70
8	PRILOGA 2	74
9	PRILOGA 3	77
10	PRILOGA 4	80

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Poskusne metode EU in vitro oz. ex vivo in testne smernice OECD za določanje draženja kože in povzročanja opeklin.....	8
Preglednica II: Draizov ocenjevalni sistem očesnih odzivov (9, 26)	12
Preglednica III: Alternativne metode (in vitro in ex vivo) za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh, razdeljene glede na naravo testnega sistema (9, 39).....	14
Preglednica IV: Glavni mehanizmi očesnega draženja (9)	25
Preglednica V: Formule za izračun občutljivosti za napovednost programskih modulov in za njihnih posameznih končnih točk.....	34
Preglednica VI: Formule za izračun specifičnosti za napovednost programskih modulov in za njune posamezne končne točke	36
Preglednica VII: Formule za izračun točnosti za napovednost programskih modulov in za njune posamezne končne točke	37
Preglednica VIII: Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule.....	40
Preglednica IX: Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule.....	43
Preglednica X: Izračun točnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule	45
Preglednica XI: Rezultati testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži s pomočjo občutljivosti, specifičnosti in točnosti splošno ter za obe končni točki.....	45
Preglednica XII: Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule	48
Preglednica XIII: Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule	52

Preglednica XIV: Izračun točnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule	53
Preglednica XV: Rezultati testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh s pomočjo občutljivosti, specifičnosti in točnosti splošno ter za obe končni točki.....	54
Preglednica XIX: Rezultati testiranja prvega niza spojin.....	70
Preglednica XX: Rezultati testiranja drugega niza spojin.....	74
Preglednica XXI: Rezultati testiranja tretjega niza spojin	77
Preglednica XXII: Rezultati testiranja četrtega niza spojin.....	80

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavno okno programa Toxtree (verzija 2.6.6.) ob vnosu spojine v programsko okno »Chemical identifier« s pomočjo števila CAS	29
Slika 2: Pojavno okno programskega orodja »JChemPaint structure diagram editor« ob risanju spojine v programu Toxtree (verzija 2.6.6.)	29
Slika 3: Izbiranje odločitvenega drevesa (programskega modula) v opravilni vrstici programa Toxtree (verzija 2.6.6.).....	30
Slika 4: Pojavno okno, ki se pokaže ob izbiri programskega modula (odločitvenega drevesa) v programu Toxtree (verzija 2.6.6.).....	30
Slika 5: Pojavno okno v programu Toxtree ob napovedi izida v programskem modulu za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži	31

POVZETEK

Danes je na tržišču prisotnih veliko kemikalij, s katerimi se ljudje srečujemo vsak dan, in sicer tako poklicno kot zasebno. Zato je smiselno, da smo seznanjeni z njihovimi toksičnimi lastnostmi. Med toksične lastnosti spojin spadata tudi dražilnost in jedkost spojin na koži in očeh. Te toksične lastnosti spojin lahko določamo tudi s pomočjo alternativnih metod (*in silico* in *in vitro*), ki za testiranje spojin ne uporabljajo živali. Med alternativne *in silico* metode spada tudi preko spleta prosto dostopen in s strani Evropske komisije odobren računalniški program Toxtree. Napovednost Toxtreejevih programskih modulov smo v diplomski nalogi vrednotili s pomočjo občutljivosti, specifičnosti in točnosti. Pri tem smo za vrednotenje programskega modula za dražilnost in jedkost spojin na koži izbrali 95 testnih spojin, za vrednotenje programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh pa 86 testnih spojin. Obe skupini testnih spojin smo razdelili v dva niza (glede na njuno biološko aktivnost). Programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži smo najprej vrednotili kot celoto (pri tem dražilnost in jedkost spojin na koži obravnavamo kot eno končno točko) in nato še za njegovi posamezni končni točki: dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži. Ravno tako smo programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh najprej vrednotili kot celoto (pri tem dražilnost in jedkost spojin na očeh obravnavamo kot eno končno točko) in nato še za njegovi posamezni končni točki: dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh.

S programskim modulom za napovednost dražilnosti in jedkosti spojin na koži smo po končani analizi dobili sledeče rezultate: občutljivost celotnega programskega modula (za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži) znaša 79,2 %, občutljivost za kožne iritante 82,9 % in občutljivost za povzročitelje opeklin 57,1 %. Specifičnost programskega modula, in sicer tako za celoto kot za obe posamezni končni točki, je 100-odstotna. Programski modul točno napove dražilnost in jedkost na koži za 89,1 % spojin, s tem da znaša točnost 90,5 % za končno točko dražilnosti spojin na koži in 93,3 % za končno točko jedkosti spojin na koži. Ti rezultati kažejo, da programski modul zelo dobro oz. boljše kot validirane alternativne *in vitro* metode napove dražilnosti spojin na koži, malenkost slabše (tudi slabše kot validirane alternativne *in vitro* metode) pa napoveduje jedkost spojin na koži (zaradi slabše občutljivosti).

S programskim modulom za napovednost dražilnosti in jedkosti spojin na očeh smo po končani analizi dobili sledeče rezultate: občutljivost celotnega programskega modula (za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh) znaša 30,2 %, s tem da znaša občutljivost za očesne iritante 58,8 %, občutljivost za povzročitelje hudih poškodb oči pa 25,0 %. Specifičnost za napovednost programskega modula, in sicer tako za celoto kot za obe končni točki programskega modula (napoved dražilnosti spojin na očeh in jedkosti spojin na očeh), je 100-odstotna. Programski modul točno napove dražilnost in jedkost na očeh za 64,3 % spojin, s tem da je točnost 80,0-odstotna za končno točko dražilnosti spojin in 85,4-odstotna za končno točko jedkosti spojin. Menimo, da je kljub visoki specifičnosti programski modul Toxtree slabo orodje za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh, ravno tako smo ugotovili, da zaradi zelo slabe občutljivosti programski modul Toxtree napove jedkost spojin na očeh slabše kot alternativne *in vitro* metode, ki določajo jedkost spojin na očeh.

Ključne besede: Toxtree, vrednotenje napovednosti, dražilnost, jedkost, koža, oko.

ABSTRACT

Nowadays the market is flooded with various chemicals and people deal with them every day either professionally or privately. It thus makes sense to be aware of their toxic properties. Skin and eye irritation and corrosion are among toxic properties of compounds. Such properties can be determined using alternative methods that do not involve animal testing. One of the options (that is an alternative *in silico* method) is computer software Toxtree, which is available online and approved by the European Commission. The thesis evaluates the prediction capacity of the two Toxtree modules by means of sensitivity, specificity and accuracy. A total of 95 test compounds were selected to evaluate the skin irritation prediction module and another 86 test compounds to test the eye irritation prediction module. Both sets of test compounds were divided into two sections (according to their biological activity). The module for skin irritation/skin corrosion was first assessed as a whole (skin irritation and corrosion are treated as a single endpoint). Then we evaluated the prediction capacity of the module for individual endpoints: skin irritation and skin corrosion. We did the same with the module for eye irritation and corrosion, the module was first assessed as a whole (eye irritation and corrosion are treated as a single endpoint). Then we evaluated the prediction capacity of the module for individual endpoints: eye irritation and eye corrosion.

The analysis results of the module for skin irritation and corrosion showed: overall sensitivity (for skin irritation and corrosion) of the module is 79.2 %, while skin irritant sensitivity is at 82.9 % and sensitivity to chemicals causing burns at 57.1 %. The specificity of the module as a whole as well as for the two endpoints is 100 %. The module is able to accurately predict skin irritation and corrosion in 89.1 % of the compounds, with accuracy for the skin irritation endpoint at 90.5 % and the skin corrosion endpoint at 93.3 %. The results suggest that the module is very successful or even better than validated alternative *in vitro* methods in predicting skin irritation and slightly less successful (compared with validated alternative *in vitro* methods) in predicting skin corrosion (because of the lower sensitivity).

The analysis results of the module for eye irritation and corrosion indicated: overall sensitivity (for eye irritation and corrosion) of the module is 30.2 %, while eye irritant sensitivity is at 58.8 % and sensitivity to chemicals causing severe damage to eyes at 25.0 %. The specificity of the prediction capacity of the module as a whole as well as for the

two endpoints (prediction of eye irritation and corrosion) is 100 %. The module is able to accurately predict eye irritation and corrosion in 64.3 % of the compounds, with accuracy for the irritation endpoint at 80.0 % and the corrosion endpoint at 85.4 %. We believe that Toxtree is a poor tool for predicting eye irritation and corrosion, although its specificity is high. Compared to alternative *in vitro* methods for determining corrosivity of compounds, the sensitivity of Toxtree software for predicting eye corrosion is significantly lower, than that of validated alternative *in vitro* methods. This also attests to the fact that Toxtree is a poor tool for predicting eye irritation and corrosion by compounds.

Keyword: Toxtree, evaluation of prediction capacity, irritation, corrosion, skin, eye.

SEZNAM OKRAJŠAV

3R	Replacment, Reduction, Refinement (nadomeščanje, zmanjšanje, izpopolnitev)
AOP	Adverse Outcome Pathway (pot neželenega izida)
ASCII	American Standard Code for Information Interchange (ameriška standardna koda za izmenjavo informacij)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung (Nemški državni inštitut za oceno rizika)
BfR-DSS	BfR Decision Support System (odločitveni podporni sistem BfR)
CAS	Chemical Abstracts Service (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov)
CLP	Classification, Labeling, Packaging (razvrščanje, označevanje in pakiranje)
DB-ALM	Database Service on Alternative Methods to animal experimentation (Podatkovna baza alternativnih metod testiranja na živalih)
EC	European Commision (Evropska komisija)
ECHA	European Chemicals Agency (Evropska agencija za kemikalije)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods (Evropski center za validacijo alternativnih metod)
EDDS	etilendiamin; N,N'-dijantarna kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EINECS	European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (Evropski seznam obstoječih kemičnih snovi)
ESAC	ECVAM Scientific Advisory Committee (Znanstveni svetovalni odbor Evropskega centra za validacijo alternativnih metod)
EURL ECVAM	European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (Referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih)
IATA	Integrated Approaches to Testing and Assessment (integrirani pristopi k testiranju in oceni)

ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Medagencijski usklajevalni odbor za validacijo alternativnih metod)
IHCP	Institute for Health and Consumer Protection (Inštitut za zdravje in varovanje potrošnikov)
InChI	IUPAC International Chemical Identifier (Mednarodni kemijski identifikator IUPAC)
ISSFUNC	Structural Alerts for Functional Group Identification (strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin)
ISSMIC	Structure Alerts for the in vivo micronucleus assay in rodents (strukturni elementi toksičnosti pri testu na podganjih mikronukleusih)
ITS	Integrated Test Strategies (integrirane testne strategije)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo)
JRC	Joint Research Centre (Skupno raziskovalno središče EU)
MSDS	material safety data sheet (varnostni list)
NC	No Category (ni kategorije)
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)
PAS	površinsko aktivne snovi
PII	Primary irritation index (primarni iritacijski indeks)
QMRF	QSAR Model Reporting Format (obrazec za poročilo modelov QSAR)
QSAR	Quantitative structure activity relationship (kvantitativen odnos med strukturo in delovanjem)
QSPR	quantitative structure-property relationship (kvantitativno razmerje med strukturo in lastnostjo snovi)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij)
RhE	Reconstructed human Epidermis (rekonstruirana človeška pokožnica)

SAR	Structure-activity relationship (kvalitativen odnos med strukturo in delovanjem)
SDS	safety data sheet (varnostni list)
SICRET	The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool (orodje za oceno dražilnosti in jedkosti spojin na koži)
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification (specifikacija, ki za nedvoumen opis strukture molekul uporablja kratke nize znakov ASCII)
TG	Test Guideline (testna smernica)
UNCED	United Nations Conference on Environment and Development (Konferenca združenih narodov o okolju in razvoju)
WoE	Weight of Evidence (ugotavljanje zanesljivosti dokazov)

1 UVOD

1.1 Alternativne metode določanja toksičnih lastnosti snovi in REACH

V zadnjih desetletjih se je število kemikalij, s katerimi se srečujemo v vsakodnevni uporabi bodisi poklicno bodisi za izboljšanje kakovosti življenja, drastično povečalo (1). Ravno zaradi tega dejstva se je tako strokovna kot tudi laična javnost začela zavedati povečane potrebe po oceni varnosti kemikalij in/ali oceni njihovega vpliva na zdravje ljudi ter delovanje na okolje. Tako so leta 1992 v Riu de Janeiru na Konferenci združenih narodov o okolju in razvoju (UNCED) dosegli dogovor glede načrta za nadaljnji trajnostni razvoj na področju zaščite okolja in ljudi, ki so ga združili v Agendo 21. Pri tem je 19. poglavje omenjene Agende 21 v celoti posvečeno upravljanju s kemikalijami. Njeno glavno priporočilo je širitev in pospeševanje mednarodne ocene varnosti kemikalij ter harmonizacija postopkov za oceno varnosti kemikalij na mednarodni ravni (2, 3). V skladu s tem namenom je bila v EU februarja leta 2001 izdana in odobrena Bela knjiga (White paper) z naslovom Strategija za prihodnost kemijske politike (Strategy for a Future Chemical Policy) (4, 5), ki odpravlja pomanjkljivosti dotedanje zakonodaje o zahtevah za oceno varnosti kemikalij (npr. uporaba obstoječih spojin brez ustreznega testiranja toksičnih lastnosti, breme dokazovanja toksičnih lastnosti leži na javnih organih, pomanjkanje iniciative za ustvarjanje varnejših spojin itd.) (6, 7).

Trije glavni cilji Bele knjige so: socialni (zagotoviti visoko stopnjo varovanja zdravja ljudi), okoljski (zaščita okolja pred škodljivimi vplivi kemikalij) in ekonomski (ta predvideva hkratno nemoteno delovanje kemijske industrije in pospeševanje njene konkurenčnosti). V Beli knjigi je omenjen tudi sistem REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals). Na osnovi predlogov Bele knjige je Evropska komisija 29. oktobra 2003 prejela zakonodajni predlog za novo uredbo o kemikalijah, in sicer **Uredbo EC 1907/2006** o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (Uredba REACH). To je Svet ministrov sprejel 18. decembra 2006, potem ko jo je 13. decembra 2006 izglasoval Evropski parlament. V veljavo je stopila 1. junija 2007, v polnosti pa se je začela izvajati junija 2008 ter velja še danes (7). V sklopu te uredbe je bila 1. junija 2007 ustanovljena tudi Evropska agencija za kemikalije ali ECHA s sedežem v Helsinkih, ki upravlja z vsemi tehničnimi, znanstvenimi in administrativnimi vidiki uredbe REACH. ECHA prejema in ocenjuje skladnost posameznih registracij, države članice EU

pa ocenjujejo izbrane snovi, da se razjasnijo zadržki v zvezi z zdravjem ljudi in okoljem. Pristojni organi in znanstveni odbori pri ECHA ocenjujejo, ali je možno tveganja, ki jih predstavljajo snovi, obvladovati. Če tveganja ni mogoče obvladovati, lahko pristojni organi nevarne snovi prepovejo, omejijo njihovo uporabo ali zanjo zahtevajo predhodno avtorizacijo (8).

Sistem REACH uvaja postopek zbiranja in ocenjevanja informacij o toksičnih lastnostih snovi in njihovih nevarnostih v odvisnosti od količine (podane v masi) spojine, ki se proizvede ali uvozi v EU na letni ravni (9). Namenjen je zagotavljanju dodatnih informacij o varnosti kemikalij za ljudi in okolje s sočasnim zagotavljanjem konkurenčnosti kemijske industrije v EU. Uredba velja za vse snovi (posamezne spojine ali pripravke), in sicer tako za tiste, ki se uporabljajo v industriji, kot tudi za tiste, ki jih uporabljamo v vsakdanjem življenju (razen radioaktivnih spojin, neizoliranih intermediatov ali kemikalij, ki so pod carinskim nadzorom). Odgovornost za zbiranje informacij o oceni varnosti in možnih tveganjih za spojine (ki se letno proizvajajo ali uvažajo v EU v količini vsaj 1 tona na leto ali več, odvisno od toksične lastnosti) se prenese iz javnih organov na proizvajalce oz. uvoznike snovi. Ker REACH zahteva oceno varnosti tako za nove spojine kot tudi za obstoječe spojine (ki so bile dane na trg pred letom 1981), bi izvajanje tradicionalnih testiranj za dokaz varnosti spojine zahtevalo izvajanje poskusov na velikem številu živali, obenem pa bi bilo tako ekonomsko kot časovno zahtevno (4). Zato REACH spodbuja razvoj in uzakonitev alternativnih metod za oceno nevarnosti snovi ter spodbuja uporabo že pridobljenih informacij z namenom zmanjšanja števila poskusov na živalih (10). EU se je namreč že leta 1986 opredelila, kar se tiče uporabe živali v poskusih, in sicer s sprejemom Direktive (86/609/EEC), ki poziva k čim manjši uporabi živali v poskusih, uporabi alternativnih metod za določanje testiranih lastnosti ter čim manjšem trpljenju živali tekom poskusov. To direktivo je nadomestila izpopolnjena in obsežnejša Direktiva 2010/63/EU, ki je bila sprejeta novembra 2010, v polno izvajanje pa je stopila 1. januarja 2013. Ta uzakoni t. i. koncept 3R (**R**eplacment – nadomeščanje, **R**eduction – zmanjšanje in **R**efinement – izpopolnitev). Koncept 3R torej predstavljajo 3 načela: NADOMEŠČANJE (zamenjamo predvideno testno metodo z alternativno, ki da enako kakovostne podatke, brez uporabe živali), ZMANJŠANJE (uporaba metode, ki za pridobitev iste količine podatkov potrebuje manj poskusnih živali ali pridobi več informacij na istem številu živali, s čimer zmanjšamo število živali za poskuse) in

IZPOPOLNITEV (se nanaša na izboljšave pogojev testiranja, kjer se poskusom na živalih ni mogoče izogniti s tem, da izboljšamo pogoje bivanja, in postopke, ki se izvajajo na živalih tako, da te utrpijo čim manj nelagodja – stresa, bolečin in trpljenja) (11, 12). Poleg teh uredb in direktiv je na področju kozmetičnih izdelkov uzakonjena tudi Uredba EC 1223/2009, ki od 11. marca 2013 popolnoma prepove uporabo poskusov na živalih (za nekatere toksične lastnosti spojin je testiranje na živalih v sklopu te uredbe prepovedano že od marca 2009) za namen testiranja kozmetičnih izdelkov in njihovih sestavin, ki so prisotni na trgu EU. Ravno tako prepove trženje in prodajo kozmetičnih izdelkov v EU, ki so bili (kot taki ali njihove sestavine) testirani na živalih (4, 13, 14). Iz vseh zgoraj navedenih razlogov REACH in splošna zakonodaja v EU spodbujata razvoj in uzakonitev alternativnih metod za določanje toksičnih lastnosti spojin pri katerih se ne uporablja živali.

Pojem alternativna metoda testiranja je splošno vezan na principe 3R in je katera koli metoda, ki lahko zamenja metodo testiranja na živalih, zmanjša število uporabljenih poskusnih živali ali izboljša pogoje testiranja za poskusne živali (zmanjša njihovo nelagodje, bolečino in stres). Alternativne testne metode, ki jih uporabljamo za zmanjšanje ali zamenjavo testov na poskusnih živalih, običajno temeljijo na metodah *in vitro* in/ali *in silico*. Z njimi se izognemo testiranju na živalih. Metode *in vitro* za testiranje uporabljajo tkiva, celice ali dele celic. Nedavni napredek metod, ki temeljijo na celicah oz. celičnih linijah, predstavljajo dvo- in tridimenzionalne celične »sokulture«, ki uspešno oponašajo celice in tkiva v našem telesu. Metode za testiranje *in silico* uporabljajo računalniško tehnologijo. Največkrat temeljijo na metodah (Q)SAR in ekspertnih sistemih. Te metode so v zadnjih letih postale močno orodje za napoved delovanja spojin in tudi določanja njihovih toksičnih lastnosti (15).

Nekatere poskuse na živalih lahko nadomestimo z uporabo ene alternativne metode (npr. test za draženje kože) ali pa uporabimo kombinacijo več testnih metod (največkrat *in silico* in *in vitro* ter, kadar je nujno potrebno, *in vivo*) z integriranimi pristopi k testiranju in oceni (IATA – Integrated Approaches to Testing and Assessment) ter v obliki integriranih testnih strategij (ITS – Integrated Test Strategies). Te so že sprejete v regulatornem smislu (9, 10). Prve ITS so bile sprejete kot testne smernice OECD ravno na področjih kožnega in očesnega draženja in so opisane v sledečih testnih smernicah: 404 – za kožo in 405 – za

oko (16, 17). ITS pospešeno razvijajo, uporabljajo in validirajo tudi sama farmacevtska podjetja ter splošna kemijska industrija interno za določanje različnih lastnosti spojine ali iskanje novih učinkovin (10, 16). Testiranjem na živalih se je mogoče izogniti tudi, če je na voljo ugotavljanje zanesljivosti dokazov (Weight of Evidence approach – pristop WoE), ki kaže verjetne značilnosti snovi. Ta pristop se lahko uporabi, če obstaja dovolj podatkov iz več neodvisnih virov (samo podatki iz vsakega posameznega vira ne zadoščajo), na podlagi katerih je mogoče sklepati, da snov ima/nima določene toksične lastnosti (17).

Razvoj alternativnih metod je omogočen tudi z boljšim razumevanjem mehanizma interakcije kemikalije z organizmom, kar nam omogoča tudi pristop AOP (Adverse Outcome Pathways), ki se razvija paralelno z novimi alternativnimi metodami. To je nov pristop k razumevanju bioloških dogodkov, ki se je začel januarja 2013 z ustanovitvijo razvojnega programa AOP (AOP Development Programme). Ta temelji na temeljitim razumevanju toksikoloških procesov oz. njihovega mehanizma delovanja v povezavi s skupinami kemikalij, na osnovi katerega lahko nato zgradimo integrirano testno strategijo, ki ustreza določeni regulatorni zahtevi (18).

Nekatere alternativne metode danes že uporabljamo kot popolno zamenjavo za živalska testiranja. To so testi za področje določanja toksičnih lastnosti spojin, in sicer dražilnosti in jedkosti spojin na koži, testiranja penetracije/absorpcije spojin skozi kožo in določanja fototoksičnosti. Druge uporabljamo za zmanjšanje obsega testiranja na živalih, in sicer na področjih dražilnosti in jedkosti spojin na očeh, kožne senzitivacije, genotoksičnosti, kancerogenosti, akutne peroralne toksičnosti in reproduktivne toksičnosti (teratogenost in endokrine motnje). Mnoge od teh validiranih metod so tudi uzakonjene (tako v EU kot tudi mednarodno) in se uporabljajo kot testne metode v sklopu smernic OECD za testiranje (TG-s) ali v Evropski farmakopeji (19, 20).

Testne metode morajo biti zato, da se jih lahko uporablja v regulatorne namene, ustrezno validirane, kar pomeni, da morajo biti robustne, zanesljive in relevantne (16). Le tako pridobijo veljavo in jih lahko tudi uzakonimo. Z namenom validiranja alternativnih testnih metod je bil v EU s strani Evropske komisije v sklopu generalnega direktorata Skupnega raziskovalnega središča EU (GD JRC – Joint Research Centre) pod okriljem Inštituta za zdravje in varovanje potrošnikov (IHCP) leta 1991 ustanovljen Evropski center za

validacijo alternativnih metod (ECVAM), katerega naloge so bile leta 2011 predane Referenčnemu laboratoriju Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM). Ta od leta 2012 deluje pod okriljem enote IHCP za sistemsko toksikologijo (Systems Toxicology Unit). Glavne naloge EURL ECVAM so, da vodi in sodeluje pri razvoju alternativnih metod, izvaja in koordinira validacijske študije ter olajša njihovo (regulatorno) sprejemanje in spodbuja uporabo alternativnih metod pri končnih uporabnikih (22). EURL ECVAM omogoča tudi dostop do »on line« podatkovne baze DB-ALM (Database Service on Alternative Methods to animal experimentation), ki hrani podatke o validiranih alternativnih metodah za določanje toksičnih lastnosti, ki ne temeljijo na živalskih poskusih (18, 22).

1.2 Določanje draženja kože in povzročanja opeklin na koži

Koža je največji organ človeškega telesa, ki je hkrati tudi najbolj izpostavljen zunanemu okolju. Ob izpostavljanju kože različnim dejavnikom, med drugim tudi kemikalijam, lahko le-ti povzročijo na koži neželene učinke. Ker je v industrializiranem okolju prisotnih mnogo kemikalij, ki lahko pridejo v stik s kožo (tako poklicno kot v vsakdanjem življenju), je treba za zagotavljanje varovanja zdravja ljudi oceniti njihove učinke na kožo (9, 23). Značilnosti, koncentracija in trajanje kontakta z iritantom/povzročiteljem opeklin na koži so najpomembnejši dejavniki za obliko in stopnjo kožne reakcije. Mehanski, toplotni, klimatski in konstitucijski dejavniki pa tako reakcijo spreminjajo in prilagajajo. Nekateri poklici so tovrstnim kožnim spremembam še posebej izpostavljeni (frizerji, mehaniki, medicinske sestre – ti naj bi imeli najpogostejše spremembe na koži dlani) (13, 23). Glede na resnost in reverzibilnost učinkov na koži razlikujemo med draženjem kože in povzročanjem opeklin na koži (24). Med najpogostejšimi poklicnimi boleznimi je namreč ravno iritativni kontaktni dermatitis (IKD), ki je posledica akutnega ali kroničnega draženja kože oz. iritacije. Zato uredba REACH zahteva, da se vse spojine oz. pripravke, ki se v EU proizvedejo ali uvozijo nad 1 tono letno (minimalna masa, ki zahteva registracijo), oceni glede njihove sposobnosti draženja kože in povzročanja opeklin na koži (9). Podatki o dražilnosti in jedkosti spojin na koži so v EU zahtevani še v sklopu sledečih zakonodaj, ki uravnavajo uporabo kemikalij, ki pridejo v stik s kožo: Uredba EC 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, Uredba EC 528/2012 o biocidih, Uredba EC 1107/2009 o izdelkih za zaščito rastlin in Uredba EC 1272/2008 – Uredba CLP (Classification, Labeling,

Packaging) o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi in zmesi. Ta sicer ne zahteva podatkov o kemikalijah, vendar podaja pravila za njihovo razvrščanje in označevanje v sklopu zakonodaje REACH (9, 24).

Draženje kože, za katerega je značilen vnetni odgovor na koži, predstavlja zapleten biološki odziv, ki še ni popolnoma raziskan. Reverzibilna lokalna vnetna reakcija je povzročena z nespecifičnim imunskim odgovorom prizadetega kožnega tkiva. Predvsem so za to odgovorne celice vrhnjice (keratinociti in Langerhansove celice) in usnjice (limfociti T (brez spominskih limfocitov T), makrofagi in dendritične celice). Te celice zaradi povzročene poškodbe tkiva in celic spodbudijo tvorbo vnetnih dejavnikov (v glavnem citokinov interleukinov, kemokinov in rastnih faktorjev in tudi derivatov arahidonske kisline). Vnetni mediatorji vzdražijo živčne končiče, kar povzroča občutek srbenja, pekoč občutek na koži in bolečino. Kot posledica vnetnega odgovora se pojavijo tipični znaki draženja: rdečica (rubor), toplota (calor), bolečina (dolor) in otekline (oedema) prizadetega mesta. Sčasoma lahko pride tudi do nastanka krast (odvisno od jakosti draženja), delne alopecije, hiperplazije, hiperkeratoze in luščenja kože. Ločimo akutno (posledica enkratnega stika z iritantom oz. škodljivim dejavnikom) in kronično ali kumulativno (dolgotrajni in ponavljajoči stik z blažjim iritantom) draženje kože. V sklopu regulatornih namenov obravnavamo le akutno draženje kože. Za namen ocene varnosti spojin je draženje kože definirano na osnovi tradicionalnega živalskega (Draizovega) testa kot *nastanek reverzibilnih poškodb na koži, ki sledi nanosu testne snovi do 4 ure* (citat iz testne smernice OECD 404, ki je ponovljena tudi v Uredbi EC 1272/2008 – Uredba CLP) (9, 13, 23). Glede na Uredbo CLP (velja od leta 2009 in ima privzet mednarodni sistem GHS za označevanje in razvrščanje spojin) imajo spojine, ki dokazano povzročajo draženje na koži, oznako H315 (obstaja tudi H316 za snovi, ki povzročajo blago draženje kože, a v EU ta kategorija ni priznana), spojine, ki kože ne dražijo, pa imajo oznako NC (not classified). Glede na Direktivo o nevarnih snoveh, ki je bila v veljavi pred Uredbo CLP, imajo spojine, ki dokazano povzročajo draženje na koži, oznako R38. Razlika med razvrščanjem spojin v obeh sistemih je, da so nekatere spojine po sistemu CLP razvrščene v kategorijo NISO dražeče, medtem ko so bile v predhodno veljavnem sistemu razvrščene v razred iritantov (kar je v nadaljevanju dodatno razloženo pri določanju dražečih spojin s pomočjo testa *in vivo*) (13, 25, 26).

Spojine, ki na koži povzročajo opekline (delujejo jedko), poškodujejo izpostavljeni predel kože tako, da pride do nekroze oz. odmrta kožnega tkiva, ki ni več popravljivo. Posledično se odmrlo območje lahko popravi le s pomočjo zdrave kože iz okolice. Za namen ocene varnosti kemikalij je povzročanje opeklin na koži definirano na podlagi tradicionalnega živalskega (Draizovega) testa kot *tvorba nepopravljive poškodbe kože, in sicer vidne nekroze skozi pokožnico tudi v usnjico po aplikaciji testne snovi do 4 ure. Za kožne opekline so značilne razjede, krvave kraste, pri koncu 14-dnevnega opazovalnega obdobja pa pride do spremembe barve kože zaradi beljenja, alopecije in nastanka krast* (citat iz testne smernice OECD 404, ki je ponovljena tudi v Uredbi EC 1272/2008 – Uredba CLP). Glede na označevalni sistem CLP imajo spojine, ki dokazano povzročajo opekline na koži, oznako H314 (označuje hkrati tudi snovi, ki povzročajo razjede na očeh). Glede na Direktivo o nevarnih snoveh snovi, ki povzročajo opekline, označimo z R34 (tiste, ki povzročijo opekline že po 3 minutah po nanosu na kožo) in R35 (tiste, ki povzročijo opekline po 4-urnem nanosu na kožo). Pri tem med obema označevalnima/razvrstilnima sistemoma ni razlik v razvrščanju spojin (13, 25, 26).

1.2.1 Vrednotenje kožnega draženja in povzročanja opeklin

Tradicionalno so potencialne iritante in povzročitelje opeklin testirali *in vivo* na živalih, danes pa uporabljamo tudi alternativne metode, predvsem metode *in vitro* in teste *in silico* (metode QSAR, ekspertni sistemi) ter njihove kombinacije (IATA, ITS) in testiranja *in vivo* na ljudeh (13, 25).

1.2.1.1 Tradicionalni Draizov test na kuncih

Tako draženje kože kot tudi povzročanje opeklin na koži so tradicionalno ocenjevali na kuncih, in sicer z Draizovim testom, ki je bil razvit že leta 1944 in od takrat tudi večkrat izboljšan. Trenutni standardni postopek je opisan v testni smernici OECD 404 iz leta 2002 (9, 13). Pri testiranju nanese nerazredčeno tekočino ali trdno snov (določena količina) na obrit predel kože hrbta živega kunca (najprej uporabimo eno testno žival, v primeru, da je testirana snov iritant ali nima biološkega učinka na koži, to potrdimo z uporabo še ene ali dveh testnih živali), to pa nato pokrijemo z obližem za 4 ure. Draženje opazujemo po 24, 48 in 72 urah. V večini primerov se vnetni odgovor razvije v roku 72 ur. Reverzibilnost se opazuje do 14 dni. Jakost draženja kože pri testih ocenimo s pomočjo Draizove skale za oceno kožnega odziva. Draizova skala loči pet stopenj eritema (rdečica) (od 0 – ni prisotna

rdečica do 4 – močna rdečica z rahlo tvorbo krast) in pet stopenj otekline (od 0 – ni otekline do 4 – močna oteklina (visoka več kot 1 mm in se razteza čez izpostavljeno območje)). Spojina je ocenjena kot iritant, če so ocene srednjih vrednosti vsaj 2 od 3 živali $\geq 2,3$ in ≤ 4 (po sedaj veljavnem sistemu CLP), medtem ko je bila po stari Direktivi o nevarnih snoveh spojina razvrščena kot iritant že, če je bila ocena srednjih vrednosti $\geq 2,0$. Snov opredelimo kot povzročitelja opeklin že, če se na eni poskusni živali pojavijo znaki razjed na koži. Tvorbo razjed opazujemo do 14 dni, pri čemer se poškodba na koži ne popravi (9, 26, 27). Draizov test ima svoje prednosti, vendar ima tudi več slabosti, predvsem zaradi variabilnosti pri oceni kožnega draženja (zaradi subjektivnega ocenjevanja in barve kože), medvrstnih razlik med kuncem in ljudmi in slabe ponovljivosti testa (9, 27). Alternativne testne metode (v glavnem modeli QSAR), ki so razvite, optimizirane, ocenjene in validirane na osnovi Draizovega testa, imajo že zaradi slabše zanesljivosti (ki izhaja iz omenjenih slabosti) biološkega testa manj zanesljive napovedi (28).

1.2.1.2 Testi *in vitro* oz. *ex vivo* za določanje draženja kože in povzročanja opeklin na koži

Testi *in vitro* oz. *ex vivo*, ki so trenutno priznani tudi v regulatornem smislu za določanje draženja kože in povzročanja opeklin na koži, so predstavljeni v preglednici I (9, 24).

Preglednica I: Poskusne metode EU *in vitro* oz. *ex vivo* in testne smernice OECD za določanje draženja kože in povzročanja opeklin

Generični opis testne metode	Testna smernica OECD (Test Guideline)
<i>In vitro</i> draženje kože	
<i>In vitro</i> testiranje kožnega draženja s pomočjo človeških kožnih modelov: Episkin TM , Epiderm TM SIT (EPI-200), SkinEthnic TM RHE, LabCyte TM EPI-MODEL24 SIT	TG 439 <i>In vitro</i> draženje kože: testna metoda z uporabo rekonstruirane človeške pokožnice
<i>In vitro</i> določanje povzročanja opeklin na koži	
Poskus transkutane električne upornosti (Trancutaneous electrical resistance – testi TER) CORROSITEX [®]	TG 430: <i>in vitro</i> povzročanje opeklin na koži: poskus transkutane električne upornosti TG 435: <i>in vitro</i> testna metoda z membransko pregrado za določanje povzročanja opeklin na koži
<i>In vitro</i> testiranje povzročanja opeklin na koži s pomočjo človeških kožnih modelov: Episkin TM , Epiderm TM , SkinEthnic TM , EpiCS TM (EST 1000)	TG 431: <i>in vitro</i> povzročanje opeklin na koži: testna metoda z uporabo rekonstruirane človeške pokožnice

Najnovejše raziskave kažejo, da so metode *in vitro*, ki temeljijo na rekonstruirani človeški pokožnici (Reconstructed human Epidermis – RhE), celo bolj točne pri napovedi učinka na ljudeh kot tradicionalni živalski testi (27).

1.2.1.3 Določanje draženja kože/povzročanja opeklin na koži s pomočjo metod in silico

Nabor spojin, ki povzročajo draženje kože in/ali opekline na koži, je zelo velik. Hkrati so strukturno zelo različne, tako da zgolj na podlagi njihove strukture ne moremo sklepati na njihov potencial draženja ali povzročanja opeklin na koži. Raziskave na tem področju so torej usmerjene v določitev kvantitativnega razmerja med strukturo in aktivnostjo spojine (QSAR), ki omogoči napoved dražilnosti in jedkosti spojin, zlasti znotraj določenih skupin (kemijskih razredov) spojin, ki pogosteje sprožijo iritacijo ali povzročajo opekline na koži (organske kisline, baze, PAS – površinsko aktivne snovi, organska topila itd.). in v razvoj ekspertnih sistemov, ki so računalniško osnovane metode, ki temeljijo na uporabi baz podatkov in baz pravil, ki so izpeljane iz teh podatkov (3,13).

Najenostavnejši modeli za napoved jedkosti spojin na koži temeljijo na pH-meritvah in imajo preprosto pravilo: če je pH manjši od 2 ali večji od 11,5, potem spojina povzroča opekline na koži. Ravno tako se da s pH napovedati dražilnost spojin na koži (9,27). Objavljenih je bilo tudi več modelov (Q)SAR za razlikovanje med spojinami, ki povzročajo ali ne povzročajo kožnega draženja ali opeklin na koži na osnovi različnih kemijskih razredov (estri, fenoli, elektrofilne organske spojine) na podlagi razvrstilnega sistema, in sicer sta jih objavila Barratt za napoved jedkosti spojin (29, 30) in Smith za napoved dražilnosti spojin (31, 32), medtem ko je bilo nekaj modelov narejenih tudi z namenom napovedi primarnega iritacijskega indeksa (PII), npr. Hayashi napove PII za specifične posamezne kemijske razrede (33), Golla pa napove PII za raznolike kemijske razrede (34).

Obstaja tudi več računalniških aplikacij oz. ekspertnih sistemov, ki med drugim napovejo dražilnost spojin na koži: **Toxtree** (prosto dostopen na <http://toxtree.sourceforge.net/download.html>), **OECD QSAR Toolbox** (prosto dostopen na <http://www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar>), **Derek Nexus** (plačljiv, dostopen na <https://www.lhasalimited.org>), **TOPKAT** (plačljiv, dostopen na <http://accelrys.com/mini/toxicology/predictive-functionality.html>), **HazardExpert** (plačljiv, dostopen na <http://www.compudrug.com>), **Molcode ToolBox** (plačljiv, dosegljiv na <http://molcode.com>), **ACD/Tox Suite** (plačljiv, dosegljiv na <http://acd-tox-suite.software.informer.com>), **Multi-CASE** (plačljiv, dosegljiv na

<http://www.multicase.com>) in **PaDEL-DDPredictor** (prosto dostopen na <http://padel.nus.edu.sg/software/padelddpredictor>). Od vseh teh programov le **PaDEL-DDPredictor**, **Toxtree** in **OECD Toolbox** napovedujejo tudi jedkost spojin na koži, s tem da zadnja dva temeljita na istih t. i. pravilih BfR, ki jih je razvil Nemški državni inštitut za oceno tveganja (Bundesinstitut für Risikobewertung – BfR) (isto velja tudi za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh) (9, 35, 36).

Analiza (Q)SAR in programska orodja se le redko uporabljajo samostojno. Zelo uporabni so v okviru integriranih strategij testiranja (ITS) in/ali v integriranih pristopih k testiranju (IATA) oz. v vseh pristopih, ki temeljijo na ugotavljanju z zanesljivostjo dokazov (9).

1.2.1.4 ITS in/ali IATA za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži

Obstajata sekvenčna testna strategija in ITS za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži. Obe uporabljata širok spekter informacij, ki vključujejo metode tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. To sta (9):

- ocenjevalna metoda (sekvenčna testna strategija) – v testni smernici OECD 404 ta ni v skladu s statusom alternativne metode, saj kot končno potrditev zahteva uporabo testa *in vivo*);
- integrirana testna strategija v smernici REACH (ECHA 2012), ki temelji na ekspertnem znanju in presoji; sestavljena je iz 3 korakov: zbiranje in ocenjevanje obstoječih podatkov, vključevanje vseh zbranih podatkov v odločitve o zanesljivosti podatkov (Weight of Evidence) in, če so podatki nezadostni za razvrstitev in označevanje v skladu z Uredbo CLP, novo testiranje.

Poleg teh dveh je od julija 2014 v veljavi integrirani pristop za testiranje in oceno (IATA – integrated approach on testing and assessment) kožnega draženja/povzročanja opeklin, ki je posodobljena in dopolnjena različica ITS v smernici REACH (37).

1.3 Določanje očesnega draženja in povzročanja hudih poškodb na očeh

Toksične lastnosti spojine, ki vplivajo na oko ali vid, so zelo pomembne pri oceni varnosti kemikalije. Za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh v uredbi REACH in v zakonodaji EU veljajo podobna pravila in zahteve kot za določanje dražilnosti in jedkosti

spojin na koži. Tudi nasploh se določanje dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh povezuje. Primer za to je splošno veljavno pravilo, ki pravi, da snovi, ki povzročajo opekline na koži, ne testiramo na očeh, saj predpostavimo, da na očeh povzročajo hude poškodbe. Takšne snovi po Uredbi CLP označimo z enotno oznako H314 – povzroča opekline na koži in poškodbe oči (9, 26, 38).

Definicija povzročanja hudih poškodb na očeh glede na testno smernico OECD 405 iz leta 2002 (definirano glede na tradicionalni test *in vivo*) pravi, da je *huda poškodba oči nastanek poškodbe tkiva očesa ali resnega poslabšanja vida po nanosu testne snovi na sprednjo površino očesa, ki ni popolnoma reverzibilna v 21 dneh od nanosa*. Po sedaj veljavni testni smernici iz leta 2012 se te snovi dodatno razdelijo v jedke in zelo dražilne snovi, posamezne definicije pa ob združevanju tvorijo definicijo, ki je identična zgornji iz leta 2002 za jedke snovi. Snovi, ki povzročajo hudo poškodbo oči po Uredbi CLP, razvrstimo v kategorijo 1 in označimo z oznako H318 – povzroča hude poškodbe oči. Glede na staro Direktivo o nevarnih snoveh imajo te snovi oznako R41 (25, 26).

Definicija za draženje oči glede na testno smernico OECD 405 iz leta 2002 pravi, da je *draženje oči nastanek sprememb v očesu po nanosu testne snovi na sprednjo površino očesa, ki so popolnoma reverzibilne v 21 dneh po nanosu*. Snovi, ki dražijo oči po Uredbi CLP, razvrstimo v kategorijo 2 in označimo z oznako H319 – snov hudo draži oči, po stari Direktivi o nevarnih snoveh pa imajo te snovi oznako R36 – snov draži oči (25, 26).

1.3.1 Vrednotenje očesnega draženja in povzročanja hudih poškodb oči

Na področju določanja toksičnih lastnosti spojin na očeh je trenutno splošno veljavno dejstvo, da tudi v bližnji prihodnosti nobena posamezna testna metoda *in vitro* za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh ne bo zmožna nadomestiti živalskega Draizovega testa *in vivo* za napoved vseh toksičnih lastnosti za vse kemijske razrede (predvsem velja za določanje dražilnosti spojin), čeprav si znanstveniki za to prizadevajo že od leta 1980. Tako je zato, ker sta to kompleksni toksični reakciji znotraj kompleksnega tkiva (9, 38). So pa razvite številne metode *in vitro* in *ex vivo*, ki v kombinacijah (stopenjske in sekvenčne testne strategije) lahko delno ali v celoti nadomestijo živalski test (9, 39).

1.3.1.1 Tradicionalni Draizov test na zajcih

Tako dražilnost kot tudi jedkost spojin na očeh so tradicionalno določali na zajcih (zaželeni so albino zajci), in sicer z Draizovim testom, ki je bil razvit že leta 1944 in od takrat tudi večkrat izboljššan. Trenutni standardni postopek je opisan v testni smernici OECD 405 iz leta 2012. Pri testiranju naneseemo testno snov v konjunktivalno vrečko očesa živega in omamljenega zajca (najprej uporabimo eno testno žival, v primeru, da je testirana snov iritant ali nima biološkega učinka na očeh, to potrdimo z uporabo še ene ali dveh testnih živali). Testno snov naneseemo le na eno oko, drugo pa med testom služi za kontrolo. Draženje/povzročanje poškodb opazujemo po 24, 48 in 72 urah po nanosu testne snovi v oko. Učinki so ocenjeni na osnovi odzivov veznice, roženice in šarenice. Z namenom razvrščanja in označevanja pri vsakem zajcu preračunamo povprečne vrednosti za štiri končne točke: motnjave roženice, vnetje šarenice, pordelost veznice in otekline v veznici (nabiranje tekočine v veznici). Te ocenimo vizualno. Ocene očesnih odzivov (Draizov ocenjevalni sistem) so predstavljene v preglednici II (9, 38, 40).

Preglednica II: Draizov ocenjevalni sistem očesnih odzivov (9, 26)

ROŽENICA (motnjave – različne stopnje gostote)	Ocena
ni razjed ali motnjave	0
razpršena območja motnjave, podrobnosti jasno vidne	1
jasno razločna prosojna območja, podrobnosti šarenice rahlo zakrite	2
nekrozna območja: ni več vidnih podrobnosti roženice, velikost zenice komaj opazna	3
motna roženica: ni mogoče razločiti šarenice skozi motnost	4
ŠARENICA	
normalna	0
opazno poglobljene gube, zastoji, oteklina, zmerno povečana prekrvavitev okoli roženice, šarenica se odziva na svetlobo (tudi počasni odziv se smatra za učinek)	1
krvavitev, uničenje ali neodzivnost na svetlobo	2
VEZNICA (pordelost se nanaša na veke in veznico na beločnici, izvzeti sta roženica in šarenica)	
normalna	0
nekateri žile imajo povečano prekrvavitev	1
difuzna škrlatna barva, težko razločimo posamezne žile	2
difuzna »goveje« rdeča barva	3
Oteklina (kemoza); nanaša se na VEKE in/ali TRETJO VEKO (prisotna pri nekaterih živalih)	
normalno	0
malo oteklo (malo bolj kot normalno)	1
očitna oteklina z delno izvihanimi vekami	2
oteklina z napol zaprtimi vekami	3
oteklina z več kot napol zaprtimi vekami	4

Ocenjevalni sistem za razvrščanje spojin, ki na očeh povzročajo draženje ali hude poškodbe iz Uredbe CLP, ki ustreza tudi ocenjevalnemu sistemu iz Direktive o nevarnih snoveh (splošno sta oba sistema za ocenjevanje in razvrščanje spojin, ki delujejo dražilno ali jedko na očeh popolnoma primerljiva) pa snovi razvrsti sledeče: **Snov povzročča hudo**

poškodbo oči (deluje jedko na očeh) (v Uredbi CLP kategorija 1, oznaka H318; po starem v Direktivi o nevarnih snoveh oznaka R41) če: ima vsaj ena žival učinke na roženici, šarenici ali veznici, za katere pričakujemo, da ne bodo izginili oz. popolnoma izginili med opazovalnim obdobjem 21 dni, kar vključuje tudi oceno 4 za razjede roženice in druge hude poškodbe (npr. uničenje roženice, njeno razbarvanje z barvili, adhezije ali drugi učinki, ki okvarijo vid), ki se jih opazi kadar koli med testom in/ali pri vsaj 2 od 3 poskusnih živalih dobimo pozitivni odziv za motnjave roženice ≥ 3 in/ali vnetje šarenice $> 1,5$ (preračunano kot povprečne vrednosti po oceni po 24, 48 in 72 urah po nanosu preizkusne snovi). **Snov draži oči (v Uredbi CLP kategorija 2, oznaka H319; po stari Direktivi o nevarnih snoveh oznaka R36) če:** pri vsaj 2 od 3 poskusnih živali dobimo pozitivni odgovor za motnjave roženice ≥ 1 in/ali vnetje veznice ≥ 1 in/ali pordelost veznice ≥ 2 in/ali oteklost veznice ≥ 2 (preračunano kot povprečne vrednosti po oceni po 24, 48 in 72 urah po nanosu preizkušane snovi, s tem da učinki popolnoma izginejo v 21 opazovalnih dneh) (9, 26).

1.3.1.2 Alternativne metode za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh

Kot že rečeno, so na področju določanja dražilnosti in jedkosti snovi na očeh razvite številne metode *in vitro* in *ex vivo*. Delno ali v celoti lahko nadomestijo Draizov test le analiza tehtnosti dokazov iz obstoječih ustreznih podatkov ali kombinacije različnih alternativnih testov. Največji napredek na tem področju je bil narejen v sklopu delavnice ECVAM leta 2010, kjer so za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh razvili **stopenjsko testno strategijo**, ki je uporabna na dva načina. Za spojine, za katere pričakujemo dražilno ali jedko delovanje na očeh, uporabimo pristop »z vrha navzdol« (angl. »top-down«). Pri tem so najprej identificirane spojine, ki delujejo jedko (povzročajo hude poškodbe oči), in sicer spadajo v kategorijo 1. Če pričakujemo, da spojina ne deluje dražilno ali jedko, uporabimo pristop »z dna navzgor« (angl. »bottom-up«), ki najprej identificira spojine, ki ne delujejo dražilno ali jedko, in jih razvrsti v kategorijo NC (No Category). Ni pa možna direktna razvrstitev v kategorijo 2 (snovi, ki dražijo oči oz. povzročajo reverzibilne poškodbe oči). To sicer lahko s pomočjo omenjenih pristopov določimo s pomočjo izločevalnega principa, vendar se tem zveča možnost napake. Metod, ki bi direktno določale kategorijo 2, namreč primanjkuje, in sicer zato, ker primanjkuje metod, ki razlikujejo med reverzibilnimi in trajnimi poškodbami očesa (9, 39).

Pri vseh teh pristopih in strategijah se opiramo na rezultate metod *in vitro* oz. *ex vivo*, izmed katerih so nekatere še v postopku validacije, druge pa regulatorno že odobrene in opisane v testnih smernicah OECD, ki so predstavljene v preglednici III.

Preglednica III: Alternativne metode (*in vitro* in *ex vivo*) za določanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh, razdeljene glede na naravo testnega sistema (9, 39)

	Testni sistem	Uporaba	Regulatorni status
Organotipske metode	Ex vivo izolirane oči		
Testna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda (BCOP – Bovine Corneal Opacity & Permeability)	Ex vivo izolirane roženice oči goveda, pridobljene iz klavnic	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 in kemikalij, ki nimajo kategorije (izjeme so alkoholi, ketoni in trdne spojine); uporabna je tudi v stopenjski testni strategiji	Testna smernica OECD 437
Poskus na izoliranem očesu kokoši (ICE – Isolated Chicken Eye)	Ex vivo celotno kokošje oko, pridobljeno iz klavnic	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 in kemikalij, ki nimajo kategorije (izjema so alkoholi, trdne spojine in PAS); uporabna je tudi v stopenjski testni strategiji	Testna smernica OECD 438
Poskus na izoliranem očesu zajca (IRE – Isolated Rabbit Eye)	Ex vivo celo oko zajca	Uporabna za določanje CLP kategorije 1	Ni še opisana v testni smernici, torej še ni uradno validirana, vendar je ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) leta 2007 objavil retrospektivno študijo, v kateri je priporočil metodo in poudaril, da lahko pozitivne rezultate tega poskusa uporabimo kot osnovo za označevanje spojin, ki povzročajo hude poškodbe oči
Organotipske metode	Metode, ki uporabljajo horioalantoične membrane		
Poskus na kokošjem jajcu – poskus na horioalantoični membrani (HET-CAM – Hen's Egg Test Chorio-Allantoic Membrane)	Horioalantoična membrana kokošjega jajca	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 in kemikalij, ki nimajo kategorije, vendar je potrebnih več podatkov za potrditev uporabnosti metode	Metoda je bila uradno validirana s strani ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), vendar ni bila spoznana za ustrezno za razvrščanje v regulatorne namene za sistem UN GHS/CLP; uporabna je v testih zaporednega preizkušanja
Modeli, ki uporabljajo rekonstruirano človeško tkivo	Modeli, ki uporabljajo rekonstruirano človeško tkivo		
EpiOcular™ poskus za določanje očesnega draženja (EIT – EpiOcular™ Eye Irritation Test)	EpiOcular™ model rekonstrukcije človeškega tkiva	Naj bi se uporabljala za določanje CLP kategorije 1 in kemikalij, ki nimajo kategorije	Trenutno v postopku validacije; ESAC je začel študijo za njegovo validacijo leta 2013
SkinEthnic™ človeški epitelij roženice (SkinEthnic™ Human Corneal Epithelium – HCE)	SkinEthnic™ HCE model rekonstrukcije človeškega tkiva	Naj bi se uporabljala za določanje CLP kategorije 1 in kemikalij, ki nimajo kategorije	Še v fazi optimizacije
Analize na osnovi celic			

Metoda preskušanja »Cytosensor Microphysiometer (CM)«	Mišji fibroblasti L929	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 (za kemikalije, ki se mešajo z vodo) in kemikalije, ki nimajo kategorije (za PAS in mešanice, ki vsebujejo PAS), in se mešajo z vodo	Osnutek za testno smernico je bil predlagan decembra 2012; uporablja se v pristopih »top-down« in »bottom-up«
Metoda testiranja uhajanja fluoresceina (FL – Fluorescein Leakage)	Madin-Darby pasje ledvične celice (Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells)	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 (za kemikalije, ki se mešajo z vodo)	Testna smernica OECD 460
Metoda s kratkim časom izpostavljenosti (Short Time Exposure – STE)	Celice roženice inštituta Statens Seruminstitut (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) cells)	Uporabna za določanje CLP kategorije 1 in kemikalije, ki nimajo kategorije (za PAS in trdne snovi), ter kemikalije s parnim tlakom, nižjim od 6 kPa	Osnutek testne smernice OECD (predlagan novembra 2013); prevalidacijska študija že opravljena
Analyze in chemico			
Ocular Irritection®		Uporabna za določanje CLP kategorije 1 in kemikalije, ki nimajo kategorije	Testna metoda je že validirana in spoznana za ustrezno

1.3.1.3 Določanje draženja oči/povzročanja hudih poškodb oči s pomočjo metod in silico

Za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh velja podoben princip kot pri napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na koži. Različni modeli (Q)SAR so poskušali napovedovati dražilnost in jedkost spojin na očeh, in sicer nekateri s pomočjo napovedi povprečij tkivnih rezultatov (41), drugi pa s klasifikacijskimi sistemi (42), s tem da je bilo od leta 2008 objavljenih zelo malo novih publikacij (9).

Programska orodja, ki med drugim napovedujejo dražilnost spojin na očeh, so **Toxtree**, **OECD QSAR Toolbox**, **Derek Nexus**, **TOPKAT**, **Molcode ToolBox**, **PaDEL-DDPredictor** in **Multi-CASE**. Povzročanje hudih poškodb oči za spojine napovedujejo programska orodja **Toxtree**, **Molcode ToolBox**, **OECD QSAR Toolbox** in **PaDEL-DDPredictor**. Njihova dostopnost in dosegljivost sta navedeni na straneh 9 in 10. Programi so namreč isti kot za napoved kožnega draženja (9, 35, 36).

2 NAMEN DELA

Naš namen bo ovrednotiti napovednost računalniške aplikacije Toxtree, ki je prosto dostopna na spletu in se uporablja za napoved različnih toksičnih lastnosti spojin. Ocenjevali bomo napovednost programskih modulov te aplikacije za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži oz. kožnega draženja/povzročanja opeklin na koži ter napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh oz. očesnega draženja/povzročanja hudih poškodb oči. Z namenom ocene in primerjave naših rezultatov z drugimi alternativnimi metodami, ki se uporabljajo za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh, smo se odločili, da napovednost obeh programskih modulov in njunih končnih točk ocenimo s pomočjo t. i. Cooperjeve statistike, in sicer s pomočjo:

- občutljivosti, ki nam pove delež biološko aktivnih – pozitivnih spojin, ki jih programski modul pravilno opredeli;
- specifičnosti, ki nam pove delež biološko neaktivnih – negativnih spojin, ki jih modul pravilno opredeli;
- točnosti, ki nam pove delež vseh spojin, ki jih modul pravilno napove.

Za oba modula bomo za vrednotenje napovednosti poiskali naključno izbrane testne spojine, ki imajo znano delovanje na koži in očeh ter prihajajo v stik s kožo ali očmi med uporabo določenih izdelkov, v katerih so prisotne.

Za vrednotenje programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži bomo izbrali 95 spojin, za vrednotenje programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh pa 86 spojin.

Na osnovi dobljenih rezultatov bomo skušali potrditi ali ovreči naslednje hipoteze:

1. Programska modula sta ustrezna za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh.
2. Programska modula napovesta dražilnost in jedkost spojin na koži in očeh boljše kot validirane alternativne *in vitro* metode.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Toxtree

Za regulatorno oceno varnosti spojin so se razvila in se še razvijajo številna komercialna in prosto dostopna računalniška orodja. Ta omogočijo oceno varnosti spojin *in silico* brez uporabe živalskih poskusov s pomočjo metod (Q)SAR in statističnih pristopov. Z njimi na osnovi povezave med strukturo in delovanjem neke skupine spojin napovemo biološko aktivnost njim podobnih spojin. Za povečano dostopnost zanesljivih računalniških metod Skupno raziskovalno središče (JRC) s pomočjo raznih sodelavcev razvija in podpira razvoj uporabniku prijaznih in prosto dostopnih računalniških aplikacij za oceno varnosti kemikalij v sklopu REACH z namenom promocije regulatorne uporabe metod (Q)SAR (35, 43). Trenutno (november 2014) so na spletni strani JRC regulatorno veljavne računalniške aplikacije za določanje toksičnih lastnosti Toxtree, Toxmatch, DART in Danish (Q)SAR Database. Hkrati je tukaj dosegljiv tudi QSAR Model Database, ki omogoča javni dostop do podatkov o modelih (Q)SAR in omogoča razvijalcem, da s pomočjo posebnega orodja (QSAR Model Reporting Format – QMRF) na enostaven način predložijo podatke o novem modelu. Vsa programska oprema omenjenih računalniških aplikacij je torej prosto dostopna na spletni strani https://ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/qsar_tools (35, 44). Da so modeli (Q)SAR veljavni in se lahko uporabljajo za regulativne namene, se morajo skladati s petimi dogovorjenimi načeli OECD. Smernice za modele (Q)SAR so sledeče (45):

- model mora biti povezan z opredeljeno končno točko;
- model mora biti izražen v obliki nedvoumnega algoritma;
- model mora biti povezan z opredeljenim področjem uporabnosti;
- model mora ustrezno delovati, kar opredelimo s statistično »kakovostjo« modela, trdnostjo in predvidljivostjo;
- model mora biti po možnosti povezan z mehanistično razlago za končne točke za zdravje ljudi in strupenosti za okolje.

3.1.1 Opis programa

Toxtree je uporabniku prijazen in prilagodljiv računalniški program, ki s pomočjo strukturnih pravil razvršča kemikalije v skupine in se uporablja za napoved najrazličnejših toksičnih lastnosti spojin z uporabo metode odločitvenega drevesa. Razvilo ga je podjetje Ideacconsult Ltd. (Sofia, Bulgarija) po pogodbi za JRC. Namenjen je tako strokovnjakom kot tudi vsakomur, ki ga zanima napoved toksičnih lastnosti kemikalij s pomočjo računalniških metod. Razvitih je več verzij, in sicer od 1.20 iz marca 2007 do najnovejše verzije 2.6.13, ki je v veljavo stopila 22. marca 2015. Delo smo opravljali na verziji 2.6.6 (ta je izšla 15. junija 2014), ker je verzija 2.6.13 izšla potem, ko smo že opravili celotno raziskavo. Toxtreejeva programska oprema je prosto dostopna na spletni strani JRC https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/qsar_tools/toxtree (za verzijo 2.6.6. ta stran preusmeri na <http://sourceforge.net/projects/toxtree/>). Več podatkov o programu Toxtree in njegov prenos omogoča tudi spletna stran <http://toxtree.sourceforge.net/>. Hkrati omogoči povezavo na spletno stran <http://toxtree.sourceforge.net/predict/>, kjer se nahaja spletna različica programa, ki jo lahko uporabljamo brez prenosa na osebni računalnik (44, 46).

Program Toxtree (verzija 2.6.6) vsebuje 17 programskih modulov, ki so jih razvile različne organizacije po celem svetu (46, 47):

- Cramerjeva pravila in Cramerjeva pravila z dodatki;
- Verhaarjeva shema in spremenjena Verhaarjeva shema;
- napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži (kožnega draženja/povzročanja opeklin na koži);
- napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh (očesnega draženja/povzročanja hudih poškodb oči);
- pravila za mutagenost in karcinogenost Benigni/Bossa;
- biorazgradnja START;
- strukturni elementi toksičnosti za identifikacijo Michaelovih akceptorjev;
- strukturni elementi toksičnosti za kožno senzitivnost;
- odločitveno drevo Kroes TTC;
- presnova in napoved metabolitov citokroma P450 – SMARTCyp;
- strukturni elementi toksičnosti pri testu na podganjih mikronukleusih (Structure Alerts for the *in vivo* micronucleus assay in rodents – ISSMIC);

- strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin (Structural Alerts for Functional Group Identification – ISSFUNC);
- opozorila za vezavo na DNA;
- opozorila za vezavo na beljakovine;
- opozorila za mutagenost ISS (Amesov test).

Metoda odločitvenega drevesa spada med analizne metode za reševanje klasifikacijskih problemov (pomeni, da razvršča spojine v znane kategorije toksičnih lastnosti spojin) (48) in ima strukturo, podobno drevesu, saj je sestavljena iz vej in listov. Pri tem veje predstavljajo skupino določenih razredov podatkov, listi pa specifični podatkovni razred. Razvrščanje posameznih spojin z vektorjem x (komponente vektorja so molekularni deskriptorji) se začne pri drevesnih koreninah in poteka navzgor po vejah, dokler ne doseže lista. Pri tem na vsakem vozlu program izvede test, ki je odvisen od vrednosti deskriptorja, s pomočjo katerega se spojina razvrsti na naslednjo vejo, vse dokler ne pridemo do lista, omenjeni list pa predstavlja napoved podatkovnega razreda dane spojine (49).

Kot že omenjeno, Toxtree vsebuje tudi modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh. Pravila uporabljena v obeh Toxtreejevih modulih so tudi sestavni deli odločitvenega podpornega sistema BfR (BfR-Decision Support System – BfR-DSS), ki so ga razvili v Nemškem državnem inštitutu za oceno tveganja (BfR). Avtorji so pri ustvarjanju Toxtreejevih programskih modulov izhajali iz omejenega BfR-DSS oz. pravil, ki ga tvorijo, in jih nadgradili (50, 51). V uvodu smo že omenili, da sta ista modula kot v Toxtreeju prisotna tudi kot sestavna dela orodja OECD QSAR Toolbox (9).

Z obema programskima moduloma lahko na podlagi pravil, ki ju definirajo, ocenjujemo le spojine s čistostjo 95 % ali več, in sicer je možna le ocena organskih spojin (molekule, ki vsebujejo C, H, O, N, P, S, halogene in Si), torej te spojine spadajo v uporabno domeno obeh modulov. Moramo se namreč zavedati, da mora spojina, ki ji želimo napovedati biološko aktivnost, vsebovati karakteristike učnega niza, zato da spadajo v področje uporabnosti modela in jih je ta sposoben oceniti (6, 48, 50, 52).

3.1.2 Razvojna orodja

Aplikacija Toxtree se izvaja v Java™. Kot osnovno orodje kemijske informatike program uporablja Java™ Chemistry Development Kit (CDK). Kot glavno razvojno orodje se uporablja Integrated Development Environment (IDE) Eclipse v povezavi z Apache Ant (47).

3.1.3 Osnova za delovanje modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži (draženje kože/povzročanje opeklin na koži)

3.1.3.1 Splošen opis pravil

Programski modul je ustvaril IdeaConsult Ltd. (Sofia, Bulgarija) po pogodbi za JRC (47). Programski modul omogoča uporabnikom enostaven način napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na osnovi njihove strukture in fizikalno-kemijskih lastnosti. Ti dve toksični lastnosti spojin napove z izločitvenimi pravili, ki temeljijo na omejitvah fizikalno-kemijskih lastnosti in vključitvenimi pravili, ki temeljijo na strukturnih opozorilih. Ta dva niza pravil sta bila ustvarjena oz. posodobljena s pomočjo Orodja za oceno dražilnosti in jedkosti spojin na koži (The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool – SICRET), ki ga je razvijalo več avtorjev (John D. Walker, Ingrid Gerner, Etje Hulzebos in Kerstin Schlegel) v okviru Nemškega državnega inštituta za oceno tveganja (BfR) (38, 50, 53). Avtorji so pri razvoju pregledali vse do tedaj razvite modele (Q)SAR (ki so jih razvili Zinke, Barrat, Hayashi in sodelavci ter Smith in sodelavci) za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži, mehanistične razlage, na osnovi katerih so bili ti narejeni in preglednost modelov (Q)SAR ter njihovo aplikacijo in jih upoštevali pri izgradnji pristopa SICRET (50, 53).

SICRET je stopenjski pristop, ki za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži uporablja niz izločitvenih pravil (napovejo spojine, ki ne delujejo dražilno ali jedko) in niz vključitvenih pravil (napovejo dražilne in jedke spojine). Če je testirana spojina s pomočjo obeh uporabljenih pravil bila razvrščena, kot da na koži ne deluje jedko ali dražilno, so uporabili še dodatno testiranje *in vitro*. Če je testiranje *in vitro* pokazalo, da spojina deluje dražilno ali jedko na koži oz. ne deluje dražilno ali jedko na koži, ta podatek uporabimo v povratnih zankah, ki omogočajo prepoznavanje »novih« omejitev za fizikalno-kemijske lastnosti (v primeru negativnega testa *in vitro*) ali strukturnih opozoril (v primeru pozitivnega testa *in vitro*). To je posebnost pristopa SICRET in hkrati njegova glavna

prednost pri napovedi učinka spojin. Uporabljeni test *in vitro* je bil kasneje validiran s strani regulatornih organov (50). Tako so s pomočjo pristopa SICRET tvorili izključitvena in vključitvena pravila, ki veljajo v Toxtreejevem programskem modulu za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.

Izključitvena pravila prepoznajo spojine, ki na koži ne delujejo dražilno in/ali jedko s pomočjo omejitev njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (pomembne pri penetraciji in vezavi na biološke molekule kože). Te vključujejo tališče, molekulsko maso, porazdelitveni koeficient oktanol-voda, površinsko napetost, parni tlak, topnost v vodi in topnost v lipidih (merjene ali ocenjene pri sobni temperaturi). Pravila so tvorili tako, da so zbrali fizikalno-kemijske lastnosti učnega niza 1833 kemikalij s čistostjo $\geq 95\%$ in z znanim delovanjem na kožo. Podatke so črpali iz podatkovne baze ESTOFF in Evropske baze podatkov o kemikalijah (EU New chemicals Database) (6). Nato so določili mejne vrednosti fizikalno-kemijskih lastnosti, ki napovejo, da spojina ne deluje dražilno in/ali jedko na koži. Te mejne vrednosti fizikalno-kemijskih lastnosti so ugotavljali najprej za vse spojine, nato pa za posamezne kemijske razrede. Pravila delujejo na principu **ČE-POTEM NE (tako delujejo izključitvena in vključitvena pravila obeh modulov)**. Primer: ČE ima spojina s kemijsko formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}$ tališče $> 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, **POTEM NE** deluje dražilno in/ali jedko na koži (v učnem nizu so imele vse spojine, ki so delovale kot iritant ali povzročitelj opeklin, tališče nižje od $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) (6, 9, 50). Zaradi izključitvenih pravil pri vnosu strukture v programski modul le ta zahteva tudi vnos podatkov o določenih fizikalno-kemijskih lastnostih spojine. Pri tem programski modul sam izračuna podatke o molekulski masi vnesene spojine in v večini primerov tudi $\log P_{ow}$, medtem ko je preostale podatke treba vnesti ročno. Program sicer omogoča nadaljevanje ocene brez določenega podatka o fizikalno-kemijski lastnosti spojine, vendar se pri tem zmanjša zanesljivost rezultata (47, 54). Slaba lastnost programskega modula je, da podatkov o nekaterih fizikalno-kemijskih lastnostih ni zmožen izračunati sam, kot to zmorejo nekateri drugi programi za oceno toksičnih lastnosti (9, 50), vendar so ti podatki prosto dostopni tudi v različnih spletnih virih (npr. eChemPortal, ChemicalBook, ChemSpider), tako da jih ni težko pridobiti. Obstajajo pa tudi metode *in silico* oz. računalniške aplikacije, ki različne vrednosti za fizikalno-kemijske lastnosti spojin izračunajo na osnovi kemijske strukture spojine (modeli QSPR), npr. ACD/Labs (plačljiv, dostopen na www.acdlabs.com), ADMET Predictor (plačljiv, dostopen na www.simulationsplus.com), ChemAxon (plačljiv,

dostopen na www.chemaxon.com) ChemOffice (plačljiv, dostopen na www.cambridgesoft.com), Episuite (prosto dostopen na <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>) SPARC (prosto dostopen na <https://www.archemcalc.com/sparc.html>) in VCCLAB (prosto dostopen na www.vcclab.org) (55). Izjema, kar se tiče dostopnosti, je podatek o topnosti v lipidih, ki je težje dostopen, ker je izmerjen za zelo malo spojin, kar so ugotovili tudi avtorji pri validaciji izključitvenih pravil (56, 57). Ta pravila so bila ustrezno ocenjena in so pokazala visoko negativno napovednost, in sicer 99 % za povzročitelje opeklin in 97 % za iritante (9).

Če ni nobena fizikalno-kemijska lastnost spojine izven s pravili določenih mejnih vrednosti, je verjetno, da spojina na koži deluje dražilno in/ali jedko. V tem primeru programski modul pregleda strukturo spojine za strukturalna opozorila, katerih prisotnost v strukturi spojine napove, da spojina draži kožo in/ali povzroča opekline (vključitvena pravila) (50, 53). Pri nasprotujočih si napovedih je program zasnovan tako, da bolj resen učinek odtehta manjše učinke (56). Pri tvorbi vključitvenih pravil za strukturalna opozorila so avtorji uporabili literaturne podatke iz članka, ki so ga objavili Hulzebos in sodelavci (58) ter podatke iz Evropske baze podatkov o kemikalijah. Vključitvena pravila so bila kategorizirana glede na mehanistično razlago za draženje kože in/ali povzročanje opeklin. Tudi ta pravila so ustrezno ocenjena in imajo visoko pozitivno napovednost, in sicer 95 % za povzročitelje opeklin in 68 % za iritante (9, 53).

3.1.3.2 Mehanistična razlaga kožnega draženja/povzročanja opeklin

Opekline na koži: mehanizem jedkosti spojin na koži v glavnem zadeva direktno uničenje kožnega tkiva s kemikalijami, npr. erozija *stratum corneum* (rožene plasti), večinoma z anorganskimi kislinami in bazami ter močnimi organskimi kislinami in bazami (pH: pH < 2 in > 11,5). Opekline povzročajo tudi kemikalije, ki prehajajo skozi kožo in »reagirajo« s proteini, lipidi in preostalimi biomolekulami v kožnem tkivu. Vezava povzroči erozijo, ta pa vodi v nekrozo. Sem spadajo kvarterni dušikovi ioni, heterociklični dušikovi ioni, žveplove soli in akrilati ter kationski surfaktanti (9, 59). Draženje kože: za organske molekule so mehanizmi, ki vodijo v draženje kože, opisani z dvostopenjskim procesom, kjer mora kemikalija najprej prodreti v *stratum corneum* in nato sprožiti biološki odgovor v globljih plasteh kože zaradi poškodbe tkiva (povzročena s kemikalijami

zaradi njihove »reaktivnosti« ali zmožnosti fizikalno-kemijskih interakcij z makromolekulami v koži) (9). Draženje kože naj bi bilo povzročeno z mehanizmi, kot so reakcija kožnih beljakovin, interferenca z lipidi v *stratum corneum* s površinsko aktivnimi spojinami, razpustitev kožne maščobe in dezintegracije kože z organskimi molekulami, ki imajo nizko molekulsko maso. Za oboje (draženje kože in povzročanje opeklin) poznamo še dva vzroka, in sicer sta to penetracija anionskih ali neionskih površinsko aktivnih organskih kemikalij z ustreznimi hidrofobnimi/hidrofilnimi lastnostmi preko *stratum corneum* in spodbujanje citotoksičnega odgovora pokožnice ali/in usnjice, kjer jakost citotoksičnega odgovora odloča, če pride do draženja kože ali opeklin na koži (59).

3.1.4 Osnova za delovanje modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh (draženje oči/povzročanje hudih poškodb oči)

3.1.4.1 Splošen opis pravil

Ta modul sta razvili Ivanka Tsakovska in Nina Jeliaskova po pogodbi za JRC (38, 47). Modul omogoča uporabnikom enostaven način napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na očeh na osnovi njihove strukture in fizikalno-kemijskih lastnosti. Ti dve toksični lastnosti spojin modul napoveduje s pomočjo izključitvenih in vključitvenih pravil, ki so jih zbrali Ingrid Gerner, Manfred Liebsch in Horst Spielmann (38). Oba niza pravil so razvili oz. dopolnili v okviru Nemškega državnega inštituta za oceno tveganja (BfR), podatke za tvorbo pravil pa so črpali iz podatkovne baze ESTOFF, ki so jo ustvarili Nemški regulatorni organi in temelji na Evropski bazi podatkov o kemikalijah, ustvarjena pa je bila z namenom iskanja in pripravo modelov (Q)SAR za toksikološko oceno kemikalij (38, 52). Ta pravila so bila ocenjena, kar se tiče njihove uporabnosti za napovednost. Pravila so pokazala visoko negativno napovednost, in sicer 87 % za izključitvena pravila in visoko pozitivno napovednost – več kot 80 % (odvisno od varnostnega razreda) – za vključitvena pravila. Poleg tega smo našli dodatne ocene, in sicer imajo izključitvena pravila pri eksterni validaciji negativno napovedno vrednost 87 %, vendar so kasneje ugotovili, da spojine, ki so jih pravila ocenila napačno, niso spadale v uporabno domeno pravil, ker so tvorile razpadne produkte, ki so delovali kot iritanti. Zato naj bi imela izključitvena pravila negativno napovedno vrednost, ki znaša 100 %, vključitvena pravila pa imajo pozitivno napovedno vrednost, ki znaša 80–100 % (52, 57).

Uporaba izključitvenih in vključitvenih pravil je osnovana na istem principu kot pri napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na koži, se pa razlikujejo sama pravila (razen tista, ki napovejo jedkosti spojin na koži, saj so vključena tudi v ta modul), saj je ocenjevanje dražilnosti in jedkosti spojin na očeh povezano z drugačnimi mehanističnimi ozadji. V programskem modulu za oceno dražilnosti in jedkosti spojin na očeh je prisotna tudi napoved za jedkost spojin na koži, ker je v EU regulatorno sprejeto pravilo, da spojine, ki povzročajo opekline na koži (delujejo jedko), povzročajo hude poškodbe (delujejo jedko) na očeh (38).

Izključitvena pravila so bila v tem primeru prvič uporabljena v računalniškem programu z namenom napovedovanja dražilnosti in jedkosti spojin na očeh. Avtorji so jih tudi posodobili in dopolnili (38). So zbirka 31 izključitvenih pravil (7 za vse spojine in 24 za različne razrede spojin) za prepoznavo spojin, ki na očeh ne delujejo dražilno in/ali jedko na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti testirane spojine, ki vključujejo tališče, molekulsko maso, porazdelitveni koeficient oktanol-voda, površinsko napetost, parni tlak, topnost v vodi in topnost v lipidih (merjene ali ocenjene pri sobni temperaturi). Strukturna opozorila so bila že prej uporabljena v nekaterih računalniških modelih (DART) za napoved dražilnosti spojin na očeh, vendar le-ta temeljijo na izračunih specifičnih elektronskih potencialov. Tudi vključitvena pravila so avtorji posodobili in dopolnili z uporabo podatkov iz regulatorne baze podatkov ESTOFF. Torej so to opozorila, ki temeljijo na »izkustvih«, pridobljenih z veliko količino standardiziranih in ocenjenih regulatornih podatkov. Teh vključitvenih pravil, ki temeljijo na strukturnih opozorilih, je 27 in napovedujejo prisotnost dražilnega in/ali jedkega učinka spojine na očeh (9, 38, 52).

Podatki iz podatkovnih baz, ki so uporabljene za izgradnjo vključitvenih in izključitvenih pravil, so varovani, kar zmanjša preglednost (transparentnost) modula, ki je zahtevana oz. zaželeno za njegovo validacijo. Vpogled v te podatke je omogočen le nekaterim uradnim avtoritetam (53).

3.1.4.2 Mehanistična razlaga očesnega draženja

Zaznani so štirje mehanizmi oz. glavni dogodki, ki povzročajo draženje oči. V glavnem so ti učinki najprej vidni na roženici, saj je ta primarno mesto stika s kemikalijo. Glavni mehanizmi očesnega draženja so zbrani v preglednici IV.

Preglednica IV: Glavni mehanizmi očesnega draženja (9)

Mehanizem/ glavni dogodek	Obrazložitev
Razkroj (liza) celične membrane	Razkroj celične membrane zaradi izpostavljenosti »membransko aktivnim kemikalijam«, kot so npr. površinsko aktivne snovi
Koagulacija	Denaturacija proteinov povzročena s kislinami, bazami ali organskimi topili
Saponifikacija (umiljenje)	Alkalna hidroliza lipidov; morfološki učinek je podoben koagulaciji in razkroju celičnih membran, vendar učinek sčasoma napreduje po tkivu
Kemična reaktivnost	Kemikalije »reagirajo« z makromolekulami celic, kot so proteini in nukleinske kisline, kar vodi v razkroj (lizo) in koagulacijo; te kemikalije so še najbolj zaskrbljujoče, saj se njihov učinek ne pojavi takoj in pride do zakasnjene draženja/povzročanja hudih poškodb na očeh

3.2 Izbor spojin za testiranje

Za namen diplomske naloge smo se odločili sestaviti štiri nize spojin. Za vrednotenje programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži smo izbrali 95 spojin, za vrednotenje programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh pa 86 spojin. Te izbrane spojine smo razdelili na dva testna niza glede na njihovo biološko aktivnost, in sicer 50 spojin, ki delujejo dražilno ali povzročajo opekline na koži (zbrano v prilogi 1), in 45 spojin, ki delujejo dražilno na očeh ali povzročajo hude poškodbe oči ali opekline na koži (zbrano v prilogi 3), s pomočjo katerih smo ocenili občutljivost za napovednost obeh programskih modulov (pri tem dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in nato še napovednost za posamezne končne točke: dražilnosti spojin na koži, jedkosti spojin na koži in dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh. V drugih dveh testnih nizih smo izbrali 45 spojin, ki na koži ne delujejo dražilno ali ne povzročajo opeklin na koži (zbrano v prilogi 2), in 41 spojin, ki na očeh ne delujejo dražilno, ne povzročajo hudih poškodb oči ali ne povzročajo opeklin na koži (zbrano v prilogi 4), s pomočjo katerih smo ocenili specifičnost za napovednost obeh programskih modulov (pri tem dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in njunih končnih točk: dražilnosti spojin na koži, jedkosti spojin na koži in dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh. Na podlagi vseh spojin smo izračunali še točnost za napovednost celotnih programskih modulov in točnost za napovednost posameznih končnih točk programskih modulov.

Podatke za testirane spojine smo našli v literaturnih virih 13 in 60–67. Uporabili smo tudi sledeče podatkovne baze:

- eChemPortal, ki je zbirka različnih podatkovnih baz (trenutno 29 (december 2014)), ki omogočajo brezplačni javni dostop do podatkov o lastnostih kemikalij, med drugim pa vsebuje tudi podatke o toksikoloških lastnostih spojin, med katerimi se nahajajo podatki o draženju in povzročitvi opeklin na koži in očeh (<http://www.echemportal.org>);
- Haz-Map, ki ponuja informacije o nevarnih kemikalijah in poklicnih boleznih, povezanih z uporabo kemikalij (www.haz-map.com);
- ChemicalBook, ki omogoča dostop do različnih podatkov o lastnostih posameznih spojin (<http://www.chemicalbook.com/>);
- Household Product Database, ki podaja podatke o sestavi različnih izdelkov, ki se uporabljajo za osebno nego, v gospodinjstvu ipd. (<http://hpd.nlm.nih.gov>);
- ChemSpider, ki omogoča dostop do različnih podatkov o lastnostih posameznih spojin in omogoča tudi napoved fizikalno-kemijskih lastnosti spojine z napovednim sistemom ChemAxon (<http://www.chemspider.com>);
- Wikipedija, kjer smo dobili podatke o lastnostih določenih spojin, v glavnem pa smo jo uporabili za pridobivanje števil CAS (<http://en.wikipedia.org/>).

Pri delu smo največ uporabljali eChemPortal. Najuporabnejša baza podatkov v podatkovni bazi eChemPortal je ECHA/CHEM, saj navede podatke o testiranju, kar pomeni, da lahko ocenimo kakšna je ustreznost uporabljene testne metode. Ugotovili smo, da se moramo pri oceni spojin opirati na validirane testne metode (zaželeno tudi novejšje) za določanje dražilnosti in jedkosti na koži in očeh, saj smo večkrat dobili različne podatke o dražilnosti in jedkosti spojin na očeh in na koži za isto spojino, testiranja pa so bila izvedena z različnimi metodami. Znotraj podatkovne baze eChemPortal so bile najuporabnejše pri našem delu še podatkovne baze ACToR, TOXNET, CCR in HSDB. Nekaj lastnosti spojin smo preverili kar v varnostnih listih kemikalij (MSDS – Material Safety Data Sheet ali SDS – Safety Data Sheet).

Odločili smo se, da testiramo tudi spojine, ki so sestavni deli kozmetičnih izdelkov. Ti so velikokrat vir draženja kože in oči, zato smo potrebovali podatke o njihovi sestavi, te pa smo pridobili na različnih spletnih straneh:

- SpecialChem, ki ponuja podatke o sestavi kozmetičnih izdelkov (<http://www.specialchem4cosmetics.com/services/inci/>);

- CosIng, ki je uradna stran EU in omogoča vpogled v vse spojine, vključene v kozmetične izdelke v EU; iščemo jih lahko po številu CAS ali imenu spojine (<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>);
- SkinDeep, ki je podatkovna baza kozmetičnih izdelkov (<http://www.ewg.org/skindeep/>).

Na spletu je tudi sicer prisotnih zelo veliko spletnih strani, ki navajajo sestavo različnih kozmetičnih izdelkov. Zaradi lažje opredelitve potencialnih alergenov in iritantov namreč Uredba EC 1223/2009 zahteva, da so na kozmetičnem izdelku navedene vse sestavine izdelka (13, 14).

Uporabili smo tudi Centralno bazo zdravil, ki je dostopna na spletu na [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView) in nam je služila kot vir informacij za nelastniška imena zdravil za bolezni kože, podkožnega tkiva, zdravil za očne bolezni, pomožne snovi in učinkovine v omenjenih izdelkih, ki so registrirani v Sloveniji. Na osnovi nelastniških imen smo na spletnih straneh različnih proizvajalcev zdravil poiskali še pomožne snovi, ki se uporabljajo v omenjenih zdravilnih izdelkih (velja za tiste, za katere nismo našli podatkov v centralni bazi zdravil). Tudi na spletni strani www.drugs.com, ki vsebuje neodvisne in zanesljive podatke o več kot 24.000 registriranih zdravilih in pripravkih OTC, smo poiskali podatke o spojinah in pomožnih snoveh, prisotnih v zdravilih, ki se uporabljajo v pripravkih za zdravljenje očesnih bolezni, in pripravkih OTC, ki se uporabljajo na očeh.

Na spletu je torej mogoče najti kar nekaj prosto dostopnih podatkovnih baz, ki omogočajo vpogled v lastnosti kemikalij in hkrati pripomorejo k oceni rezultatov testiranja želenega ekspertnega sistema.

3.3 Testiranje spojin

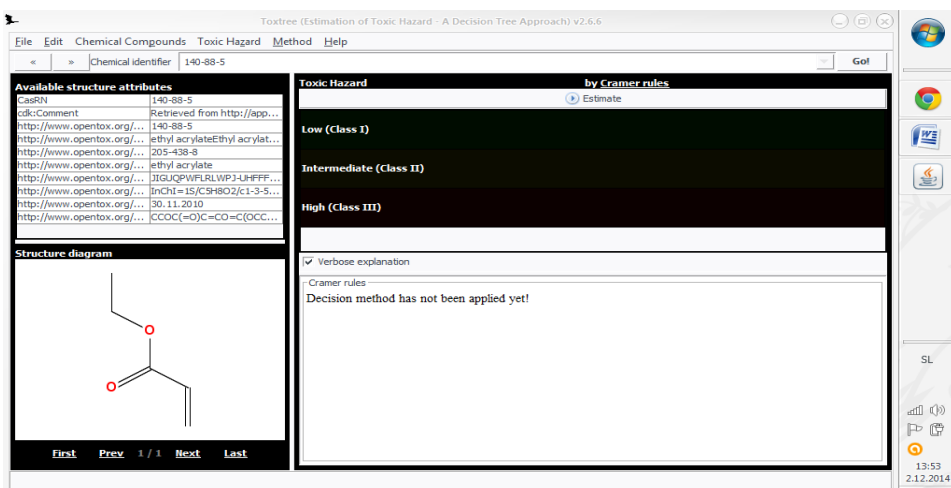
Vse testirane spojine smo najprej preverili v podatkovni bazi eChemPortal, česar nismo našli, pa smo poiskali v podatkovni bazi ChemicalBook ali preverili v varnostnih listih kemikalij (MSDS – Material Safety Data Sheet ali SDS – Safety Data Sheet).

Ko smo preverili podatke o dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh, smo z internetne strani <http://toxtree.sourceforge.net> na osebni računalnik naložili program Toxtree, in sicer verzijo 2.6.6.

Pred prvo uporabo programa smo v glavnem oknu izbrali polje »Method« in nato »Decision tree options« ter v programskem oknu polje »Options« in »RemoteQuery«. Nato smo obkljukali možnost »Remote lookup enabled« in to potrdili z »OK«. S tem smo omogočili več načinov vnosa spojine. To opravilo nam priporoča tudi program, ko se s kurzorjem postavimo na okno »Chemical identifier«. Sedaj lahko v program vpišemo spojino, in sicer tako, da v okno »Chemical identifier« vpišemo eno od sledečih možnosti:

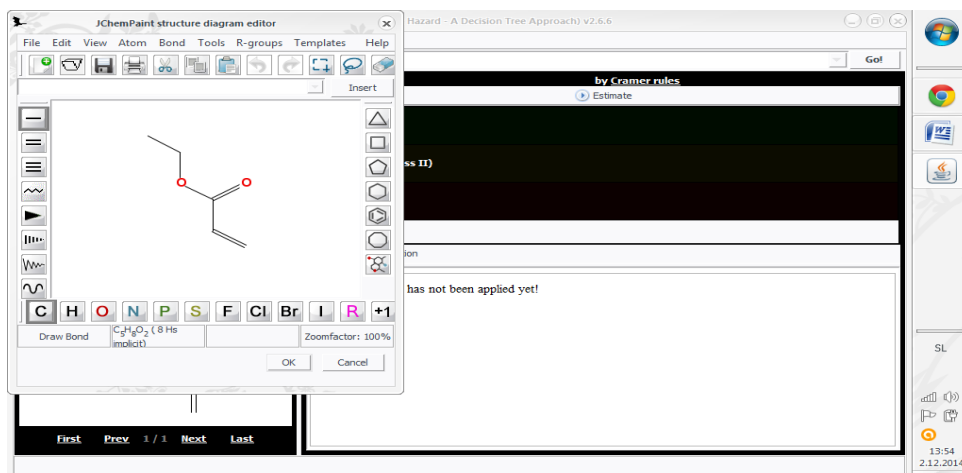
- kemijsko ime spojine (znana nelastniška kemijska imena);
- število CAS (CAS Registry Number), ki je unikatno število in ga spojini dodeli **C**hemical **A**bstracts **S**ervice;
- število EINECS (**E**uropean **I**nventory of **E**xisting **C**ommercial **C**hemical **S**ubstances), ki je unikatno sedemmestno število, ki ga dodelijo regulatorni organi EU vsem spojinam znotraj EU;
- ime spojine IUPAC, ki je nedvoumno ime organske kemijske spojine, katerega pravila narekuje **I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry;
- zapis InChI (IUPAC International Chemical Identifier), ki je tekstovni identifikator kemične substance, ki je nelastniški in je bil razvit z namenom hitrejšega iskanja po podatkovnih bazah in na spletu;
- zapis SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification), ki je zapis spojine v obliki črk in simbolov, ki za nedvoumen in podroben opis strukture kemijskih molekul uporablja kratke nize znakov ASCII (American Standard Code for Information Interchange). Specifikacijo SMILES lahko večina urejevalnikov molekul pretvori nazaj v dvodimenzionalno risbo ali tridimenzionalen model molekule. Ta način zapisa je še najbolj zanesljiv, saj se nam je med vnašanjem spojin zgodilo, da program ni prepoznal vnesene številke CAS ali kemijskega imena, je pa prepoznal isto strukturo spojine na osnovi vnesene kode SMILES.

Pri tem delu smo največ uporabljali vnos spojine s pomočjo specifikacije SMILES ali števila CAS. Ko spojino vpišemo v ustrezno okno, izberemo polje »Go!«. Pri tem nas program opozori, da moramo izbrati še odločitveno metodo.



Slika 1: Glavno okno programa Toxtree (verzija 2.6.6.) ob vnosu spojine v programsko okno »Chemical identifier« s pomočjo števila CAS

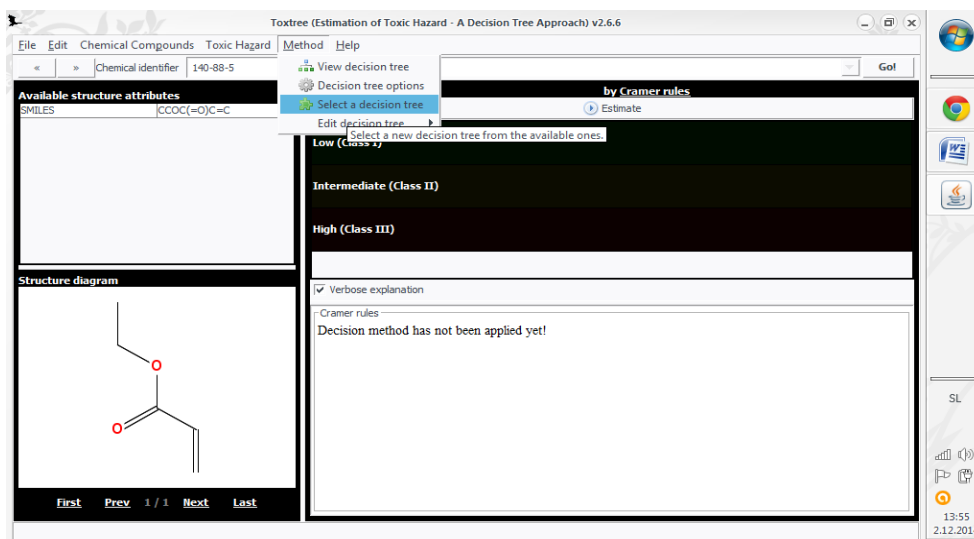
Imamo tudi možnost, da testirano spojino narišemo v programu Toxtree, in sicer s pomočjo programskega orodja »JChemPaint structure diagram editor«. Do tega programskega orodja pridemo tako, da v glavnem oknu izberemo polje »Chemical Compounds« in nato »Edit compound«. Na zaslonu se pokaže okno, kjer lahko spojino narišemo (47).



Slika 2: Pojavno okno programskega orodja »JChemPaint structure diagram editor« ob risanju spojine v programu Toxtree (verzija 2.6.6.)

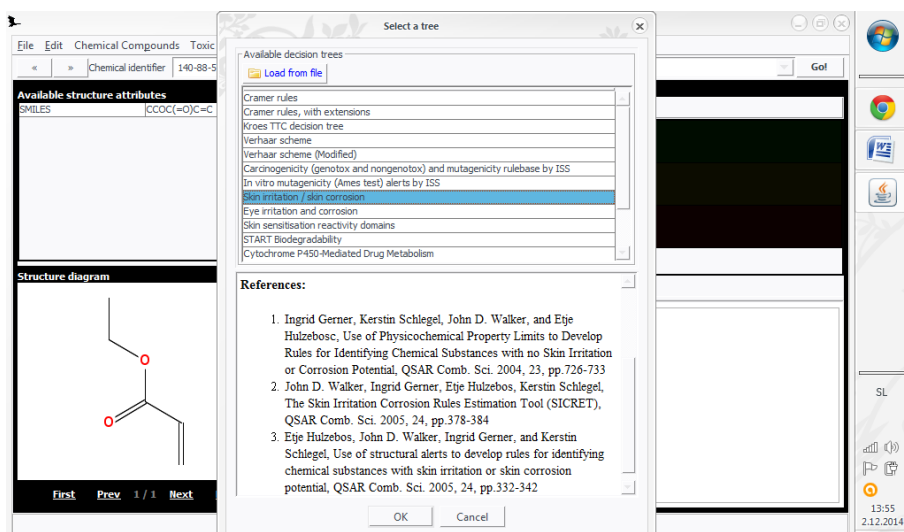
Po izboru spojine preverimo strukturo spojine, da se prepričamo, ali je to naša želena spojina.

V naslednjem koraku smo izbrali **metodo testiranja** z izborom polja »Method« in nato »Select decision tree«.



Slika 3: Izbiranje odločitvenega drevesa (programskega modula) v opravilni vrstici programa Toxtree (verzija 2.6.6)

Tako smo našli vsa odločitvena drevesa oz. vse programske module. Iz ponujenih možnosti smo za prva dva niza za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži (prilogi 1 in 2) izbrali »Skin irritation/Skin corrosion«, za druga dva niza za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh (prilogi 3 in 4) pa »Eye irritation and corrosion«.

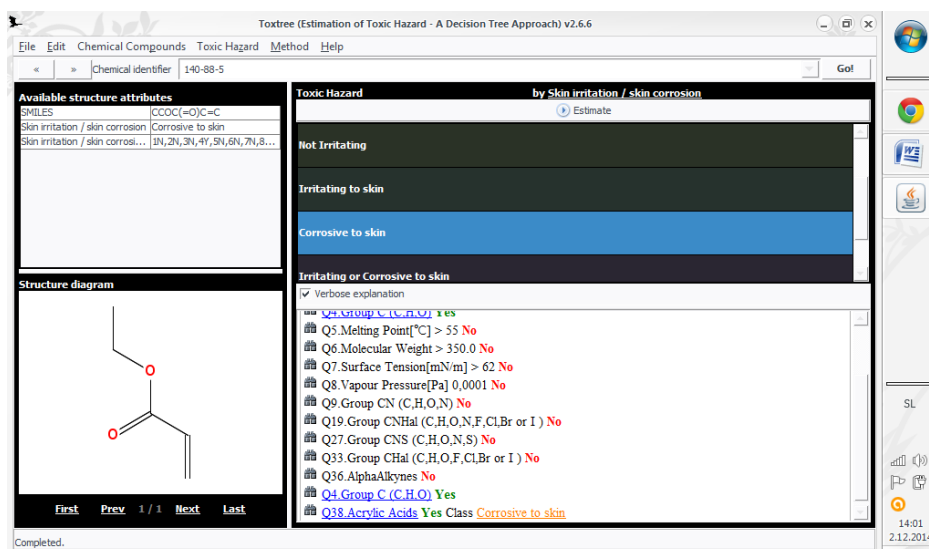


Slika 4: Pojavno okno, ki se pokaže ob izbiri programskega modula (odločitvenega drevesa) v programu Toxtree (verzija 2.6.6)

Po izboru programskega modula moramo pri spojinah v program vpisati še določene vrednosti za fizikalno-kemijske lastnosti spojine (velja za oba modula), ki jih program potrebuje za odločanje (vse merjene pri sobni temperaturi), in sicer:

- $\log P_{ow}$ ali $\log K_{ow}$ (podatek o tej vrednosti v večini primerov pridobi program kar sam, le redko ga moramo vnesti ročno);
- Melting Point (temperatura tališča v °C);
- Vapour Pressure (parni tlak v Pa);
- Lipid solubility (topnost v lipidih v g/kg); po navadi tega podatka pri spojinah ni. V tem primeru označimo okence »Silent« in nadaljujemo testiranje, vendar so rezultati raziskave manj zanesljivi, kar smo že omenili. V kasnejših validacijah izločitvenih pravil za napoved tako očesne kot kožne dražilnosti in jedkosti spojin ugotavljajo, da je spojin z določeno topnostjo v lipidih zelo malo in je uporabnost pravila, ki temelji na tej fizikalno-kemijski lastnosti, omejena (54, 56, 57);
- Water Solubility (topnost v vodi v g/l);
- Surface tension (površinska napetost v mN/m).

Izberemo še polje »Estimate« in program nato ovrednoti spojino. Pri napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na koži je možnih izidov sedem, pri napovedi dražilnosti in jedkosti spojin na očeh pa je možnih enajst izidov.



Slika 5: Pojavno okno v programu Toxtree ob napovedi izida v programskem modulu za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži

V končni fazi smo rezultate zbrali v štiri tabele s programom Microsoft Excel. Prvi dve tabeli obsegata spojine, ki jih preverjamo za dražilnost in jedkost na koži (vsaka za en niz spojin). Prvi niz pri tem predstavljajo spojine, ki na koži delujejo dražilno ali jedko (priloga 1), drugi niz pa spojine, za katere v literaturi ne zasledimo dražilnega ali jedkega

učinka na koži (priloga 2). V tretjo tabelo uvrstimo spojine, ki dražijo oči in povzročajo hude poškodbe oči ali opekline na koži (priloga 3), v četrto pa spojine, za katere v literaturi ne zasledimo dražilnega ali jedkega učinka na očeh ali jedkega učinka na koži (priloga 4). Ker je po končani raziskavi izšla nova verzija Toxtree (2.6.13) smo nekaj testiranih spojin preverili še v tej verziji. Pri vseh spojinah smo dobili iste rezultate za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh kot v verziji 2.6.6.

3.4 Analiza rezultatov testiranja

Na podlagi pridobljenih rezultatov testiranja smo želeli ovrednotiti napovednost programskih modulov računalniške aplikacije Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh. V literaturi smo zasledili, da obstaja več statističnih metod za vrednotenje modelov (Q)SAR, ki so največkrat ovrednoteni glede na njihovo napovednost za določeno toksično lastnost, in sicer s pomočjo interne ali eksterne validacije (ti dve se razlikujeta glede na njuno zmožnost in učinkovitost ocene napovednosti modela) (49, 68). Odločili smo se za vrednotenje napovednosti z vidika specifičnosti, občutljivosti in točnosti, ker se nam v primerjavi z ostalimi metodami le-ta zdi najenostavnejša za uporabo in je obenem tudi pogosto uporabljena (48, 68, 69).

3.4.1 Izračun napovednosti programskih modulov za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh

Toxtreejev programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži ovrednoti testirane spojine z enim od sedmih možnih izidov. Rezultati so ovrednoteni s stavki R (risk frases), in sicer: R34 – povzroča opekline (razjede na koži, ki nastanejo po 4-urnem stiku spojine s kožo), R35 – povzroča hude opekline (razjede na koži, ki nastanejo po 3 minutah po nanosu spojine na kožo) in R38 – draži kožo. Rezultati so ovrednoteni s stavki R, ki v sedaj veljavni Uredbi 1272/2008 ali Uredbi CLP niso več veljavni, vendar jih je enostavno pretvoriti v veljavne oznake. Problem se pojavi pri oceni dražilnosti spojin na koži, saj se razvrščanje spojin med iritante in spojine, ki niso iritanti, malo razlikuje (kot opisano v uvodu – pri vrednotenju ocen Draizovega testa za določanje kožnega draženja) po obeh razvrstilnih sistemih. Za namen naše raziskave smo zanemarili to razliko in upoštevali le stari sistem razvrščanja in označevanja.

Izidi programskega modula so sledeči:

- Ne povzroča opeklin na koži (NI R34 ali R35);
- Ne draži kože in ne povzroča opeklin (NI R34, R35 ali R38);
- Ne draži kože (NI R38);
- Draži kožo (ustreza oznaki R38);
- Povzroča opekline (ustreza oznakama R34 in R35);
- Draži kožo ali povzroča opekline (ustreza vsem trem oznakam R34, R35 in R38);
- Neznano.

Toxtreejev programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh ovrednoti testirane spojine z enim od enajstih možnih izidov, ki so tudi obrazloženi s stavki R, kjer velja: R34 – povzroča opekline, R35 – povzroča hude opekline, R36 – draži oči in R41 – nevarnost hudih poškodb oči. Rezultati so ovrednoteni s stavki R, ki v sedaj veljavni Uredbi 1272/2008 ali Uredbi CLP niso več veljavni, vendar jih je enostavno pretvoriti v veljavne oznake. Izidi Toxtreejevega programskega modula so sledeči:

- Ne povzroča opeklin R34 ali R35;
- Ne povzroča poškodb R34, R35, R36 ali R41;
- Ni očesni iritant R41;
- Ni očesni iritant R36;
- Ne povzroča opeklin (ali poškodb na očeh) R34, R35 ali R41;
- Ne povzroča hudih poškodb oči R34, R35 ali R36;
- Ni očesni iritant R36 ali R41;
- Povzroča hude poškodbe oči;
- Povzroča zmerno reverzibilno draženje oči;
- Povzroča opekline na koži;
- Neznano.

Kot že omenjeno, smo vrednotili napovednost Toxtreejevih programskih modulov za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh z vidika občutljivosti, specifičnosti in točnosti. V ta namen smo vnesli rezultate testiranja v štiri ločene tabele s programom Microsoft Excel (priloga 1, 2, 3 in 4), nato pa izračunali občutljivost, specifičnost in točnost za napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na

koži: najprej smo to storili za programski modul (kar pomeni, da smo zanemarili razliko med dražilnostjo in jedkostjo spojin in obravnavali programski modul, kot da ima ta le eno končno točko), nato pa še za njegovi končni točki: dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži. Za izračun smo uporabili prvi (priloga 1) in drugi niz (priloga 2) spojin. Izračunali smo tudi občutljivost, specifičnost in točnost za napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh: najprej smo to storili za programski modul (kar pomeni, da smo zanemarili razliko med dražilnostjo in jedkostjo spojin in obravnavali programski modul, kot da ima ta le eno končno točko), nato pa še za njegovi končni točki: dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh. Za izračun smo uporabili tretji (priloga 3) in četrti niz (priloga 4) spojin.

3.4.1.1 Občutljivost za napovednost

V preglednici V so predstavljene formule s katerimi izračunamo občutljivost obeh programskih modulov in njihovih končnih točk. Za izračun uporabimo podatke o testnih spojinah iz prvega niza (priloga 1) za spojine, ki jih testiramo za dražilnost in jedkost na koži in podatke iz tretjega niza (priloga 3) za spojine, ki jih testiramo za dražilnost in jedkost na očeh.

Preglednica V: Formule za izračun občutljivosti za napovednost programskih modulov in za njihovih posameznih končnih točk

Formula za izračun občutljivosti za napovednost programskega modula	Formula za izračun občutljivosti za napovednost dražilnosti spojin	Formula za izračun občutljivosti za napovednost jedkosti spojin
OBČUTLJIVOST = $(N_{(IK+)}/N_{(LIK+)}) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(N_{(I+)}/N_{(LI+)}) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(N_{(K+)}/N_{(LK+)}) \times 100$

Pomen oznak v formulah:

$N_{(IK+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot dražilne ali jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(LIK+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot dražilne ali jedke na koži ali očeh;

$N_{(I+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot iritanti in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(LI+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot iritanti (seštevek lažno negativnih in pravih pozitivnih izidov);

$N_{(K+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(LK+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot jedke na koži ali očeh (seštevek lažno negativnih in pravih pozitivnih izidov).

Pri oceni občutljivosti za napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži (velja tudi za izračun specifičnosti programskega modula) smo upoštevali sledeče: če je programski modul ovrednotil spojino z izidi 1, 2 ali 3, smo spojino šteli, kot da ne draži kože ali ne povzroča opeklin na koži, če pa jo je označil z izidi 4, 5 ali 6, smo spojino šteli, kot da draži kožo ali povzroča opekline na koži. Za namen napovednosti programskega modula ni pomembno, da razlikujemo med spojinami, ki kožo dražijo, in spojinami, ki povzročajo opekline na koži. Pomembno je le, da je rezultat pozitiven ali negativen, da spojina kožo draži ali povzroči na njej opekline ali pa kožo ne draži ali ne povzroči opeklin na koži.

Pri izračunu občutljivosti za napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži za posamezni končni točki smo upoštevali sledeče kriterije (ti kriteriji veljajo tudi pri izračunu specifičnosti za posamezni končni točki) za izide programskega modula: če je program ovrednotil spojino z izidoma 1 ali 2, smo spojino šteli, kot da ne povzroča opeklin na koži, če pa jo je ovrednotil z izidoma 2 ali 3, smo spojino šteli, kot da spojina ni iritant. Če je spojino programski modul uvrstil v skupini 4 ali 6, smo spojino šteli, kot da draži kožo. Če je programski modul uvrstil spojino v skupini 5 ali 6, smo šteli, da povzroča opekline na koži.

Pri oceni občutljivosti za napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh (velja tudi za oceno specifičnosti za napovednost programskega modula) smo upoštevali sledeče: v primeru, ko je program ovrednotil spojino z izidi 1, 2, 3, 4, 5, 6 ali 7, smo spojino šteli, kot da ne povzroča draženja ali poškodb na očeh. V primeru, ko je program ovrednotil spojino z izidi 8, 9 ali 10, smo spojino šteli, kot da povzroča draženje ali hude poškodbe na očeh.

Pri oceni občutljivosti programskega modula za napovednost dražilnosti spojin na očeh (velja tudi pri izračunu specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh) smo upoštevali sledeče kriterije za izide programskega modula: če je program ovrednotil spojino z izidoma 8 ali 9, smo spojino šteli za očesni iritant, če pa jo je programski modul ovrednotil spojino z izidi 2, 4, 6 ali 7, smo šteli, da spojina ne povzroča očesnega draženja.

Pri oceni občutljivosti programskega modula za napovednost jedkosti spojin na očeh smo upoštevali sledeče kriterije (velja tudi pri izračunu specifičnosti za napovednost jedkosti spojin na očeh) za izide programskega modula: če je program ovrednotil spojino z izidoma 8 ali 10, smo šteli, da spojina povzroča hude poškodbe oči, če pa jo je programski modul uvrstil v skupine 1, 2, 3, 5, 6 ali 7, smo šteli, da spojina ne povzroča hudih poškodb oči.

3.4.1.2 Specifičnost za napovednost

Za izračun specifičnosti za napovednost obeh programskih modulov in njunih končnih točk uporabimo formule, ki so predstavljene v preglednici VI. Za izračun specifičnosti programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži uporabimo podatke o testnih spojinah iz drugega niza (priloga 2). Za izračun specifičnosti programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh pa uporabimo podatke iz četrtega niza (priloga 4).

Preglednica VI: Formule za izračun specifičnosti za napovednost programskih modulov in za njune posamezne končne točke

Formula za izračun specifičnosti za napovednost programskega modula	Formula za izračun specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin	Formula za izračun specifičnosti za napovednost jedkosti spojin
SPECIFIČNOST = $(N_{(IK-)} / N_{(LIK-)}) \times 100$	SPECIFIČNOST = $(N_{(I-)} / N_{(LI-)}) \times 100$	SPECIFIČNOST = $(N_{(K-)} / N_{(LK-)}) \times 100$

Pomen oznak v formulah:

$N_{(IK-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot dražilne ali jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

$N_{(LIK-)}$ = število spojin, za katere v literaturi nismo zasledili, da bi delovale dražilno ali jedko na koži ali očeh;

$N_{(I-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot iritanti in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

$N_{(LI-)}$ = število spojin, za katere v literaturi nismo zasledili, da bi dražile kožo ali oči (seštevka lažnih pozitivnih in pravih negativnih spojin);

$N_{(K-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

$N_{(LK-)}$ = število spojin, za katere v literaturi nismo zasledili, da bi delovale jedko na koži ali očeh (seštevka lažnih pozitivnih in pravih negativnih spojin).

Pri oceni specifičnosti za napovednost programskih modulov upoštevamo iste razvrstitve kot pri izračunu občutljivosti, ki so navedeni zgoraj. Za izračun specifičnosti za napovednost za posamezne končne točke programskih modulov smo upoštevali iste razvrstitve kot pri izračunu občutljivosti za napovednost za posamezni končni točki programskega modula.

3.4.1.3 Točnost za napovednost

Za izračun točnosti za napovednost programskih modulov in za njune končne točke uporabimo formule, predstavljene v preglednici VII. Za izračun točnosti programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži uporabimo podatke o testnih spojinah iz prvega in drugega niza (prilogi 1 in 2). Za izračun točnosti programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh uporabimo podatke o testnih spojinah iz tretjega in četrtega niza (prilogi 3 in 4).

Preglednica VII: Formule za izračun točnosti za napovednost programskih modulov in za njune posamezne končne točke

Formula za izračun točnosti za napovednost programskega modula	Formula za izračun točnosti za napovednost dražilnosti spojin	Formula za izračun točnosti za napovednost jedkosti spojin
TOČNOST = $((N_{IK+} + N_{IK-})/N_{vsi}) \times 100$	TOČNOST = $((N_{I+} + N_{I-})/N_{vsi}) \times 100$	TOČNOST = $((N_{K+} + N_{K-})/N_{vsi}) \times 100$

Pomen oznak v formulah:

$N_{(IK+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot dražilne ali jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(IK-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot dražilne ali jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

$N_{(I+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot dražilne na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(I-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot dražilne na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

$N_{(K+)}$ = število spojin, ki so v literaturi opredeljene kot jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (pozitivni) izid;

$N_{(K-)}$ = število spojin, ki v literaturi niso opredeljene kot jedke na koži ali očeh in so tudi pri testiranju z ekspertnim sistemom dale enak (negativni) izid;

N_{vsi} = število vseh spojin, testiranih z ekspertnim sistemom.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Ocena napovednosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži

4.1.1 Občutljivost za napovednost

V preglednici v prilogi 1 smo zbrali testni niz spojin, ki nam je pomagal pri oceni občutljivosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži oz. njegovih posameznih končnih točk: dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži. V tem nizu smo zbirali spojine, ki so v literaturi, podatkovni bazi eChemPortal ali v različnih prosto dostopnih varnostnih listih označene kot kožni iritant ali povzročitelj opeklin na koži. V primeru več veljavnih nasprotujočih se študij za določanje dražilnosti in jedkosti spojin, ki se pojavijo v primeru iritantov butilhidroksianizol, benzilbenzoat, etilenglikol in Luperox 231, smo se odločili za najbolj človeku »varni« scenarij in spojine razvrstili kot iritante. Tiamin smo vključili v testne spojine kljub temu, da nismo našli validiranih testnih metod za potrditev, ker smo na več mestih zasledili, da draži kožo. Izbirali smo spojine, ki so sestavni deli izdelkov za uporabo na koži, in sicer bodisi kot pomožna snov v farmacevtskih pripravkih, ki se uporabljajo na koži, bodisi so v kozmetičnih izdelkih in izdelkih v gospodinjstvu. Preglednica v prilogi 1 je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njegove številke CAS, podatkov o dražilnosti ali jedkosti spojine na koži, pridobljenih iz virov, omenjenih v poglavju »Materiali in metode«, in spletne podatkovne baze eChemPortal, ter rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.

Na podlagi rezultatov testiranja smo s formulami, predstavljenimi v preglednici VIII, izračunali občutljivost za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki: dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži.

Preglednica VIII: Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule

Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula	Izračun občutljivosti za napovednost dražilnosti spojin na koži	Izračun občutljivosti za napovednost jedkosti spojin na koži
OBČUTLJIVOST = $(N_{(IK+)}/N_{(LIK+)}) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(N_{(I+)}/N_{(LI+)}) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(N_{(K+)}/N_{(LK+)}) \times 100$
OBČUTLJIVOST = $(38/48) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(29/35) \times 100$	OBČUTLJIVOST = $(4/7) \times 100$
OBČUTLJIVOST = 79,2 %	OBČUTLJIVOST = 82,9 %	OBČUTLJIVOST = 57,1 %

Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula: Toxtreejev programski modul v 79,2 % pravilno opredeli spojine iz izbranega niza, ki na koži delujejo dražilno ali jedko, kot povzročitelje draženja kože ali/in povzročitelje opeklin na koži. Pri izračunu smo upoštevali vse spojine, ki jih je programski modul razvrstil v kategorije 1–6. Nismo upoštevali spojin m-aminofenol in 2,5-diaminotoluen, ki ju je programski modul uvrstil v kategorijo 7, kar pomeni NEZNANO. To pomeni, da tovrstnih lastnosti teh spojin programski modul ni zmožen napovedati. V imenovalce zgornje formule za občutljivost smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 1, ki so v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal označene kot kožni iritanti ali povzročitelji opeklin ($N_{(LIK+)}$). Bilo jih je 48. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z rezultati 4, 5 ali 6, kar pomeni, da delujejo kot kožni iritanti ali povzročajo opekline ($N_{(IK+)}$). Teh je bilo 38. Programski modul je za 10 spojin podal napačno napoved kožne iritacije ali povzročanja opeklin. Pri tem je 2 spojini (tiamin – vitamin B1 in natrijev lavrilsulfat) napačno razvrstil med spojine, ki ne povzročajo iritacije/opeklin na koži, ker zanj velja izključitveno pravilo, ki pravi, da spojine s tališčem, višjim od 200 °C, na koži ne delujejo dražilno ali jedko. Nadalnjih 6 spojin (cimetna kislina, glikolna kislina, retinilacetat, butilhidroksianizol, p-(1,1-dimetilpropil)fenol in propilgalat) je programski modul napovedal napačno, in sicer kot spojine, ki na koži niso dražilne ali jedke, saj zanje velja izključitveno pravilo, ki pravi, da spojine C (C, H, O) s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}$, ki imajo tališče nad 55 °C, na koži ne delujejo dražilno ali jedko. Programski modul je napačno razvrstil tudi alfa-tokoferol, ker zanj velja izključitveno pravilo, ki pravi, da spojine C (C,

H, O) s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}$, ki imajo molekulsko maso nad 350 g/mol, na koži ne povzročajo opeklin. Ta spojina sicer res ne povzroča opeklin, vendar deluje kot iritant, česar pa programski modul ne napove. Smiselno bi bilo, da bi programski modul spojine, ki imajo izid 1 (ne povzroča opeklin na koži), pregledal še za dražilnost, saj lahko spojine, ki ne povzročajo opeklin na koži, še vedno dražijo kožo. Napačno razvrščen je bil še metilizotiazolinon, ker zanj velja izključitveno pravilo, ki pravi, da spojine CNS (C, H, O, N, S) s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}N_{(a)}S_{(b)}$, ki imajo \log_{ow} pod 0,5, ne delujejo kot povzročitelji opeklin. Vse spojine, ki so napačno razvrščene, je torej program razvrstil na osnovi izključitvenih pravil, od teh kar 8 na osnovi tališča. Z napačnim razvrščanjem spojin na osnovi njihovega tališča smo se srečali tudi pri validaciji izključitvenih pravil. Avtorji validacije menijo, da so pravila na osnovi tališča nezanesljiva in zastavljena tako, da ne izključijo vseh iritantov in povzročiteljev opeklin, zato celo predlagajo, da bi se to pravilo v celoti odstranilo ali vsaj dopolnilo (56). Poleg tega je Toxtree napačno razvrstil še heksametilendiakrilat in etilakrilat, ki dražita kožo, in sicer kot spojini, ki povzročata opekline na koži. To ni tako slabo, saj spojini napove še »močnejši« učinek in nas s tem opozori pred uporabo spojine na koži. Napačno pa razvrsti tudi epiklorhidrin in nonanojsko kislino, ki povzročata opekline na koži, in sicer kot spojini, ki dražita kožo. Ta napoved je slabša, saj nas s tem »premalom« opozori na toksični učinek spojine na koži. Vendar teh zadnjih štirih napačnih razvrstitev pri izračunih ne upoštevamo, saj smo zanemarili razliko med draženjem in povzročanjem opeklin.

Izračun občutljivosti za napovednost dražilnosti spojin na koži: Toxtreejev programski modul v 82,9 % pravilno opredeli spojine iz izbranega niza, ki povzročajo draženje kože, kot iritante. Pri izračunu občutljivosti programskega modula za napovednost dražilnosti spojin na koži smo v imenovalce vstavili seštevek spojin iz preglednice v prilogi 1, ki so v literaturi označene kot iritanti (imajo oznako R38 ali H315) ali so opisane kot blagi iritanti ($N_{(L+)}$) in jih programski modul ovrednoti z izidi 2, 3, 4 ali 6. Teh je 35. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z izidoma 4 ali 6, kar pomeni, da delujejo kot kožni iritanti ($N_{(I+)}$). Teh je bilo 29. Napačno je program razvrstil 6 iritantov: tiamin, propilgalat, butilhidroksianizol, natrijev lavrilsulfat, retinilacetat in cimeto kislino. Razlogi za napačne razvrstitve so opisani že pri izračunu občutljivosti za napovednost programskega modula.

Izračun občutljivosti za napovednost jedkosti spojin na koži: Toxtreejev programski modul v 57,1 % pravilno opredeli spojine iz izbranega niza, ki povzročajo opekline na koži, kot povzročitelje opeklin na koži. Pri izračunu občutljivosti programskega modula za napovednost jedkosti spojin na koži smo v imenovalcu vstavili le spojine iz preglednice v prilogi 1, ki so v literaturi označene kot povzročitelji opeklin (imajo oznako R34 ali R35 ter H314) in jih program ovrednotil z izidi 1, 2, 5 ali 6 ($N_{(LK+)}$). Teh je 7. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z izidoma 5 ali 6, kar pomeni, da delujejo kot povzročitelji opeklin na koži ($N_{(K+)}$). Teh je bil 4. Napačno je program razvrstil 3 spojine: p-(1,1-dimetilpropil)fenol, metilizotiazolinon in glikolno kislino. Razlogi za napačne razvrstitve spojin so opisani že zgoraj pri izračunu občutljivosti za napovednost programskega modula. Napovednost za povzročitelje opeklin ima slabši rezultat kot napovednost za iritante. Ker je ocena napovednosti programskega modula odvisna od števila testnih spojin (teh je le 7), uporabljenih za izračun, moramo poudariti, da je naš rezultat manj relevanten in tudi manj zanesljiv. Spojin, ki imajo oznako R34 ali R35, je v našem testnem nizu manj, najverjetneje tudi zato, ker smo se omejili na spojine, ki se uporabljajo v zdravilih za uporabo na koži in kozmetiki, ti pripravki pa ne vsebujejo veliko spojin, ki bi povzročale opekline na koži.

V primerjavi z rezultati v literaturi, kjer naj bi bila ocenjena občutljivost za napovednost istega Toxtreejevega programskega modula za draženje kože 15,8 % in za povzročanje opeklin 23,4 % (70), so rezultati na naših izbranih nizih spojin zelo dobri.

4.1.2 Specifičnost za napovednost

V preglednici v prilogi 2 je zbran testni niz spojin, ki nam je pomagal pri oceni specifičnosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži in njegovi končni točki: dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži. V tem nizu smo zbirali spojine, za katere je v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal ali v različnih prosto dostopnih varnostnih listih ugotovljeno, da na koži ne delujejo dražilno ali jedko. Bolj smo se opirali na rezultate v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal. Izbirali smo spojine, ki so sestavni deli izdelkov, ki se uporabljajo na koži. Preglednica v prilogi 2 je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njegove številke CAS, podatkov o dražilnosti in/ali jedkosti spojine na koži, pridobljenih iz virov, omenjenih v poglavju »Materiali in

metode«, in iz spletne podatkovne baze eChemPortal, ter rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.

Specifičnost za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) smo izračunali s pomočjo formul, predstavljenih v preglednici IX.

Preglednica IX: Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule

Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula	Izračun specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin na koži	Izračun specifičnosti za napovednost jedkosti spojin na koži
$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(IK-)}}{N_{(LIK-)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = \frac{(44/44)}{\times 100}$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$	$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(L-)}}{N_{(LL-)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = \frac{(28/28)}{\times 100}$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$	$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(K-)}}{N_{(LK-)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = \frac{(42/42)}{\times 100}$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$

Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula: Programski modul Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži ima 100-odstotno specifičnost, kar pomeni, da programski modul spojine iz izbranega niza, ki ne delujejo kot iritanti in/ali povzročitelji opeklin, vedno opredeli pravilno. V imenovalcu zgornje formule smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 2, ki so v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo draženja in/ali opeklin na koži (razen D-pantenola) ($N_{(LIK-)}$). Tako smo v imenovalcu upoštevali 44 spojin. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi ekspertni sistem označil z rezultati 1, 2 ali 3, kar pomeni, da ne delujejo dražilno ali ne povzročajo opeklin na koži ($N_{(IK-)}$). Tudi teh je bilo 44.

Izračun specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin na koži: V imenovalcu formule smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 2, ki so v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo draženja na koži, in jih je programski modul ovrednotil z izidi 2, 3, 4 ali 6 ($N_{(LL-)}$). Bilo jih je 28. V števec formule smo vstavili število

spojin, ki jih je ekspertni sistem označil z rezultatom 2 ali 3, kar pomeni, da na koži ne delujejo dražilno ($N_{(L)}$). Teh je bilo 28.

Izračun specifičnosti za napovednost jedkosti spojin koži: V imenovalec formule smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 2, ki so v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo opeklin na koži, ter jih programski modul ovrednoti z izidi 1, 2, 5 ali 6 ($N_{(LK)}$). Bilo jih je 42. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je ekspertni sistem označil z rezultatom 1 ali 2, kar pomeni, da ne povzročajo opeklin na koži ($N_{(K)}$). Tudi teh je bilo 42.

Pri vseh treh izračunih smo upoštevali vse spojine, razen D-pantenola. Upoštevali smo tudi salicilno kislino in holesterol, čeprav smo v varnostnih listih zasledili, da dražita kožo. Na eChemPortal sta z validiranimi testnimi metodami namreč razvrščena kot spojini, ki ne povzročata kožnega draženja. Salicilna kislina je razporejena na osnovi testa *in vivo* na zajcu (71), medtem ko je holesterol določen z metodo *in vitro* EPISKIN (72). Za D-pantenol smo ugotovili, da je na eChemPortal sicer razvrščen kot spojina, ki ne povzroča draženja na koži, in sicer s pomočjo testa *in vivo*, vendar je za test uporabljena le 5-odstotna koncentracija spojine, kar ne spada v uporabno domeno modula, zato ta podatek za nas ni koristen. V varnostnih listih je razvrščen kot iritant, zato ga raje nismo upoštevali.

Programski modul ima torej visoko specifičnost in nižjo občutljivost, kar pomeni, da pri napovedi za spojine lahko podaja lažne negativne rezultate (65). To pomeni, da spojine, ki sicer dražijo kožo ali na njej povzročajo opekline, napove kot biološko neaktivne.

4.1.3 Točnost za napovednost

Izračun točnosti za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) smo opravili na prvem in drugem nizu spojin, ki smo jih upoštevali tudi pri izračunu specifičnosti in občutljivosti (v preglednicah priloge 1 in priloge 2). Pri tem uporabljene formule in izračuni so predstavljeni v preglednici X.

Preglednica X: Izračun točnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na koži in jedkost spojin na koži) ter pri tem uporabljene formule

Izračun točnosti za napovednost programskega modula	Izračun točnosti programskega modula za napovednost dražilnosti spojin na koži	Izračun točnosti programskega modula za napovednost jedkosti spojin na koži
TOČNOST = $((N_{IK+} + N_{IK-})/N_{vsi}) \times 100$	TOČNOST = $((N_{I+} + N_{I-})/N_{vsi}) \times 100$	TOČNOST = $((N_{K+} + N_{K-})/N_{vsi}) \times 100$
TOČNOST = $((38 + 44)/(48 + 44)) \times 100$	TOČNOST = $((29 + 28)/(35 + 28)) \times 100$	TOČNOST = $((4 + 42)/(7 + 42)) \times 100$
TOČNOST = 89,1 %	TOČNOST = 90,5 %	TOČNOST = 93,9 %

Programski modul pravilno opredeli 89,1 % testiranih spojin, ki smo jih vključili v izračune specifičnosti in občutljivosti. Ta rezultat predstavlja napovednost programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži. Pri tem znaša točnost za napoved dražilnosti spojin 90,5 %, medtem ko znaša točnost za napoved jedkosti spojin na koži 93,9 %.

4.1.4 Povzetek in primerjava rezultatov testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži

Rezultati testiranja programskega modula so povzeti v preglednici XI.

Preglednica XI: Rezultati testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži s pomočjo občutljivosti, specifičnosti in točnosti splošno ter za obe končni točki

Splošna napovednost programskega modula	Napovednost dražilnosti spojin na koži	Napovednost jedkosti spojin na koži
OBČUTLJIVOST = 79,2 %	OBČUTLJIVOST = 82,9 %	OBČUTLJIVOST = 57,1 %
SPECIFIČNOST = 100 %	SPECIFIČNOST = 100 %	SPECIFIČNOST = 100 %
TOČNOST = 89,1 %	TOČNOST = 90,5 %	TOČNOST = 93,9 %

Vrednosti rezultatov so zelo dobre (razen občutljivost za napovednost jedkosti spojin), predvsem specifičnost. Pri tem poudarjamo, da so vrednosti rezultatov odvisne od izbora samih spojin tudi števila testiranih spojin (49, 74).

Rezultate, ki smo jih pridobili z izbranimi testnimi nizi, smo primerjali z rezultati validacijske študije za validacijo pravil BfR (ki bi naj bila podobna, kot so uporabljena v Toxtreejevem programskem modulu), kjer sta, tako kot v Toxtreeju, uporabljene obe pravili hkrati, a le za iritante. Vendar validacijska študija na ni ravno najboljša, ker je v končno oceno vključenih le 9 testnih spojin. Rezultati te študije so sledeči: občutljivost = 40 %, specifičnost = 83 % in točnost = 58 % (54). V primerjavi s to validacijsko študijo so rezultati, pridobljeni na naših izbranih testnih nizih, dobri (primerjamo z napovednostjo programskega modula za dražilnost spojin na koži). Hkrati smo našli tudi napovednost za dražilnost spojin za BfR-DSS, ki ima sledeče rezultate: specifičnost = 100 %, občutljivost = 26,7 % in točnost = 64,5 % (67). Ti rezultati so slabši od teh pridobljenih na naših testnih nizih spojin (primerjamo z napovednostjo programskega modula za dražilnost spojin na koži).

Rezultate za oceno napovednosti programskega modula za končni točki smo primerjali tudi z rezultati validiranih alternativnih *in vitro* testnih metod, ki so že vključene v testne smernice OECD. Podatke zanje smo pridobili na spletni strani JRC (Joint Research Center). Za določanje dražilnosti spojin na koži s testnimi metodami, ki temeljijo na rekonstruirani človeški pokožnici, velja: splošno določena točnost v validacijah za metode *in vitro* znaša 75–85 %, pri čemer veljajo zahteve, da znaša občutljivost najmanj 80 %, specifičnost najmanj 70 % in točnost najmanj 75 % (75, 76, 77). **Glede na to so rezultati napovednosti programskega modula Toxtree za dražilnost spojin na koži zelo dobri oz. boljši od validiranih alternativnih *in vitro* metod.** Za določanje jedkosti spojin na koži smo zasledili sledeče: minimalne zahteve za metode, ki temeljijo na rekonstruirani človeški pokožnici, so: občutljivost ≥ 95 %, specifičnost ≥ 70 % in točnost $\geq 82,5$ %, medtem ko je pri testiranju z metodo CORROSITEX[®] zahtevano občutljivost ≥ 86 %, specifičnost ≥ 68 % in točnost ≥ 81 %. Za test TER veljajo minimalne zahteve: občutljivost $\geq 88,1$ %, specifičnost $\geq 72,4$ % in točnost $\geq 79,4$ % (37). **V primerjavi s tem je rezultat napovednosti programskega modula Toxtree za jedkost spojin na koži sicer dokaj dober. Le občutljivost, ki znaša 57,1 %, je slabša kot pri validiranih alternativnih *in vitro* metodah.**

Našli smo tudi primerjavo napovednosti treh računalniških programov, ki napovedujejo le dražilnost spojin na koži, in sicer DEREK (verzija 20.3), HazardExpert (verzija 3.1) in TOPKAT (verzija 6.2). Ugotovili so, da je le TOPKAT sposoben dobro napovedati

dražilnost spojin na koži, medtem ko sta DEREK in HazardExpert pravilno napovedala le nekaj kožnih iritantov (9, 51, 78). Našli smo še sledeče podatke za oceno napovednosti računalniškega programa DEREK: specifičnost = 45 % in občutljivost = 33 % (25). Za TOPKAT (verzija 6.2) smo našli še sledeče: občutljivost = 65,2 %, specifičnost = 54,1 % in točnost = 58,3 % (67). **V primerjavi s tem so rezultati za napovednost programskega modula Toxtree za dražilnosti spojin**, in sicer: občutljivost: 82,1 %, specifičnost: 100 %, in točnost: 89,2 %, **veliko boljši od vseh omenjenih alternativnih *in silico* metod.**

Vseeno se moramo pri vseh primerjavah med različnimi testnimi metodami zavedati, da ni smiselno primerjati rezultatov za napovednost različnih testnih metod, ki niso bile izvedene na istem izboru testnih spojin. Te primerjave so zato le informativne.

4.2 Ocena napovednosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh

4.2.1 Občutljivost za napovednost

V preglednici v prilogi 3 je zbran testni niz spojin, ki nam je pomagal pri oceni občutljivosti za napovednost Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh in njegovih posameznih končnih točk: dražilnosti spojin na očeh in jedkosti spojin na očeh. V tem nizu smo zbirali spojine, ki so v literaturi, podatkovni bazi eChemPortal ali različnih prosto dostopnih varnostnih listih označene kot očesni iritanti in/ali spojine, ki povzročajo hude poškodbe na očeh ali opekline na koži (te smo šteli kot povzročitelje hudih poškodb oči). Testirali smo spojine, ki so sestavni deli farmacevtskih izdelkov za oko, in spojine v kozmetičnih izdelkih, ki se uporabljajo okoli oči (maskare, senčila, črtala za oči, odstranjevalci ličil, kreme za okoli oči, šampone, balzame ipd.). Preglednica v prilogi 3 je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njenega števila CAS in podatkov o dražilnosti spojine na očeh in jedkosti spojine na koži ali na očeh, pridobljenih iz virov, omenjenih v poglavju »Materiali in metode«, ter spletne podatkovne baze eChemPortal (podatki o dražilnosti in jedkosti spojine so podani glede na klasifikacijsko oznako spojine in rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtreeja za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh).

Na podlagi rezultatov testiranja smo z naslednjimi formulami, ki so predstavljene v preglednici XII, izračunali občutljivost za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki: dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh.

Preglednica XII: Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule

Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula	Izračun občutljivosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh	Izračun občutljivosti za napovednost jedkosti spojin na očeh
$\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{N_{(IK+)} / N_{(LIK+)}}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{(13/43)}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = 30,2 \%$	$\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{N_{(I+)} / N_{(LI+)}}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{(10/17)}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = 58,8 \%$	$\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{N_{(K+)} / N_{(LK+)}}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{(2/8)}{1} \times 100$ $\text{OBČUTLJIVOST} = 25,0 \%$

Izračun občutljivosti za napovednost programskega modula: Toxtreejev programski modul le v 30,2 % pravilno opredeli spojine iz izbranega niza, ki povzročajo draženje oči ali poškodbe na očeh, kot dražilne ali jedke na očeh. Pri izračunu smo upoštevali vse spojine, ki jih je programski modul ovrednotil z izidi 1–10. Nismo upoštevali spojin glikolna kislina in benzilni alkohol, ki jih programski modul ovrednoti z rezultatom 11 oz. NEZNANO. V imenovalcu zgornje formule za občutljivost smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 3, ki so v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal označene kot snovi, ki dražijo oči (R36), povzročijo poškodbe na očeh (R41) ali povzročajo opekline na koži (R34, R35) ($N_{(LIK+)}$). Bilo jih je 43. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z rezultati 8, 9 ali 10, kar pomeni, da delujejo kot očesni iritanti in/ali spojine, ki poškodujejo oči (8 in 9) ali povzročajo opekline na koži (10) ($N_{(IK+)}$). Po zakonodaji EU namreč predvidevamo, da spojina, ki povzroča opekline na koži (R34 in R35), vedno povzroča hujše poškodbe na očeh, kot je navedeno že v opisu programa Toxtree (38, 52, 57). Teh je bilo 13. Programski modul je kar za 30 spojin podal napačno napoved. Od teh je 9 spojin (minoksidil, biotin, metilizotiazolinon, L-cistein, nikotinska kislina, sončno rumeno FCF ali E110, natrijev tetrapirofosfat, kinolinsko rumeno in dinatrijev EDTA dihidrat) razvrstil napačno, ker zanje velja izločitveno pravilo, ki testirane spojine s tališčem, višjim od 200 °C, razvrsti kot

spojine, ki ne povzročajo opeklin na koži (R34 in R35). Nadalnjih 6 (metilparaben, salicilna kislina, cimetna kislina, citronska kislina, dilaktid in vanilin) razvrsti napačno, ker zanje velja izločitveno pravilo, ki pravi, da spojine C (C, H, O) s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}$, ki imajo tališče nad $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne povzročajo opeklin na koži (R34 in R35). Ti dve pravili sta kritizirani tudi v validaciji izključitvenih pravil (57), kjer avtorji priporočajo njihovo ponovno definicijo. Tri spojine (klorbutanol, klorfenezin, klorksilenol) razvrsti napačno, ker zanje velja izključitveno pravilo, ki pravi, da spojine s strukturnim elementom CHal s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}Hal_{(b)}$ s tališčem, višjim od $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne povzročajo opeklin na koži (R34 in R35). Torej kar 18 spojin razvrsti napačno na osnovi izključitvenih pravil o tališču. Naslednjih 5 (manitol, dipalmitoil hidrokisprolin, cetilpiridinijev klorid monohidrat, dimetildioktadecilamonijev klorid ali Quaternium 5 in steariltrimetilamonijev klorid) razvrsti napačno, ker zanje velja izključitveno pravilo, ki se nanaša na $\log P_{ow}$, za katere avtorji validacije izključitvenih pravil (57) ravno tako priporočajo, da se jih ponovno definira. Tri spojine (retinilacetat, homosalat in benzoil peroksid) programski modul razvrsti napačno, ker zanje velja izključitveno pravilo o vodotopnosti spojine, ki pravi, da spojine, katerih vodotopnost je $\leq 5,0 \cdot 10^{-6}\text{ g/l}$, ne morejo povzročati očesnega draženja. Za to pravilo avtorji validacije izključitvenih pravil priporočajo ponovno definicijo ali povečanje varnostne rezerve. Dve spojini (eritromicin in zeleno FCF ali E143) je program razvrstil napačno, da ne dražita oči, ker imata molekulsko maso nad 650 g/mol . To pravilo avtorji izključitvenih pravil označijo za nepopolnega (38), vendar le za organske soli, ki pri stiku z vodnim ali organskim medijem sproščajo močne anorganske kisline ali baze. Ostaneta še spojini kapsaicin in triklosan, ki sta razvrščeni napačno zaradi izključitvenih pravil o molekulski masi. Kapsaicin, ki spada v kemijski razred CN (C, H, O, N) s formulo $C_{(x)}H_{(y)}O_{(z)}N_{(a)}$ in ima molekulsko maso višjo od 290 g/mol , po pravilih programskega modula spada med spojine, ki ne povzročajo opeklin na koži (R34 ali R35). S tem rezultatom programski modul ovrednoti še triklosan, ki spada v kemijski razred CHal in ima molekulsko maso višjo od 290 g/mol . Vse spojine so torej napačno razvrščene zaradi izključitvenih pravil. Pri tem kar 17 iritantov razvrsti, kot da ne povzročajo opeklin. To sicer ni popolna napaka, saj spojine, ki ne povzročajo opeklin na koži oz. hudih poškodb očesa, še vedno lahko dražijo oko, vendar jih programski modul ne napove kot iritante in s tem »zamolči« njihov toksični učinek na oko. Zato menimo, da je tako razvrščanje spojin s strani programskega modula nesmiselno, saj bi moral programski modul spojine, ki imajo izid 1 (ne povzročajo opeklin na koži), preveriti tudi zmožnost povzročanja draženja očesa

(57). Če bi izključili te spojine iz ocene napovedi programskega modula, bi dobili bistveno boljšo občutljivost programskega modula.

Izračun občutljivosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh: Toxtreejev programski modul je le v 58,8 % pravilno opredelil spojine iz izbranega niza, ki povzročajo očesno draženje, kot iritant. V imenovalcu smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 3, ki so v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal označene kot iritanti (R36) in jih programski modul ovrednoti z izidi 2, 4, 6, 7, 8 ali 9 (za 8 smo se odločili, ker program izraz razjede uporablja tudi za spojine, ki delujejo dražilno) ($N_{(LI+)}$). Bilo jih je 17. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z rezultatom 8 ali 9, kar pomeni, da delujejo dražilno na očeh ($N_{(I+)}$). Teh je bilo 10. Programski modul 7 spojin, ki delujejo dražilno na oko, razvrsti napačno. To so retinilacetat, zeleno FCF, homosalat, benzoilperoksid, eritromicin, dipalmitoil hidroksiprolin in cetilpiridinijev klorid monohidrat. Razloge za njihovo napačno razvrstitev smo navedli že pri izračunu občutljivosti programskega modula. Ker tu ne upoštevamo izida 1, je to najrealnejša slika napovedi programskega modula.

Izračun občutljivosti za napovednost jedkosti spojin na očeh: Toxtreejev programski modul je le v 25,0 % pravilno opredelil spojine iz izbranega niza, ki povzročajo hude poškodbe oči, kot povzročitelje hudih poškodb na očeh. V imenovalcu smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 3, ki so v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal označene kot spojine, ki povzročajo hude poškodbe oči (R41) ali povzročajo opekline na koži (R34 in R35), ter jih je programski modul ovrednotil z izidi 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 ali 10 ($N_{(LK+)}$). Bilo jih je 8. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi programski modul označil z rezultatom 8 ali 10, kar pomeni, da delujejo kot povzročitelji hudih poškodb oči/opeklin na koži ($N_{(K+)}$). Ti sta bili 2. Programski modul popolnoma napačno napove delovanje metilizotiazolinona, citronske kisline, steariltrimetilamonijevega klorida, Quaternium 5, salicilne kisline in kapsaicina. Vzrok smo razložili že pri občutljivosti za napovednost programskega modula. Naš rezultat je močno odvisen od števila testiranih spojin, ki je v našem primeru majhno (le 8), tako da je vprašljivo, koliko je naš rezultat veljaven. Pri izboru spojin smo se namreč omejili na spojine, ki se uporabljajo v izdelkih (kozmetika in zdravila, razen kapsaicina, ki se uporablja v »solzivcu«, ki je namenjen iritaciji oči). Spojin, ki povzročajo hude poškodbe

oči, se namreč proizvajalci v izdelkih izogibajo. Poleg tega nam je programski modul za ta tip testiranih spojin kar nekajkrat podal napoved NEZNANO.

Našli smo podatke za primerjavo rezultatov z drugimi avtorji, ki ocenjujejo pravila programskega modula Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh. Napovednost je predstavljena le z občutljivostjo, ki znaša 23,4 % za spojine, ki povzročajo opekline na koži, 26,8 % za spojine, ki povzročajo hude poškodbe oči, in 14,0 % za očesne iritante (52). Naš rezultat za napovednost občutljivosti za dražilnosti na očeh je 58,8 % in je tako veliko boljši. Vendar hkrati obe raziskavi (naša in literaturna) kažeta na to, da je Toxtreejev programski modul slabše orodje za napoved iritantov. Drugih dveh občutljivosti za napovednost jedkosti spojin na očeh in jedkosti spojin na koži posamično nismo računali zaradi majhnega nabora testnih spojin.

4.2.2 Specifičnost za napovednost

V preglednici v prilogi 4 je zbran testni niz spojin, ki nam je pomagal pri oceni specifičnosti Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh ter njegovih končnih točk: dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh. V tem nizu smo zbirali spojine, ki so v literaturi, podatkovni bazi eChemPortal ali različnih prosto dostopnih varnostnih listih označene, kot da ne povzročajo očesnega draženja ali hudih poškodb na očeh in opeklin na koži. Testirali smo spojine, ki so sestavni deli farmacevtskih izdelkov za oko, spojine v kozmetičnih izdelkih, ki se uporabljajo okoli oči (maskare, senčila, črtala za oči, odstranjevalci ličil, kreme za okoli oči, šampone, balzame ipd.). Preglednica v prilogi 4 je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njenega števila CAS, podatkov o dražilnosti in jedkosti spojin na očeh ter jedkosti spojin na koži, pridobljenih iz virov, omenjenih v poglavju »Materiali in metode«, in iz spletne podatkovne baze eChemPortal, ter rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh.

Na podlagi rezultatov testiranja smo s formulami, predstavljenimi v preglednici XIII, izračunali specifičnost za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi končni točki: dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh.

Preglednica XIII: Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule

Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula	Izračun specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh	Izračun specifičnosti za napovednost jedkosti spojin na očeh
$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(IK-y)}}{N_{(LIK-y)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = \frac{(41/41)}{\times 100}$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$	$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(I-y)}}{N_{(LIK-y)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = 18/18$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$	$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{N_{(K-y)}}{N_{(LIK-y)}} \times 100$ $\text{SPECIFIČNOST} = 33/33$ $\text{SPECIFIČNOST} = 100 \%$

Izračun specifičnosti za napovednost programskega modula: Specifičnost za napovednost Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh iz izbranega testnega niza znaša 100 %, kar pomeni, da programski modul spojine, ki ne delujejo kot očesni iritanti in/ali povzročitelji hudih poškodb oči ali opeklin na koži, vedno opredeli pravilno. V imenovalcu zgornje formule za specifičnost smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 4, ki so v literaturi in v podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo očesnega draženja in/ali hudih poškodb oči ali opeklin na koži in jih programski modul ovrednoti z izidi 1–10 ($N_{(LIK-y)}$). Bilo jih je 41. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi ekspertni sistem označil z rezultati 1–7, kar pomeni, da ne delujejo kot očesni iritanti in/ali ne povzročajo hudih poškodb na očeh ali opeklin na koži ($N_{(KI-y)}$). Tudi teh je bilo 41. Pri izračunu specifičnosti za napovednost programskega modula smo upoštevali vse spojine, čeprav smo za 5 spojin (žveplo, tridekan, dikumil peroksid, dodekamilcikloheksasiloksan in izpropilmiristat) v varnostnih listih ali bazi podatkov ChemicalBook zasledili, da naj bi delovale kot očesni iritant. V spletni bazi podatkov eChemPortal so bile namreč razvrščene kot spojine, ki ne povzročajo draženja očesa na osnovi validiranih testnih metod, zato smo se odločili, da jih upoštevamo pri izračunu specifičnosti. Program jih sicer razvrsti, kot da ne delujejo kot očesni iritanti, torej enako, kot so razvrščeni v bazi podatkov eChemPortal.

Izračun specifičnosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh: V imenovalcu zgornje formule (preglednica XIII) smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 4, ki so v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo očesne iritacije,

in jih programski modul ovrednoti z izidi 2, 4, 6, 7, 8 ali 9 ($N_{(LI)}$). Bilo jih je 18. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi ekspertni sistem označil z rezultati 2, 4, 6 in 7, kar pomeni, da ne delujejo kot očesni iritanti ($N_{(L)}$). Teh je bilo 18.

Izračun specifičnosti za napovednost jedkosti spojin na očeh: V imenovalcu zgornje formule smo vstavili število spojin iz preglednice v prilogi 4, ki so v literaturi in podatkovni bazi eChemPortal označene, kot da ne povzročajo hudih poškodb oči ali opeklin na koži, in jih je programski modul ovrednotil z izidi 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 ali 10 ($N_{(LK)}$). Bilo jih je 33. V števec formule smo vstavili število spojin, ki jih je poleg literature tudi ekspertni sistem označil z rezultati 1, 2, 3, 5, 6 ali 7, kar pomeni, da ne delujejo kot povzročitelji hudih poškodb oči ali opeklin na koži ($N_{(K)}$). Teh je bilo 33.

4.2.3 Točnost za napovednost

Izračun točnosti za napovednost programskega modula (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) smo opravili na tretjem (priloga 3) in četrtem (priloga 4) nizu spojin, ki smo jih upoštevali tudi pri izračunu specifičnosti in občutljivosti. Pri tem uporabljene formule in izračuni so predstavljeni v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Izračun točnosti za napovednost programskega modula in za njegovi končni točki (dražilnost spojin na očeh in jedkost spojin na očeh) ter pri tem uporabljene formule

Izračun točnosti za napovednost programskega modula	Izračun točnosti za napovednost dražilnosti spojin na očeh	Izračun točnosti za napovednost jedkosti spojin na očeh
$\text{TOČNOST} = \frac{(N_{IK+} + N_{IK-})}{N_{vsi}} \times 100$	$\text{TOČNOST} = \frac{(N_{I+} + N_{L-})}{N_{vsi}} \times 100$	$\text{TOČNOST} = \frac{(N_{I+} + N_{K-})}{N_{vsi}} \times 100$
$\text{TOČNOST} = \frac{((13 + 41)/(43 + 41)) \times 100}{}$	$\text{TOČNOST} = \frac{((10 + 18)/(17 + 18)) \times 100}{}$	$\text{TOČNOST} = \frac{((2 + 33)/(8 + 33)) \times 100}{}$
$\text{TOČNOST} = 64,3 \%$	$\text{TOČNOST} = 80,0 \%$	$\text{TOČNOST} = 85,4 \%$

Programski modul pravilno opredeli 64,3 % testiranih spojin, ki smo jih vključili v izračune specifičnosti in občutljivosti. Ta rezultat predstavlja napovednost programskega modula za dražilnost in jedkost spojin na očeh. Pri tem je napovednost programskega

modula za dražilnost spojin na očeh 80-odstotna in napovednost programskega modula za jedkost spojin na očeh 85,4-odstotna.

4.2.4 Povzetek in primerjava rezultatov testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh

Rezultati testiranja programskega modula so povzeti v preglednici XV.

Preglednica XV: Rezultati testiranja Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh s pomočjo občutljivosti, specifičnosti in točnosti splošno ter za obe končni točki

Napovednost programskega modula	Napovednost programskega modula za dražilnost spojin na očeh	Napovednost programskega modula za jedkost spojin na očeh
OBČULJIVOST = 30,2 %	OBČUTLJIVOST = 58,8 %	OBČUTLJIVOST = 25 %
SPECIFIČNOST = 100 %	SPECIFIČNOST = 100 %	SPECIFIČNOST = 100 %
TOČNOST = 64,3 %	TOČNOST = 80,0 %	TOČNOST = 85,4 %

Najprej se moramo zavedati, da so rezultati močno odvisni tako od izbora spojin kot tudi od števila izbranih spojin (66). Ugotovili smo, da ima programski modul slabšo napovednost za spojine, ki so biološko aktivne, torej povzročajo očesno draženje/hude poškodbe oči ali opekline na koži (veliko slabše vrednosti za občutljivost). Napovednost za biološko neaktivne spojine pa je zelo dobra (zelo dobra specifičnost). Ravno zaradi tega razmerja med specifičnostjo in občutljivostjo vemo, da programski modul pri napovedi podaja veliko lažno negativnih rezultatov (65).

Našli smo podatke za nekatere literaturne klasifikacijske modele QSAR, ki napovedujejo očesno draženje organskih tekočin. Njihova občutljivost znaša 27 %, 73 % in 93 %, specifičnost 93 %, 62 % in 49 %, točnost pa 76 %, 65 % in 61 % v odvisnosti od uporabljenega modela (79). V luči teh podatkov je **Toxtreejev programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh je torej primerljivo orodje za napoved dražilnosti spojin na očeh, kot omenjeni literaturni klasifikacijski QSAR modeli.**

Rezultate Toxtreejevega programskega modula za napovednost jedkosti spojin na očeh smo primerjali tudi z rezultati validacijskih študij alternativnih *in vitro* metod, ki lahko samostojno določajo jedkost spojin na očeh in so že vključene v testne smernice OECD. To sta testna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda in poskus na izoliranem očesu kokoši. Ugotovili smo, da znaša točnost za napovednost testne metode za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda 87–92 %. Poskus na izoliranem očesu kokoši pa ima glede na ocenjevalni sistem in kriterije EU zahtevano občutljivost ≥ 59 %, specifičnost ≥ 94 % in točnost ≥ 87 % (80). **Torej so rezultati pridobljeni z programskim modulom Toxtree za specifičnost (100 %) in točnost (85,4 %) pri napovedi jedkosti spojin, boljši, kot pri alternativnih *in vitro* metodah. Vendar pa je občutljivost (25,0 %) programskega modula Toxtree za napoved jedkosti spojin, precej slabša, kot pri alternativnih *in vitro* validiranih metodah.** Toxtreejev modul za napoved jedkosti spojin na očeh je torej slabši od alternativnih *in vitro* metod, a se moramo zavedati, da je naš rezultat manj zanesljiv tudi zaradi majhnega števila testnih spojin (razlog naveden pri izračunu občutljivosti).

Zavedati se moramo, da so vse primerjave z drugimi testnimi metodami le informativne, saj niso izvedene na istem testnem nizu spojin.

4.3 Rezultati in zaključki, ki se nanašajo na oba vrednotena Toxtreejeva programska modula

Omenili smo, da so naše primerjave različnih testnih metod informativne, ker bi bila najbolj smiselna primerjava različnih metod ta, da bi isti izbor testnih spojin testirali z več testnimi metodami in nato primerjali rezultate. Pri metodah *in silico* bi to zahtevalo veliko truda, saj bi morali zbrati zadostno količino uporabnih testnih spojin, ki bi bile v uporabni domeni vseh testnih metod (68).

Rezultati so odvisni tudi od izbora samih spojin. Tega smo si v našem primeru omejili že z željo, da testiramo le spojine, ki so prisotne v izdelkih, ki se uporabljajo na koži pri oceni programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži, in le spojine, ki se uporabljajo v očeh ali okoli oči pri oceni programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh. Za namen raziskave bi bilo morda bolje, da bi izbrali več spojin iz

različnih kemijskih razredov, seveda znotraj uporabne domene posameznega modula. V veliki meri je izbor spojin omejen tudi z uporabno domeno samega programa, saj nam je ta za vneseno spojino večkrat (nismo natančno beležili, kolikokrat) podal rezultat NEZNANO, kar pomeni, da spojine ni zmožen oceniti, ker je zunaj njegove uporabne domene. To priča o manjši uporabnosti programskega modula.

Moramo se zavedati tudi dejstva, da se pri uporabi spojin iz učnega niza (so uporabljene pri izdelavi pravil za tvorbo modulov) v testnem nizu izboljšajo rezultati ocene napovednosti, zato naj jih ne bi uporabljali pri izračunu napovednosti programskih modulov. Vendar so podatki o spojinah iz učnega niza varovani (6, 38), tako da nimamo možnosti preveriti, ali smo jih uporabili v našem testnem nizu. Popolni podatki o spojinah v učnem nizu so bili posredovani takratnemu Evropskem kemijskem uradu (prenehal je delovati leta 2008), katerega funkcije sta prevzela ECHA in JRC (81), in nacionalnim avtoritetam. S tem je omogočena njihova popolna validacija s strani pooblaščenih regulatorjev (6).

Pri oceni napovednosti obeh modulov se moramo tudi zavedati, da je nerealno pričakovati večjo točnost napovedi ekspertnega sistema, kot je točnost eksperimentalnih podatkov, na katerih je program zgrajen (3, 9, 79). Draizov test, ki naj bi bil zlati standard pri določanju obeh toksičnih lastnosti in je v največji meri uporabljen tudi pri oceni učnega seta za tvorbo obeh modulov, je namreč med drugim kritiziran zaradi svoje občutljivosti in vprašljive prenosljivosti na ljudi ter tudi zaradi možne subjektivnosti pri oceni reakcij, kar velja tako za določanje kožnega kot tudi očesnega draženja (9, 38, 66, 82). Hkrati rezultati bioloških analiz niso edini eksperimentalni podatki, ki jih potrebujemo za napoved Toxtreejevih programskih modulov. Vanje vnašamo namreč tudi merjene vrednosti fizikalno-kemičnih lastnosti, ki so ravno tako lahko variabilne. Regulatorji so namreč opazili občutne razlike v meritvah, kjer imamo več virov merjenih vrednosti za isto kemikalijo. Vzrok so lahko tudi eksperimentalne napake, bolj verjetno pa se te razlike pojavijo zaradi razlik v času merjenja (mnoge kemikalije niso popolnoma stabilne v procesu merjenja) in zaradi odvisnosti merjenih lastnosti od temperature (sobna temperatura lahko znaša 19–26 °C) (38).

Napovednost obeh programskih modulov bi torej lahko izboljšali s »kvalitetnejšimi«
podatki o spojinah v bazah podatkov, na katerih temeljijo pravila, in s konstantnim

izboljševanjem pravil, na katerih temeljita modula. Ugotovili smo, da so v obeh modulih najbolj kritična izključitvena pravila, ki temeljijo na tališču (ta izključijo tudi iritante). Če bi ta izključitvena pravila »popravili« tako, da bi izključila manj spojin, ali jih odstranili (predlagajo tudi avtorji eksternih validacij izključitvenih pravil (56, 57)), bi sicer izboljšali občutljivost programskih modulov, vendar bi se s tem poslabšala specifičnost, kar je za namen določanja toksičnih lastnosti spojin v regulativi zaželeno, saj se s tem zmanjša število lažno negativnih napovedi. Takšne napovedi so najmanj zaželene, saj želimo ljudi čim bolj obvarovati pred škodljivimi učinki spojin (83). Ravno tako se nam zdi, da bi oba modula morala pravila, ki podajo izid »ne povzroča opeklin R34 ali R35«, dopolniti, tako da bi programski modul spojine, ki imajo ta izid, preveril še za dražilnost.

Napovednost za določeno toksično lastnost lahko izboljšamo tudi s kombinacijo več različnih modelov za napoved te lastnosti (9, 68, 84). Ravno tako lahko izboljšamo napovednost za določeno toksično lastnost z uporabo pristopov z ugotavljanjem zanesljivosti dokazov in v kombinaciji metod (Q)SAR z drugimi alternativnimi metodami (67) v ITS, IATA ali sekvenčnih testih, kar se že uporablja pri napovedi toksičnih lastnosti spojin (tudi dražilnosti in jedkosti spojin na koži in očeh, kot smo predstavili v uvodu).

S pomočjo obeh programskih modulov ocenimo le spojine katerih čistost $\geq 95\%$, ki ne vsebujejo primesi, ali če pa jih vsebujejo, morajo biti le-te ocenjene glede na njihovo dražilnost ali sposobnost korozije (38, 52), kar pomeni tudi, da testirane spojine naj ne bi tvorile dražečih in/ali jedkih razpadnih produktov, npr. s hidrolizo (52). Spojine, ki tvorijo dražeče ali jedke razpadne produkte ali metabolite, bi torej morali odstraniti iz ocene napovednosti programskih modulov, ker programska modula ocenita le vneseno spojino, nista pa zmožna napovedati metabolitov in razpadnih produktov. Le-ti namreč pri testih *in vivo* in *in vitro* pokažejo »pozitivno« biološko reakcijo za testirano spojino.

Pri tem se vprašamo, kakšen je vpliv metabolnih produktov na izid testiranja, ker vemo, da lahko le-ti povzročijo toksično reakcijo (85). Ugotovili smo, da uporabljena programska modula namreč nista opremljena z možnostjo napovedovanja biotransformacije in ocene metabolnih produktov, ki se tvorijo tako v koži kot v očeh. V obeh organih (koža in oko) namreč poteka biotransformacija eksogenih spojin (86). Pri tem bi morali upoštevati še zmožnost penetracije spojin skozi kožo ali oko. Drugo vprašanje, ki se poraja, je, v kolikšni meri se metabolni produkti sploh tvorijo glede na čas testiranja (pri kožnih testih je spojina na koži nanesena le 4 ure, potem se obriše). Če bi želeli torej oceniti dražilnost

in jedkost spojine na očeh in na koži tudi glede na njene metabolne produkte, bi morali najprej uporabiti programsko opremo, ki jih določajo npr. MetabolExpert, Meteor ali MetaCASE (84). Morda bi bilo smiselno napačno razvrščenim spojinam v obeh programskih modulih določiti metabolne produkte in tudi te nato testirati s Toxtreejevima programskima moduloma.

Glede na to, da so spojine na očeh in koži izpostavljene tudi neencimskemu razpadu na svetlobi (fotodegradacija) (85) in hidrolizi, povzročeni s prisotno vlago (tako na koži, še bolj pa v očeh), je tudi s tega vidika možna tvorba iritativnih razpadnih produktov. Tako bi morali oceniti, kako spojine reagirajo ob izpostavljenosti svetlobi, zraku in vlagi ob določenem času, in nato produkte teh reakcij oceniti s pomočjo Toxtreejevih programskih modulov za napoved kožne in očesne dražilnosti. Obstajajo tudi računalniški programi, ki ocenijo fotodegradacijo in hidrolizo spojin, npr. SRC (87), s katerimi bi si lahko pomagali pri oceni razpadnih produktov. Tako bi najprej ocenili, kateri razpadni produkti se tvorijo pri izpostavljenosti spojine svetlobi in vlagi ter nato še te testirali s Toxtreejevima programskima moduloma.

5 SKLEP

Pri vrednotenju napovednosti programskega modula, ki napove dražilnost in jedkost spojin na koži, smo ugotovili, da modul daje zelo zadovoljive oz. boljše rezultate pri napovedi dražilnosti spojin na koži kot alternativne *in vitro* metode, ki določajo dražilnost spojin na koži in slabše rezultate pri napovedi jedkosti spojin na koži (slabša občutljivost) kot alternativne *in vitro* metode, ki določajo jedkost spojin na koži. Tako smo za ta modul potrdili obe hipotezi, in sicer da programski modul ustrezno oz. bolje kot alternativne *in vitro* metode napove dražilnost spojin na koži. Medtem, ko je napoved jedkosti spojin na koži malo slabša kot pri alternativnih *in vitro* metodah (ovržena druga hipoteza za napoved jedkosti spojin na koži). Pri tem smo dobili sledeče rezultate za napovednost Toxtreejevega programskega modula za dražilnost in jedkost spojin na koži kot celote (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki:

- občutljivost izraža delež biološko aktivnih – pozitivnih spojin, ki jih modul pravilno napove: za celoten programski modul znaša ta 79,2 %, pri napovedi iritantov znaša občutljivost programskega modula 82,9 %, pri napovedi povzročiteljev opeklin pa znaša občutljivost programskega modula 57,1 %;
- specifičnost je tako za celoten programski modul in njegovi končni točki 100-odstotna, kar pomeni, da programski modul vedno pravilno napove spojine, ki nimajo biološkega učinka;
- točnost, ki izraža delež spojin, ki jih programski modul napove pravilno, je za celoten programski modul znašala 89,1 %, s tem da znaša točnost za napovednost dražilnosti spojin 90,5 % in točnost za napovednost jedkosti spojin 93,9 %.

Pri vrednotenju napovednosti programskega modula, ki napove dražilnost in jedkost spojin na očeh, smo ugotovili, da ima programski modul zelo nizko občutljivost (splošno in za obe končni točki) in veliko boljšo specifičnost kot validirane alternativne *in vitro* metode določanja jedkosti spojin na očeh. Po tem sklepamo, da je slabše orodje za napoved jedkosti spojin na očesu kot alternativne *in vitro* metode. Medtem pa je Toxtreejev programski modul malo bolje (še vedno občutljivost slabša) napovedal dražilnost spojin na očeh. Vendar zaenkrat še ni alternativnih *in vitro* metod, ki bi določale dražilnost spojin na očeh, s katerimi bi lahko primerjali rezultate. Za ta programski modul smo torej ovrgli obe postavljeni hipotezi. Tako smo dobili sledeče rezultate pri oceni napovednosti

Toxtreejevega programskega modula za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh kot celote (dražilnost in jedkost spojin obravnavamo kot eno končno točko) in za njegovi posamezni končni točki:

- občutljivost za celoten programski modul znaša 30,2 %; pri tem modul napove iritante z 58,8-odstotno občutljivostjo in povzročitelje hudih poškodb oči/povzročitelje opeklin na koži s 25,0-odstotno občutljivostjo;
- specifičnost znaša tako za celoten programski modul in njegovi končni točki 100 %, kar pomeni, da programski modul vedno pravilno napove spojine, ki nimajo biološkega učinka;
- točnost za celoten programski modul znaša 64,3 %, s tem da znaša točnost za napovednost dražilnosti spojin za oči 80,0 %, točnost za napovednost jedkosti spojin za oči pa 85,4 %.

Glede na razmerje med specifičnostjo in občutljivostjo obeh programskih modulov lahko sklepamo, da če programska modula Toxtree napovesta, da spojina deluje dražilno ali jedko na koži ali na očeh, v to lahko 100-odstotno zaupamo, kar pomeni, da ima omenjena spojina gotovo pozitiven toksični učinek na kožo ali oko, medtem ko napovedi odsotnosti biološkega učinka ni za zaupati, saj oba modula (predvsem modul, ki napoveduje dražilnost in jedkost spojin na očeh) napovesta veliko lažno negativnih rezultatov, kar je pri oceni varnosti spojin najslabše, saj lahko spregledamo toksični učinek spojine in s tem ogrozimo zdravje ljudi.

6 LITERATURA

1. Binetti R, Marina Costamagna F, Marcello I: Exponential growth of new chemicals and evolution of information relevant to risk control. *Ann Ist Super Sanità* 2008; Vol. 44, No. 1: 13-15
2. J.van Leeuwen C, Vermeir TG: *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*; Second Edition, Springer, Dordrecht, 2007: 513-515
3. <http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=52&ArticleID=67> in/ ali <http://habitat.igc.org/agenda21> (november 2014)
4. Lahl U, Gundert-Remy U: The Use of (Q)SAR Methods in the Context of REACH. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2008; 18: 149-158
5. Anon. White Paper on a strategy for a future chemicals policy, Brussels, 2001
6. Gerner I, Schlegel K, Walker JD, and Hulzebos E: Use of Physicochemical Property Limits to Develop Rules for Identifying Chemical Substances with no Skin Irritation or Corrosion Potential. *QSAR & Combinatorial Science* 2004; 23: 726-733
7. Nielsen E, Ostergaard G, Larsen JC: *Toxicological Risk Assessment of Chemicals: A Practical Guide*, Informa Healthcare USA Inc, New York, 2008: 33-35
8. <http://echa.europa.eu/sl/regulations/reach/understanding-reach> (november 2014)
9. Worth A, Barroso J, Bremer S, Burton J, Casati S, Coecke S, Corvi R, Desprez B, Dumont C, Gouliarmou V, Goumenou M, Gräpel R, Griesinger C, Halder M, Janusch Roi A, Kienzler A, Madia F, Munn S, Nepelska M, Paini A, Price A, Prieto P, Rolaki A, Schäffer M, Triebe J, Whelan M, Wittwehr C, Zuang V: Alternative methods for regulatory toxicology – a state-of-the-art review. JRC Publications Office of the European Union 2014 dosegljiv na strani: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/alternative-methods-regulatory-toxicology-state-art-review> (november 2014)
10. Kinsner-Ovaskainen A, Akkan Z, Casati S, Coecke S, Corvi R, Dal Negro G, De Bruijn J, De Silva O, Gribaldo L, Griesinger C, Jaworska J, Kreysa J, Maxwell G, McNamee P, Price A, Prieto P, Schubert R, Tosti L, Worth A, Zuang V: Overcoming Barriers to Validation of Non-animal Partial Replacement Methods/Integrated Testing Strategies: The Report of an EPAA–ECVAM Workshop. *ATLA* 2009; 37, 1-8, dosegljiv na spletni strani: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/workshop-reports> (november 2014)

11. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/faqs_animal_testing_2013#q2-what-is-the
(november 2014)
12. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/glossary/glossary/3-rs-principle-replace-reduce-refine> (november 2014)
13. Gosenca M, Gašperlin M, Kristl J: Iritativni kontaktni dermatitis: od mehanizmov do vrednotenja iritantov. Farmacevtski vestnik 2012;63, 145-151
14. Uredba EC 1223/2009, Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. Uradni list Evropske unije, 2009, Zvezek 52, L342/59 dosegljiva na: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2009.342.01.0059.01.SLV
15. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/glossary/glossary/alternative-test-methods>
(november 2014)
16. Hartung T, Luechtefeld T, Maertens A, Kleensang A: Food for Thought ... Integrated Testing Strategies for Safety Assessments. ALTEX 2013; 30(1): 3–18
17. Evropska agencija za kemikalije, Praktični vodnik 10: Kako se izogniti nepotrebnemu testiranju na živalih, 2010, dostopno na: <http://echa.europa.eu/sl/practical-guides>
18. Zuang V, Schäffer M, Tuomainen AM, Amcoff P, Bernasconi C, Bremer S, Casati S, Castello P, Coecke S, Corvi R, Griesinger C, Janusch Roi A, Kirmizidis G, Prieto P, Worth A, Munn S, Berggren E, Whelan M: EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods (2010-2013), Prepared in the framework of Directive 76/768/EEC and Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic product
19. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/faqs_animal_testing_2013#q5-which-alternative-methods (november 2014)
20. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/faqs_animal_testing_2013#q16-is-it-true
(november 2014)
21. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam> (november 2014)
22. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/> (november 2014)
23. Kopčavar-Guček N: KONTAKTNI DERMATITIS IN URTIKARIJA V DRUŽINSKI MEDICINI. V. Fajdigovi dnevi GERB, ASTMA, MIGRENA, HIPERLIPIDEMIJA, ALERGIJA. Zbornik predavanj, Kranjska Gora, 28. – 29. 11. 2003, stran 33-40 dosegljivo na: <http://www.drmed.org/wp-content/uploads/2014/06/V.-Fajdigovi-dnevi.pdf> (februar 2014)

24. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-irritation> (november 2014)
25. Gallegos Saliner A, Patlewicz G, Worth AP.: Review of Literature-Based Models for Skin and Eye Irritation and Corrosion. European Commission Directorate – General Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection, © European Communities 2006, dosegljivo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/doc/QSAR_Review_Irritation.pdf
26. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures, amending and repealing ENV/JM/MONO(2014)19 Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union, 2008; L353: 1-1355
27. Jirova D, Basketter D, Liebsch M, Bendova H, Kejlova K, Marriott M, Kandarova H: Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. Contact Dermatitis 2010; 62: 109-116
28. Eriksson L, Jaworska J, Worth AP, Cronin MTD, McDowell RM, Gramatica P: Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. Environ. Health Perspect; Aug 2003; 111(10): 1361–1375
29. Barratt MD: Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols: Principal components and neural network analysis of extended datasets. Toxicology in Vitro 1996;10(1): 85-94
30. Barratt MD: Quantitative structure-activity relationships for skin irritation and corrosivity of neutral and electrophilic organic chemicals. Toxicology in Vitro 1996; 10: 247–256
31. Smith JS, Macina OT, Sussman NB, Luster MI, Karol MH: A robust structure-activity relationship (SAR) model for esters that cause skin irritation in humans. Toxicological Sciences 2000; 55: 215-222
32. Smith JS, Macina OT, Sussman NB, Karol MH, Maibach HI: Experimental validation of a structure-activity relationship model of skin irritation by esters. Quantitative Structure-Activity Relationships 2000; 19: 467–474
33. Hayashi M et al: A quantitative structure-activity relationship study of the skin irritation potential of phenols. Toxicology in Vitro 1999;13: 915–922

34. Golla S, Madihally S, Robinson RL & Gasem KAM: Quantitative structure-property relationships modeling of skin irritation. *Toxicology in Vitro* 2009; 23: 176–84
35. Fuat Gatnik M, Worth A: Review of Software Tools for Toxicity Prediction. Publications Office of the European Union © European Union, Luxembourg 2010; dosegljivo na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC59685/reqno_jrc59685_software_tools_for_toxicity_prediction%5b1%5d.pdf
36. Puzyn T, Leszczynski J, Cronin MTD: Recent Advances in QSAR Studies Methods and Applications, 2010, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, stran:
37. Series on Testing and Assessment No. 203 NEW GUIDANCE DOCUMENT ON AN INTEGRATED APPROACH ON TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SKIN CORROSION AND IRRITATION. Organisation for Economic Co-operation and Development –OECD 11-Jul-2014, ENV/JM/MONO(2014)19, , dosegljiv na: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282014%2919&doclanguage=en>
38. Gerner I, Liebsch M, Spielman H: Assessment of the Eye Irritating Properties of Chemicals by applying Alternatives to the Draize Rabbit Eye Test: The Use of QSARs and *In Vitro* Tests for the Classification of Eye Irritation. , *ATLA* 2005; 33, 215-237
39. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/eye-irritation> (november 2014)
40. OECD, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 405, Acute Eye Irritation/Corrosion. Adopted: 2 October 2012 na strani: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg405-2012-508.pdf>
41. Abraham MH, Hassanisadi M, Jalali-Heravi M, Ghafourian T, Cain WS, Cometto-Muniz JE: Draize rabbit eye test compatibility with eye irritation thresholds in humans: a quantitative structure-activity relationship analysis. *Toxicological Sciences* 2003; 76: 384-391
42. Worth AP, Cronin MTD: Embedded Cluster Modelling – a novel method for analysing embedded data sets. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 1999; 18: 229-235
43. Tsakovska I, Worth A: The Use of Computational Methods for the Assessment of Chemicals in REACH. *BIOAUTOMATION* 2009; 13 (4), 151-162

44. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/qsar_tools/toxtree (november 2014)
45. Evropska agencija za kemikalije, Praktični vodnik 5: Kako sporočiti Q(SAR), 2009, dosegljivo na: <http://echa.europa.eu/sl/practical-guides>
46. <http://toxtree.sourceforge.net/> (november 2014)
47. IDEACONSULT: Toxtree User Manual, Ideacconsult Ltd., 2009
48. Worth A, Bassan A, Gallegos A, Netzeva TI, Patlewicz G, Pavan M, Tsakovska I, Vracko M: The Characterisation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships: Preliminary Guidance. Institute for Health and Consumer Protection Toxicology and Chemical Substances Unit European Chemicals Bureau, © European Communities 2005, dosegljiv na: http://s-ihcpiprwb002p.jrc.it/our_labs/eurl-ecvam/laboratories-research/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/QSAR_characterisation_EUR_21866_EN.pdf
49. Ekins S: Computational Toxicology: Risk Assessment for Pharmaceutical and Environmental Chemicals, John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2007: 160-162, 169
50. Walker JD, Gerner I, Hulzebos E, Schlegel K: The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool (SICRET). QSAR Comb. Sci. 2005; 24: 378- 384
51. Cronin MTD., Madden JC: In Silico Toxicology: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2011: 483,484, 495
52. OECD, SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 101, REPORT OF THE WORKSHOP ON STRUCTURAL ALERTS FOR THE OECD (Q)SAR APPLICATION TOOLBOX, 24.februar 2009, OECD Environment, Health and Safety Publications, dosegljiv na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)4&doclanguage=en)
53. Hulzebos E, Walker JD, Gerner I, Schlegel K: Use of structural alerts to develop rules for identifying chemical substances with skin irritation or skin corrosion potential. QSAR Comb. Sci. 2005; 24: 332-342
54. Galegos Salliner A, Worth A: Application of the BfR Rulebase for Skin Irritation to the Test Chemicals in the ECVAM Skin Irritation validation Study. 2006, European Chemicals Bureau, JRC, Italy, dosegljiv na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC18-BfR%20rulebase%20application.pdf>

55. Dearden J, Worth A: In Silico Prediction of Physicochemical Properties. JRC, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities © European Communities, 2007, dosegljiv na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/doc/EUR_23051_EN.pdf
56. Rorije E, Hulzebos E: Evaluation of (Q)SARs for the Prediction of Skin Irritation/Corrosion Potential *Physico-chemical exclusion rules*, september 2005, National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, Nizozemska, dosegljiv na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Evaluation_of_Skin_Irritation_QSARs.pdf
57. Tsakovska I, Netzeva T, Worth A: Evaluation of (Q)SARs for the prediction of Eye Irritation/Corrosion Potential *Physicochemical exclusion rules*. Institute for Health and Consumer Protection Toxicology and Chemical Substances Unit European Chemicals Bureau © European Communities 2005, dosegljiv na: http://s-ihcpiprwb002p.jrc.it/our_labs/eurl-ecvam/laboratories-research/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Evaluation_of_Eye_Irritation_QSARs.pdf
58. Hulzebos EM, Maslankiewicz L, Walker JD: Verification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion. *QSAR Comb. Sci.* 2003; 22: 351 – 363
59. Walker JD, Gerner I, Hulzebos E, Schlegel K: (Q)SARs for Predicting Skin Irritation and Corrosion: Mechanisms, Transparency and Applicability of Predictions. *QSAR Comb. Sci.* 2004; 23: 721-724
60. White IR, de Groot AC. Cosmetics and skin care products. In: Frosch PJ, Menne T, Lepoittevin J-P. *Contact Dermatitis* 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 493-506
61. Sun-A C, Susun A, Eunyong L, Kyeho S, Jun-Cheol C, Tae Ryong L: A new cell-based method for assessing the eye irritation potential of chemicals: An alternative to the Draize test. *Toxicology Letters* 2012; Volume 212, št.: 2, str.: 198-204
62. Ishii S, Ishii K, Nakadate M, Yamasaki K: Correlation study in skin and eye irritation between rabbits and humans based on published literatures. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 55: 596–601

63. Eunyoung L, Susun A, Dongwon C, Seongjoon M, Ihseop C: Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives; Contact Dermatitis 2007; 56: 131–136
64. Stern M, Klausner M: Evaluation of the EpiOcular TM Tissue Model as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test. Toxicology in Vitro 1998; 12: 455±461
65. Menard Srpčič A: [Varnost uporabe kozmetičnih izdelkov, RS Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije dostopen na: www.uk.gov.si/fileadmin/uk.gov.si/.../doc/kozmetika_120613.doc](http://www.uk.gov.si/fileadmin/uk.gov.si/.../doc/kozmetika_120613.doc)
66. Takahashi Y, Hayashi K, Abo T, Koike M, Sakaguchi H, Nishiyama N: The Short Time Exposure (STE) test for predicting eye irritation potential: Intra-laboratory reproducibility and correspondence to globally harmonized system (GHS) and EU eye irritation classification for 109 chemicals. Toxicol. In Vitro 2011; 7: 1425-34
67. Hoffmann S, Gallegos Saliner A, Patlewicz G, Eskes C, Zuang V, Worth AP: A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals. Toxicology Letters 2008; 180: 9–20
68. Tomasz P, Jerzy L, Cronin MTD: Recent Advances in QSAR Studies Methods and Applications, Springer Dordrecht, Heidelberg, London New York 2010: 8, 9, 320-322, 336-339
69. OECD, Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 69 GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION OF (QUANTITATIVE) STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP [(Q)SAR] MODELS, ENV/JM/MONO(2007)2, 2007, Paris, OECD, dosegljiv na: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono%282007%292>
70. Liew Chin Yee, Yap Chun Wei: QSAR and Predictors of Eye and Skin Effects. Mol. Inf. 2013, 32; 281 – 290
71. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-9d978748-75d0-18b8-e044-00144f67d249/AGGR-d3aaae98-3820-40a9-8caf-4605756bec2a_DISS-9d978748-75d0-18b8-e044-00144f67d249.html#ADMIN_DATA
72. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dff58f8f-e941-55b9-e044-00144f67d031/AGGR-b8869a6a-4a29-45c1-8c28-175f107dd7bd_DISS-dff58f8f-e941-55b9-e044-00144f67d031.html#ADMIN_DATA

73. Akobeng AK: Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica* 2007; Volume 96, Issue 3: 338–341, dosegljivo na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x/pdf>
74. Edited by EPA Staff, APPENDIX B Sensitivity of Cooper Statistics to the Number and Choice of Chemicals Used in Validation Study, Endocrine Disruptor Screening Program, Prepared under Contract 68-W-01-023 Work Assignment No. 5-3 Technical Directive No. 1, March 21, 2005, dosegljivo na: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvac/cooper_statistics_appendix_b.pdf
75. Performance Standards for In-Vitro Skin Irritation Test Methods based on Reconstructed Human Epidermis (RhE), European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011, dosegljiv na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC8-updated_ECVAM_PS_2009.pdf
76. Griesinger C, Barroso J, Zuang V, Cole T, Genschow E, Liebsch M: Explanatory Background Document to the OECD Draft Test 5 Guideline on in vitro Skin Irritation Testing. EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE Institute for Health and Consumer Protection, In-vitro Toxicology Unit, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) 2009, dosegljiv na: <http://oecd.org/chemicalsafety/testing/43670220.pdf>
77. STATEMENT ON THE PERFORMANCE UNDER UN GHS OF THREE IN-VITRO ASSAYS FOR SKIN IRRITATION TESTING AND THE ADAPTATION OF THE REFERENCE CHEMICALS AND DEFINED ACCURACY VALUES OF THE ECVAM SKIN IRRITATION PERFORMANCE STANDARDS STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF IN-VITRO TESTS FOR SKIN IRRITATION TESTING, EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE, Institute for Health and Consumer Protection In vitro methods Unit European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), 2009: str. 3 in 6, dosegljiv na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC6-ESAC2009.pdf>
78. Mombelli E: An evaluation of the predictive ability of the QSAR software packages, DEREK, HAZARDEXPERT and TOPKAT, to describe chemically-induced skin irritation. *Altern Lab Anim.* 2008; 36(1):15-24

79. Gallegos Saliner A, Patlewiczand G, Worth AP: A Review of (Q)SAR Models for Skin and Eye Irritation and Corrosion. QSAR Comb.Sci. 2008; 27, No.1: 49-59
80. ESAC Shadow Review: Organotropic in vitro assays as screening tests to identify potencial ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS classifications in atiered test strategy, as part of a wieght of evidence approach. ESAC, 2007, dosegljiv na strani: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-eye-irritation/FINAL_ESAC_ShadowReviewReport_on_Organotypic_Assays.pdf
81. <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/glossary/ex-ecb> (november 2014)
82. Herzler M, Spielmann H, Gerner I, Liebsch M, Hoefler T: Use of *In Vitro* Data and (Q)SARs to Classify Eye Irritating Chemicals in the EU – Experience at the BfR. ALTEX 2005; 22, Special Issue 2: 239-245
83. Simon-Hettich B, Rothfuss A, Steger-Hartmann T: Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances. Toxicology 2006; 224: 156–162
84. Balls M, Combes RD, Bhogal N., *New Technologies for Toxicity Testing*, 2012 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, New York, strani: 100, 221-248
85. Nelson SD: Metabolic activation and drug toxicity, *J. Med.Chem.* 1982,; 25 (7): 753–765
86. Casarett and Doull's, TOXICOLOGY The Basic Science of Poisons, Eighth Edition, 2008, McGraw-Hill Education, LLC, New York : 844-850, 773-775
87. Technical Report No. 89: (Q)SAR-s Evaluation of the comercialy available software for human health and environmental endpoints with respect to chemical management applications, ECETOC- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, September 2003

7 PRILOGA 1

Preglednica XIX je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njene CAS številke, podatkov o dražilnosti in/ali jedkosti spojine na koži pridobljeni iz virov omenjenih v poglavju »Materiali in metode« ter iz spletne podatkovne baze eChemPortal in rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.

Preglednica XVI: Rezultati testiranja prvega niza spojin

IME SPOJINE	CAS	Literatura ^(a)	eChemPortal ^(b)	Toxtree ^(c)						
				1	2	3	4	5	6	7
1-butoksipropan-2-ol	5131-66-8	R38	H315				+			
2- aminoetanol	141-43-5	R34	H314						+	
2- heksilciklopentan-1-on	13074-65-2	R38	/				+			
2,5-toluendiamin	95-70-5	R38	R315							+
2-etilheksilsalicilat	118-60-5	R38	blagi iritant						+	
2-fenoksietanol	122-99-6	R38	blagi iritant				+			
2-furaldehid	98-01-1	R38	H315				+			
benzilbenzoat	120-51-4	R38	I in NC				+			
benzojska kislina	65-85-0	R38	blag iritant				+			
bifenil-2-ol	90-43-7	R38	H315						+	
butilhidroksianizol	25013-16-5	R38	I in NC		+					
cikloheksanon	108-94-1	R38	I				+			

cimetna kislina	140-10-3	R38	R38		+					
cinamil alkohol	104-54-1	R38	I				+			
citronelol	106-22-9	R38	H315				+			
dietanolamin	111-42-2	R38	H315						+	
dietilftalat	84-66-2	R38	blagi iritant				+			
dietilheksil karbonat	14858-73-2	R38	H315				+			
diizopropiladipat	6938-94-9	R38	blagi iritant				+			
epiklorhidrin	106-89-8	R34	H314				+			
etanol	64-17-5	R38	H315				+			
etilakrilat	140-88-5	R38	H315					+		
etilenglikol	107-21-1	R38	I in NC				+			
formaldehid	50-00-0	R34	H314						+	
glikolna kislina	79-14-1	R34	H314		+					
glutaraldehid	111-30-8	R34	H314					+		
heksametilendiakrilat	13048-33-4	R38	H315					+		
heksilcinamal	101-86-0	R38	/						+	
heksilenglikol	107-41-5	R38	H315				+			
izopropilmiristat	110-27-0	R38	NI				+			
karmaflor	873888-84-7	R38	/						+	
klorbutanol	57-15-8	R38	H315				+			
L- mentol	2216-51-5	R38	H315				+			
linalol	78-70-6	R38	H315				+			

Luperox 231	6731-36-8	R38	NC in blag iritant				+			
m-aminofenol	591-27-5	R38	NC							+
megasantol (polysantol)	107898-54-4	R38	H315				+			
metilizotiazolinon	2682-20-4	R34	H314	+						
metilparaben	99-76-3	R38	/						+	
natrijev lavrilsulfat	151-21-3	R38	H315		+					
nonanojska kislina	112-05-0	R34	H314				+			
nonilfenol	25154-52-3	R34	H314						+	
p-(1,1-dimetilpropil)fenol	80-46-6	R34	H314		+					
p-anizilacetat	104-21-2	R38	/				+			
propilgalat (E310)	121-79-9	/	blag iritant		+					
retinilacetat	127-47-9	R38	I		+					
tiamin- vitamin B1	59-43-8	R38	/		+					
Triton X-100	9002-93-1	R38	/				+			
vinilacetat	108-05-4	R38	NC				+			
α -tokoferol	10191-41-0	R38	/	+						

^(a)Podatki o draženju kožne in povzročanju opeklin spojini pridobljen iz literaturnih virov navedenih v materialih in metodah ali pa iz varnostnih listov prosto dostopnih na spletu (MSDS, SDS). R38 pomeni da spojina deluje kot kožni iritant, R34 ali R35 pa pomeni, da spojina povzroča opekline.

^(b)Podatki o draženju kožne in povzročanju opeklin spojini pridobljen iz spletne podatkovne baze podatkov eChemPortal. Znak I pomeni, da spojina deluje kot kožni iritant, z NC so označene spojine, ki imajo v podatkovni bazi eChemPortal podatek, da niso kožni iritanti in/ali ne povzročajo opeklin. Z znakom / pa so označene spojine, za katere podatkov o draženju kožne in povzročanju opeklin nismo našli. R38 ali H315 pomeni da spojina draži kožo, R34, R35 ali H314 pomeni, da spojina na koži

povzročča opekline. Včasih uporabimo tudi opisno »blagi iritant«, kar pomeni isto kot oznaka R38, zaradi razlike v obeh označevalnih sistemih, ki je obrazložena v uvodu (novejši CLP sistem ne navede spojine kot iritant, starejši iz Direktive o nevarnih snoveh spojino navede kot iritant) .

^(c)Toxtree-jev programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži ovrednoti testirane spojine z enim sedmih možnih izvidov označenih s številkami 1-7. Rezultati so ovrednoteni z R stavki (risk frases) in sicer: R34-povzročča opekline (razjede na koži, ki nastanejo po 4 urnem stiku spojine s kožo), R35-povzročča hude opekline (razjede na koži, ki nastanejo po 3-h minutah po nanosu spojine na kožo) in R38-draži kožo in sicer so sledeči: 1- Ne povzročča opeklina na koži (NI R34 ali R35), 2- Ne draži kože in ne povzročča opeklina (NI R34, R35 ali R38), 3- Ne draži kože (NI R38), 4- Draži kožo (kar ustreza oznaki: R38), 5- Povzročča opekline (kar ustreza oznakama: R34 in R35), 6- Draži kožo ali povzročča opekline (kar ustreza vsem trem oznakam: R34, R35 in R38), 7- Neznano

8 PRILOGA 2

Preglednica XX je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njene CAS številke, podatkov o dražilnosti in/ali jedkosti spojine na koži pridobljeni iz virov omenjenih v poglavju »Materiali in metode« ter iz spletne podatkovne baze eChemPortal in rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži.

Preglednica XVII: Rezultati testiranja drugega niza spojin

IME SPOJINE	CAS	Toxtree ^(c)								
		eChemPortal ^(a)	Literatura ^(b)	1	2	3	4	5	6	7
alantoin	97-59-6	-			+					
alurno rdeče AC (E129)	25956-17-6		-		+					
amonijev hidrogen {[bis(fosfonometil)amino]metil} fosfonat	34274-28-7	-			+					
arbutin	497-76-7	/	-		+					
bemotrizinol	187393-00-6	-			+					
bis(5-amino-2-hidroksifenil)metan dihidroklorid	27311-52-0	-			+					
butilhidroksitoluen (E321)	128-37-0	-			+					
citronska kislina	77-92-9	-			+					
deciloleat	3687-46-5	-			+					
dehidroocetna kislina (E265)	520-45-6	-			+					
diamonijev 2,2'-disulfanedildiacetat	68223-93-8	-			+					
diazolidinilurea	78491-02-8	-			+					

diizodeciladipat	27178-16-1	-		+							
dikalijev fosfat	7785-11-4	GRAS			+						
dilaktid	95-96-5	-			+						
dinatrijev EDTA	139-33-3	-			+						
dipalmitoilhidroksiprolin	41672-81-5	-			+						
D-pantenol	81-13-0	-	+		+						
fitosfingozin	554-62-1	/	-		+						
gliceriltrilavrat	538-24-9	-			+						
glicerol	56-81-5	-			+						
gliceroldiacetatlavrat	30899-62-8	-			+						
holesterol	57-88-5	-	+		+						
klorfenezin	104-29-0	-			+						
kofein	58-08-2	-			+						
L-askorbinska kislina	50-81-7	-			+						
L-cistein (E920)	56-89-3	-	-		+						
maltodekstrin	9050-36-6	/	-		+						
metildihidro-Jasmonate®	24851-98-7	-				+					
natrijev citrat (E331)	68-04-2	-			+						
nikotinska kislina	59-67-6	-			+						
oktokrilen	6197-30-4	-			+						
piperonilbutoksid	51-03-6	-					+				
poligliceril-10-lavrat	34406-66-1	/	-		+						

propilenglikol	57-55-6	-		+						
propilparaben	94-13-3	-	-		+					
salicilna kislina	69-72-7	-	+		+					
Sepiwhite MSH	175357-18-3	-		+						
sončno rumeno FCF (E110)	2783-94-0	-			+					
sorbinska kislina	110-44-1	-			+					
sorbitan stearat (E491)	1338-41-6	-		+						
trietilheksanoin	7360-38-5	/	-	+						
triklokarban	101-20-2	-		+						
trometamol	77-86-1	-		+						
zeleno S (E142)	3087-16-9		-		+					

GRAS(Generally Recognised as Safe)- pomeni, da je spojina splošno priznana kot varna in nima nobenih opozoril o toksičnosti spojine, zato smo predvideli da ne draži kože in ne povzroča opeklin.

^(a) Podatki o draženju kože ali povzročanju opeklin spojin pridobljen iz spletne podatkovne baze podatkov eChemPortal. Znak + pomeni, da spojina draži kožo ali povzroča opeklino, z – so označene spojine, ki imajo v podatkovni bazi eChemPortal podatek, da dražijo kožo ali povzročajo opeklino. Z znakom / pa so označene spojine, za katere podatkov o draženju kože ali možnosti povzročanja opeklin nismo našli.

^(b) Podatki o draženju kože ali povzročanju opeklin spojin pridobljen iz literaturnih virov navedenih v poglavju »Materiali in metode« ali iz varnostnih listov prosto dostopnih na spletu (MSDS, SDS). Znak + pomeni da spojina draži kožo ali povzroča opeklino. Znak – pomeni, da spojina ne draži kože oz. ne povzroča opeklin na koži.

^(c) Toxtree-jev programski modul za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na koži ovrednoti testirane spojine z enim sedmih možnih izvidov označenih s številkami 1-7. Rezultati so ovrednoteni z R stavki (risk frases) in sicer: R34-povzroča opeklino (razjede na koži, ki nastanejo po 4 urnem stiku spojine s kožo), R35-povzroča hude opeklino (razjede na koži, ki nastanejo po 3-h minutah po nanosu spojine na kožo) in R38-draži kožo in sicer so sledeči: 1- Ne povzroča opeklin na koži (NI R34 ali R35), 2- Ne draži kože in ne povzroča opeklin (NI R34, R35 ali R38), 3- Ne draži kože (NI R38), 4- Draži kožo (kar ustreza oznaki: R38), 5- Povzroča opeklino (kar ustreza oznakama: R34 in R35), 6- Draži kožo ali povzroča opeklino (kar ustreza vsem trem oznakam: R34, R35 in R38), 7- Neznano

9 PRILOGA 3

Preglednica XXI je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njene CAS številke, podatkov o dražilnosti spojine na očeh in jedkosti spojine na koži ali na očeh pridobljenih iz virov omenjenih v poglavju »Materiali in metode« ter iz spletne podatkovne baze eChemPortal- podan glede na klasifikacijsko oznako spojine in rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh.

Preglednica XVIII: Rezultati testiranja tretjega niza spojin

IME SPOJINE	CAS	Literatura ^(a)	Toxtree ^(b)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
benzalkonijev klorid	8001-54-5	R34										+		
benzil alkohol	100-51-6	R34												+
benzofen-4-on	4065-45-6	R36									+			
benzoil peroksid	94-36-0	R36				+								
biotin	58-85-5	R36	+											
cetilpiridinijev klorid monohidrat	6004-24-6	R36		+										
cikloheksanol	108-93-0	R36									+			
ciklopentanol	96-41-3	R36									+			
cimetna kislina	140-10-3	R36	+											
citronska kislina (E330)	77-92-9	R34	+											
dilaktid	95-96-5	R36	+											

dinatrijev EDTA, dihidrat	6381-92-6	R36	+										
dipalmitoilhidroksiprolin	41672-81-5	R36		+									
eritromicin	114-07-8	R36				+							
etanol	64-17-5	R36								+			
geraniol	106-24-1	R36								+			
glicerol	56-81-5	R36								+			
glikolna kislina	79-14-1	R34											+
heksametilendiamin	124-09-4	R34										+	
homosalat	118-56-9	R36				+							
indol	120-72-9	R41								+			
izopropanol	67-63-0	R36								+			
kapsaicin	404-86-4	R41	+										
kinolinsko rumeno	8003-22-3	R36	+										
klorbutanol	57-15-8	R36	+										
klorfenezin	104-29-0	R36	+										
kloroksilenol	88-04-0	R36	+										
L-cistein (E920)	56-89-3	R36	+										
linalol	78-70-6	R36								+			
L-mentol	2216-51-5	R36								+			
manitol	69-65-8	R36	+										
metilzotiazolinon	2682-20-4	R34	+										
metilparaben	99-76-3	R36	+										

minoksidil	38304-91-5	R36	+											
natrijev pirofosfat	7722-88-5	R36	+											
nikotinska kislina	59-67-6	R36	+											
propilenglikol	57-55-6	R36								+				
Quaternium 5	107-64-2	R41		+										
retinilacetat	127-47-9	R36				+								
salicilna kislina	69-72-7	R41	+											
sončno rumeno FCF (E110)	2783-94-0	R36	+											
steariltrimetilamonijev klorid	112-03-8	R34		+										
triklosan	3380-34-5	R36	+											
vanilin	121-33-5	R36	+											
zeleno FCF (E143)	2353-45-9	R36				+								

^(a)Podatki spojinah, ki dražijo oči ali na očeh povzročajo poškodbe ter povzročajo opekline pridobljen iz literarnih virov navedenih v »Materiali in metode« iz eChemPortala ali iz varnostnih listov prosto dostopnih na spletu (MSDS, SDS). Oznaka R36 pomeni ,da spojina deluje kot očesni iritant. R41 pomeni, da spojina povzroča hude poškodbe oči. R34 in R35 pa sta splošni oznaki za povzročitelje opeklina, ki hkrati povzročajo hude poškodbe oči (spojine, ki delujejo na koži in očeh).

^(b) Rezultati testiranja spojin s Toxtree-jevim programskim modulom za napovedovanje draženja oči ali povzročanja poškodb na očeh. S številkami 1-11 označimo možne izide modula, ki so sledeči: 1-Ne povzroča opeklina R34 ali R35, 2- Ne povzroča poškodb R34, R35, R36 ali R41, 3- Ni očesni iritant R41,4- Ni očesni iritant R36, 5- Ne povzroča opeklina (ali poškodb na očeh) R34, R35 ali R41, 6- Ne povzroča hudih poškodb oči R34, R35 ali R36, 7- Ni očesni iritant R36 ali R41, 8- Povzroča hude poškodbe oči, 9- Zmerno reverzibilno draženje oči, 10- Povzroča opekline na koži, 11- Neznano

10 PRILOGA 4

Preglednica XXII je sestavljena iz kemijskega imena spojine, njene CAS številke, podatkov o dražilnosti spojine na očeh in jedkosti spojine na koži ali na očeh pridobljenih iz virov omenjenih v poglavju »Materiali in metode« ter iz spletne podatkovne baze eChemPortal- podan glede na klasifikacijsko oznako spojine in rezultatov testiranja spojin s programskim modulom Toxtree za napoved dražilnosti in jedkosti spojin na očeh.

Preglednica XIX: Rezultati testiranja četrtega niza spojin

IME SPOJINE	CAS	Literatura ^(a)	eChemPortal ^(b)	Toxtree ^(c)													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
α -bisabolol	515-69-5	-		+													
1,4-dimetoksibenzen	150-78-7		-	+													
alantoin	97-59-6		-	+													
bemotrizinol	187393-00-6		-				+										
betain	107-43-7		-	+													
deciloleat	3687-46-5		-		+												
diamonijev 2,2'-ditiodiacetat	68223-93-8		-	+													
dibutilsebakat	109-43-3		-				+										
diizodeciladipat	27178-16-1		-		+												
dikumil peroksid	80-43-3		-				+										
dodekametilcikloheksasiloksan	540-97-6		-				+										

D-pantetin	16816-67-4	-		+														
EDDS	20846-91-7		-	+														
gliceriltrilavrat	538-24-9		-		+													
holesterol	57-88-5		-		+													
izodeciloat	59231-34-4		-		+													
izopropil izostearat	68171-33-5		-		+													
izopropilmiristat	110-27-0		-				+											
kofein	58-08-2		-	+														
L-arginin hidrosiklorid	1119-34-2		-	+														
maltodekstrin	9050-36-6	-		+														
natrijev dehidroacetat (E266)	4418-26-2		-	+														
natrijev dihidrogencitrat	18996-35-5		-	+														
oktokrilen	6197-30-4		-				+											
Pigment Red 122	980-26-7		-	+														
Pigment Violet 19	1047-16-1		-	+														
Pigment Yellow 74	6358-31-2		-	+														
poligliceril 10-laurat	34406-66-1	-		+														
riboflavin (E150)	83-88-5	-	/	+														
skvalan	111-01-3		-		+													
sorbitan stearat	1338-41-6		-				+											
sorbitantrioleat	26266-58-0		-		+													
sorbitol	50-70-4		-	+														

sulfasalazin	599-79-1	-		+											
tartrazin	12225-21-7		-	+											
triamkinolon	124-94-7	-		+											
tridekan	629-50-5		-				+								
trietilheksanoin	7360-38-5	-			+										
zeleno S (E142)	3087-16-9		-	+											
žveplo	7704-34-9		-				+								
β-karoten	7235-40-7	-	/		+										

^(a)Podatki o povzročanju draženja oči ali hudih poškodb na očeh spojin pridobljen iz literaturnih virov navedenih v »Materiali in metode« ali iz varnostnih listov prosto dostopnih na spletu (MSDS, SDS). Znak - pomeni da spojina ne draži oči ali ne povzroča hudih poškodb na očeh ali opeklin na koži.

^(b) Podatki o povzročanju draženja oči, hudih poškodb na očeh ali opeklin na koži za spojine pridobljen iz eChemPortala. Znak - pomeni, da spojina ne draži oči, ne povzroča hudih poškodb na očeh ali opeklin na koži.

^(c) Rezultati testiranja spojin s Toxtree-jevim programskim modulom za napovedovanje draženja oči ali povzročanja poškodb na očeh. S številkami 1-11 označimo možne izide modula, ki so sledeči: 1-Ne povzroča opeklin R34 ali R35, 2- Ne povzroča poškodb R34, R35, R36 ali R41, 3- Ni očesni iritant R41,4- Ni očesni iritant R36, 5- Ne povzroča opeklin (ali poškodb na očeh) R34, R35 ali R41, 6- Ne povzroča hudih poškodb oči R34, R35 ali R36, 7- Ni očesni iritant R36 ali R41, 8- Povzroča hude poškodbe oči, 9- Zmerno reverzibilno draženje oči, 10- Povzroča opeklino na koži, 11- Neznano