

# Kemometrijski pristupi u analizi toksičnog ponašanja supstanci

---

Zrinski, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:133085>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Klara Zrinski

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Klara Zrinski

Kemometrijski pristupi u analizi toksičnog ponašanja supstanci

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Šime Ukić  
doc. dr. sc. Matija Cvetnić  
izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2023.

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Šimi Ukiću na pruženoj pomoći i savjetima.  
Zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su mi velika podrška kroz cijelo školovanje.*

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

## Sažetak

Globalni razvoj industrije povezuje se s onečišćenjem okoliša. Štetni utjecaj raznih tvari antropogenog porijekla na organizme u okolišu postao je ozbiljni problem te su razvijene razne metode kako bi se mogao procijeniti rizik prisutnosti toksičnih tvari u okolišu kao i metode koje određuju toksični učinak tvari na organizme. Procjena rizika temelji se na poznatim vrijednostima toksičnosti pojedinih tvari koje se mogu odrediti za različite testne organizma. S obzirom da se štetne tvari u okolišu u pravilu ne nalaze samostalno već kao smjesa tvari, ovakav pristup najčešće nije koristan. Tvari u smjesama mogu djelovati zajedno na način da je štetni utjecaj intenzivniji nego da sumiramo utjecaj dviju zasebnih tvari.

Zbog beskonačnog broja različitih smjesa koji mogu egzistirati u okolišu, nije moguće za svaku smjesu odrediti toksičnost već se razvijaju matematički modeli kojima se predviđa toksičnost takvih smjesa. Najčešće korišten model je aditivni model, potom model neovisnog djelovanja te zatim modeli nastali njihovom integracijom. Na krilima intenzivnog razvoja računala sve više na važnosti dobivaju i napredni računalni pristupi, pri čemu treba istaknuti modeliranje kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (tzv. QSAR modeli) te primjenu umjetne inteligencije.

Statističke metode koje se primjenjuju kod određivanja toksičnog učinka tvari dijele se na parametarske i neparametarske. Kada god je moguće koriste se parametarski testovi, najčešće Studentov *t*-test, Tukeyjev test, Dunnettov test i Williamsov test. Svaki parametarski test ima ekvivalentan neparametarski test.

Ključne riječi: toksičnost, procjena rizika, modeli toksičnosti

## **Abstract**

Global development of industry has been related with environmental pollution. An adverse effect on various anthropogenic substances on organisms in the environment has become a serious problem. Therefore, various methods have been developed in order to determine the toxic effect of hazardous substances on organisms and assess the risk of their presence in the environment. The risk assessment is based on the known toxicity values of individual substances that can be tested on various test organisms. Such approach has a deficiency if applied for environmental risk assessment considering that hazardous substances are not found alone in the environment but as a mixture of various substances. Substances in mixtures can act together, possibly resulting in more intense harmful effect than a cumulative effect of two pure substances.

Due to the infinite number of different mixtures that can occur in the environment, mathematical models that predict their toxicity have been developed and used in risk assessment. The most commonly used model is the concentration addition model, followed by the independent action model and models resulting from their combination. The intensive development of computers with high performances supported application of advanced mathematical approaches such as quantitative structure-activity relationship (QSAR) modeling and artificial intelligence.

Statistical methods used to determine the toxic effect of substances on organisms are generally divided into parametric and nonparametric methods. Whenever possible, parametric tests are used, and the most commonly ones are Student's *t*-test, Tukey's test, Dunnett's test and Williams' test. Every parametric test has an equivalent nonparametric test.

Keywords: toxicity, risk assessment, toxicity models

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Toksičnost .....	2
2.1. Toksičnost tvari .....	2
2.2.1 Akutna toksičnost .....	3
2.1.2. Kronična toksičnost .....	3
2.2. Najčešće metode analize toksičnosti .....	4
2.3. Toksičnost smjesa.....	9
3. Modeliranje toksičnosti smjesa .....	11
3.1. Aditivni model.....	11
3.2. Model neovisnog djelovanja.....	13
3.3. Integrirani modeli .....	14
3.4. QSAR modeli .....	16
3.5. Primjena umjetne inteligencije u predviđanju toksičnosti.....	20
4. Statističke metode u studijama toksičnosti.....	22
4.4. Studentov <i>t</i> -test.....	24
4.4.1. Wilcoxonov test.....	25
4.2. Tukeyjev test .....	26
4.3. Williamsov test.....	27
4.3.1. Shirleyev test .....	27
4.4. Dunnettov test.....	28
5. Zaključak.....	29
6. Literatura .....	30
Životopis.....	38

# 1. Uvod

Usljed globalnog razvoja industrije, povećava se proizvodnja raznih supstanci koje dijelom neminovno završavaju u okolišu. Dakle razvoj industrije povezan je s intenziviranjem onečišćenja okoliša.

Toksičnost supstanci definira se kao štetan utjecaj neke tvari (ili smjese tvari) na zdravlje ljudi i životinja. Između ostalog, informacije o toksičnosti bitne su kod ispitivanja sigurnosti i efikasnosti novih lijekova kao i prilikom evaluacije utjecaja štetnosti tvari koje se nađu u okolišu. [1]

Toksičnost lijekova počela se uvelike testirati 1960-tih godina nakon katastrofe s lijekom talidomidom (tisuće djece rođeno je s defektima zbog toksičnosti lijeka u trudnoći). Zbog toga su mnoge države uvele stroge regulacije kod razvijanja novih lijekova. Toksičnost tvari može se rangirati bilo gdje između zanemarive i ozbiljne. Potrebno je ispitivati toksičnost kako bi se odredila ovisnost između primijenjene doze tvari i odgovora organizma, kako bi se utvrdilo jesu li nove kemikalije sigurne za korištenje u željenim područjima, te za dobivanje informacije o mehanizmu toksičnog djelovanja ispitivane tvari. [2]

Procjena rizika prisutnosti štetnih tvari u okolišu temelji se na poznatim vrijednostima toksičnosti ispitivanih tvari. Međutim, takav pristup često daje upitne rezultate jer se tvari u okolišu u pravilu nalaze u smjesama, a ne pojedinačne. U smjesama tvari mogu međusobno utjecati jedna na drugu pri čemu može doći do intenzivnijeg toksičnog učinka od kumulativnog djelovanja zasebnih tvari. Zbog beskonačnog broja smjesa koje se mogu naći u okolišu, eksperimentalno određivanje toksičnosti za svaku smjesu nije realno izvedivo: takav pristup je skup i zahtijeva vremena, a zbog analize na živim organizmima često je i etički upitan. [3] Potreba za informacijama o toksičnosti smjesa dovela je stoga do razvijanja različitih kemometrijskih pristupa koje analiziraju i koriste dostupne podatke o toksičnosti.

Kemometrija se definira kao kemijska disciplina koja koristi matematičke, statističke i druge metode kako bi se dizajnirali ili odabrali optimalni procesi mjerenja i eksperimenti za dobivanje najrelevantnijih informacija za analizu kemijskih podataka. Između ostalog, kemometrija uključuje razvoj i primjenu različitih metoda predviđanja toksičnosti smjesa. [4]



## 2. Toksičnost

### 2.1. Toksičnost tvari

Toksičnost se opisuje kao utjecaj kemijskih spojeva, lijekova ili agensa na zdravlje ljudi ili životinja, a znanost koja se bavi proučavanjem toksičnosti tvari i njihovim utjecajem na organizme naziva se toksikologija. [1] Tvar postaje toksična kada je unesena u organizam u dozi koja ga oštećuje. Prema tome je moguće reći da je svaka tvar toksična, ali toksičnost ovisi o dozi unesenoj u organizam te o samom organizmu, odnosno njegovim reakcijama na pojedine tvari. [5] S obzirom na to da se toksičnost može opisati i kao razina negativnog učinka koju pojedina tvar može prouzročiti, jasno je da će za negativan utjecaj na organizam biti potrebna kratka izloženost ili mala količina jako toksične tvari, dok je za slabo toksičnu tvar potrebna velika količina ili dugoročna izloženost kako bi se postigao jednak negativan učinak. [6]

Toksične tvari u organizam se unose kroz usta, dišni sustav, kožu, probavnim putem, intravenozno te intramuskularno. Plinovite toksične tvari se udisanjem vrlo brzo apsorbiraju u organizam, dok je taj proces nešto sporiji ukoliko se toksične tvari apsorbiraju kroz kožu jer brzina apsorpcije ovisi o debljini rožnatog sloja kože. Nakon ulaska u organizam toksična tvar ulazi u krvotok i širi se cijelim tijelom. Različite toksične tvari različito se raspodjeljuju u tijelu: droge i lijekovi se odlažu većinom u jetri, žuči i kosi, metali u kosi, noktima i kostima, a pojedini pesticidi se zadržavaju u masnome tkivu. Hoće li i kakve posljedice neka tvar ostaviti na organizam ovisi o mnogo čimbenika pa se djelovanje tvari ispituje na razne načine. [7] Istraživanje toksičnosti zasniva se na ispitivanju staničnih, biokemijskih i molekulskih mehanizama djelovanja toksičnih supstanci kao i na posljedicama njihovog djelovanja te učestalosti pojavljivanja tih posljedica. Prilikom ovog procesa prati se kako izloženost organizma toksičnoj tvari ili doza te tvari utječe na testni organizam, tj. njegov odgovor na dani podražaj. Osnova istraživanja toksičnosti je procjena rizika koja predstavlja kvantitativnu procjenu potencijalnih efekata na ljudsko zdravlje uslijed djelovanja toksičnih tvari. Zbog velikog broja mogućih odgovora organizma te raznovrsnosti toksičnih tvari identificirane su mnoge vrste toksičnosti prema različitim kriterijima. [8] Temeljne kategorije toksičnosti su akutna i kronična toksičnost. Osnovna razlika među njima jest u vremenu izloženosti organizma toksičnoj tvari, pri čemu se akutna toksičnost izražava kao nagla (kratkotrajna), najčešće jednokratna izloženost, a kronična toksičnost se opisuje kao duga izloženost organizma toksičnoj tvari. [9]

### 2.2.1 Akutna toksičnost

Akutna toksičnost odnosi se na posljedice izazvane kratkoročnim oralnim, dermalnim ili respiratornim izlaganjem organizma toksičnoj tvari. Pri tome se podrazumijeva jednokratno izlaganje ili nekoliko izlaganja toksičnoj tvari tijekom 24 sata. Prati se vrijeme potrebno da organizam reagira na podražaj i ako se to dogodi između 24 i 96 sati nakon podražaja radi se o akutnoj toksičnosti. [9] Akutna toksičnost najčešće se izražava kao LD ili LC vrijednost. LD i LC kratice su engleskih termina za smrtonosnu dozu (eng. *lethal dose*) odnosno smrtonosnu koncentraciju (eng. *lethal concentration*). Uz navedene kratice obično se dodaje indeks koji odgovara postotku ubijene koncentracije testnog organizma. Tako primjerice LD<sub>50</sub> označava dozu toksične tvari koja ubija 50% testnih organizama, a LC<sub>50</sub> koncentraciju toksične tvari koja uzrokuje isti smrtni ishod. LD se izražava u miligramima toksične tvari po kilogramu tjelesne mase ispitivane jedinke (mg/kg), a LC u mililitrima toksične tvari po kilogramu tjelesne mase ispitivane jedinke (mL/kg). [10] U slučaju da se kao rezultat testa toksičnosti ne prati postotak smrtnog ishoda u populaciji testnog organizma, već smanjenje neke aktivnosti, toksičnost se izražava kao efektivna doza (ED) ili efektivna koncentracija (EC). [11]

Jedan od problema analize toksičnosti u okolišnim uzorcima jest činjenica da se u takvim situacijama nerijetko radi o veoma kompleksnim sustavima sastavljenim od brojnih supstanci koje na različite načine doprinose ukupnom toksičnom učinku. Globalno usklađen sustav razvrstavanja i označavanja kemikalija (eng. *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*, GHS) u slučaju smjese primjenjuje procjenu akutne toksičnosti (eng. *acute toxicity estimate*, ATE). ATE pojedinog sastojka smjese *i* se određuje dijeljenjem koncentracije sastojka *i*, *c*, s njegovom LC<sub>x</sub> (ili LD, EC, odnosno ED) vrijednosti. Tada se ATE smjese (ATE<sub>mix</sub>) procjenjuje prema jednadžbi (1). [12]

$$\frac{100}{ATE_{mix}} = \sum_i \frac{c_i}{ATE_i} \quad (1)$$

Na temelju vrijednosti procjene akutne toksičnosti smjesa GHS svrstava toksične smjese u pet kategorija ovisno o opasnosti. Kategorija 1 označava tvari i smjese koje izazivaju najveću toksičnost, dok kategorija 5 označava tvari i smjese s relativno malo izraženom toksičnošću, no koje u određenim uvjetima mogu biti opasne za neke organizme. [9]

### 2.1.2. Kronična toksičnost

Kronična toksičnost definira se kao toksičnost izazvana uslijed izloženosti organizma toksičnoj tvari tijekom većeg dijela ili tokom cijelog životnog ciklusa nekog organizma. Ova

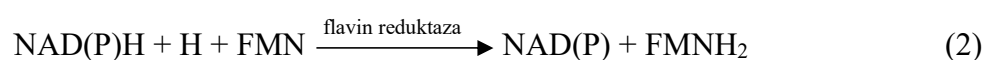
vrsta toksičnosti najčešće napada i oštećuje određeni vitalni organ ili više njih. [13] Prati se smrtnost ispitivanih organizama u kontaktu s toksičnom tvari ili utjecaj na funkcije organizma. Većina istraživanja kronične toksičnosti provode se na raznim vrstama glodavaca, a toksična tvar se unosi u organizam oralno, putem kože ili respiratorno. Ispitivanja se provode kako bi se dobile informacije o mogućim opasnostima za zdravlje prilikom duljeg izlaganja organizma određenoj tvari. Dobivaju se informacije o tome kako organizam reagira na podražaj tokom svojeg životnog ciklusa te o mogućnostima oštećenja određenih organa. Prilikom ispitivanja prate se razine bez opaženih štetnih efekata (eng. *No-Observed-Adverse-Effect-Level*), razine s najnižim opaženim štetnim efektom (eng. *Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*) te polazište određivanja referentne doze (eng. *Benchmark Dose*). [14]

## 2.2. Najčešće metode analize toksičnosti

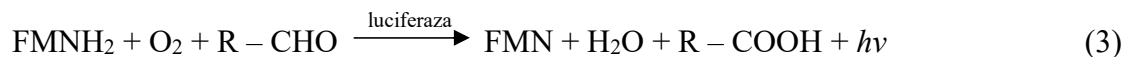
Odabir metode za analizu toksičnosti ovisi o dozvolama prilikom izvođenja testa, ciljevima, dostupnim resursima, zahtjevima organizma koji se koristi za ispitivanje toksičnosti te karakteristikama tvari koja se ispituje. Testovi toksičnosti mogu biti statični (organizmi su tokom cijelog testa izloženi istoj otopini ispitivane tvari) ili protočni. Važno je napomenuti da negativan rezultat tijekom ispitivanja akutne toksičnosti određene tvari ne znači nužno da ta tvar izaziva kroničnu toksičnost. Organizmi korišteni za izvođenje metode analize toksičnosti mogu biti uzgojeni u laboratoriju gdje se izvode ispitivanja, kupljeni od komercijalnih dobavljača ili prikupljeni iz okoliša. [15]

### *Određivanje toksičnosti prema *Vibrio fischeri**

*Vibrio fischeri* (slika 1) su gram-negativne bioluminiscentne štapičaste bakterije prisutne u moru. Žive u simbiozi s drugim organizmima, poput riba i liganja, pri čemu ih bakterije štite od predatora dok oni osiguravaju sve potrebne nutrijente i zaštitu bakterijama. [16] Pogodne su za ispitivanje toksičnosti upravo zbog svojstva bioluminiscencije čiji se mehanizam zasniva na redukciji molekule flavin-mononukleotida (FMN) u reakciji s reduciranim oblikom molekule nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NAD(P)H) uz enzim flavin reduktazu (jednadžba (2)).



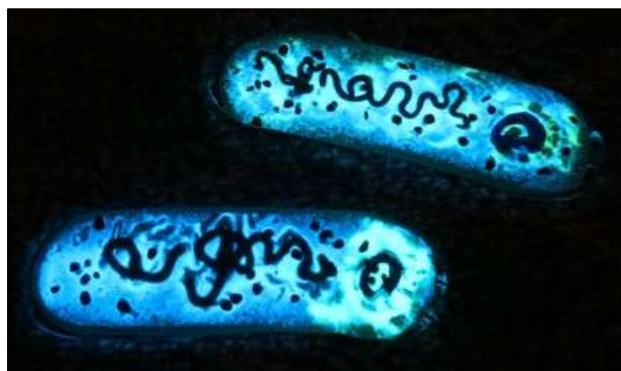
Produkt FMNH<sub>2</sub> se potom uz prisutnost kisika i aldehida oksidira natrag u FMN (jednadžba (3)), a ta je reakcija katalizirana enzimom luciferazom pri čemu se emitira plavo-zelena svjetlost valne duljine oko 490 nm.



Dodatkom toksične tvari smanjuje se luminiscencija bakterija (*INH%*), što se može odrediti prema jednadžbi (4).

$$\text{INH}\% = 100 - \left( \frac{I_t}{I_0 * KF} \right) * 100 \quad (4)$$

$I_0$  i  $I_t$  označavaju vrijednost luminiscencije na početku reakcije, odnosno u vremenu  $t$ , a  $KF$  je korekcijski faktor. [17]



Slika 1. Bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* [18]

Smanjenje intenziteta luminiscencije mjeri se 5, 15 ili 30 minuta od inicijalnog kontakta bakterije i toksične tvari, a test se izvodi pri temperaturi 15 °C. Ovaj se test može izvoditi na svježe pripremljenim bakterijama kao i zamrznutim bakterijama. Zbog jednostavnog izvođenja, visoke osjetljivosti i niske cijene, ovo je jedna od najčešće korištenih metoda analize toksičnosti. [17, 19-21]

#### *Određivanje toksičnosti prema Daphnia magna*

*Daphnia magna* (slika 2) je zooplankton prozirnog oklopa koji živi pretežito u moru. Jedan je od najčešće korištenih organizama za analizu toksičnosti, posebice kod raznih farmaceutika ili za uočavanje kontaminacije vodenih područja. Ovi organizmi se uzgajaju u laboratorijima (tzv. *in-house* pristup) u uvjetima u kojima će se analiza toksičnosti odvijati jer

organizmi za analizu ne smiju biti stariji od 24 sata. Pomoću *D. magna* toksičnost se može analizirati na dva načina: testom nepokretnosti ili testom reprodukcije. [22, 23]



Slika 2. Zooplankton *Daphnia magna* [24]

Prilikom izvođenja analize toksičnosti testom nepokretnosti organizmi su izloženi ispitivanoj tvari različitih koncentracije u periodu od 48 sati, a za otopinu svake koncentracije potrebno je koristiti minimalno 20 jedinki *D. magna* podijeljenih u 4 grupe po 5 jedinki. 24 i 48 sati nakon početka testa mjeri se nepokretnost organizama i određuje udio nepokretnih jedinki za svaku koncentraciju otopine te uspoređuje s kontrolnim vrijednostima. Pomoću dobivenih rezultata određuju se  $EC_{50}$  vrijednosti za oba kontrolna vremena. [25, 26]

Za izvođenje analize toksičnosti testom reprodukcije koriste se ženske jedinke *D. magna* mlađe od 24 sata izložene testnim otopinama različitih koncentracija tijekom 21 dana. Na kraju testa mjeri se broj potomaka te naposljetku određuje efektivna koncentracija, tj. koncentracija tvari koja uzrokuje  $x\%$  smanjenja reproduktivne moći ( $EC_x$  vrijednost). [27]

#### *Određivanje toksičnosti prema Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae*, također poznat kao "pivski kvasac", je jednostanična gljiva koja se koristi kod proizvodnje raznovrsnih alkoholnih pića i kruha. Razmnožava se vrlo brzo, lagano se uzgaja i manipulira kako bi se provela mnoga istraživanja. [28] Za većinu testova toksičnosti ovaj kvasac nije najbolji izbor jer prikupljanje rezultata može trajati i do 3 dana. Nasuprot tome, vrlo je koristan za određivanje toksičnosti vode letalnim testom ili konduktometrijskim testom. Velika prednost ovog kvasca u analizi toksičnosti jest mogućnost dugotrajnog skladištenja u suhim uvjetima. [29, 30]

Letalni test određivanja toksičnosti pomoću *S. cerevisiae* temelji se na detekciji promjene vitalnosti kvasca u dodiru s otopinom toksične tvari, tj. mjeri se omjer živih i neživih stanica. Koje su žive, a koje nežive stanice određuje se pomoću metilenskog modrila koje

prolazi kroz oslabljene, nežive stanice kvasca i boji ih u plavo, dok žive stanice ostaju neobojene. Ovaj test se kod određenih tvari pokazao pogodnijim od testa s *V. fischeri* zbog veće osjetljivosti na toksičnu tvar, a brži je od testa s *D. magna*. [29]

Određivanje toksičnosti pomoću *S. cerevisiae* konduktometrijskim testom temeljeno je na mjerenju promjene vodljivosti suspenzije s kvascem kao rezultat inhibicije fermentacije u prisutnosti toksične tvari. Prilikom obrađivanja rezultata za svaku dobivenu vrijednost vodljivosti potrebno je oduzeti vrijednost vodljivosti otopine vode i šećera u kojoj se kvasac nalazi. Računaju se specifične vodljivosti ispitivane otopine i kontrolne otopine, a ukoliko je razlika između te dvije vrijednosti veća od 10% zaključuje se da je prisutna tvar u ispitivanoj otopini toksična za testni organizam. Ovaj test vrlo se često koristi za brže određivanje onečišćenja vode. [30]

#### *Određivanje toksičnosti prema Lemna minor*

*Lemna minor* (slika 3), poznatija kao vodena leća, je biljka koja raste na površini voda stajaćica, kao što su jezera. Ova se biljka vrlo brzo razmnožava i služi kao hrana mnogim životinjama. [31] Koristi se za praćenje zagađenja vode, posebice teških metala, jer može selektivno akumulirati određene kemikalije. Zbog malenih dimenzija i velike brzine razmnožavanja vrlo je dobar organizam za testiranje toksičnosti. [32] Primjenom *L. minor* toksičnost se može utvrditi praćenjem dimenzija lišća ili praćenjem rasta korijena.



Slika 3. Biljka *Lemna minor* [33]

Određivanje toksičnosti praćenjem dimenzija lišća biljke *L. minor* provodi se najmanje 7 dana kako bi se utvrdio utjecaj toksične tvari na vegetativni rast. Potrebno je barem pet različitih koncentracija ispitivane otopine, a u svakoj otopini treba se nalaziti 9 do 12 lista biljke. Prije početka testa mjeri se broj biljaka prisutnih u pojedinoj otopini te dimenzije njihovih listova. Na kraju testa se ponavlja isto te se posebno prate promjene u razvijanju biljke i

promjene u ispitivanoj otopini. Računa se vrijednost  $EC_x$  prema promjeni broja listova i jednom odabranom parametru, kao što su suha težina, svježa težina ili površina listova. [34]

Praćenjem rasta korijena omogućuje se brzo određivanje toksičnosti vode i vodenih otopina. Različite koncentracije ispitivane otopine rastoče se svaka u 4 posude po 3 mL. U svaku posudu dodaje se po jedna jedinka biljke *L. minor* prije čega joj se precizno odreže korijen. Nakon 72 sata biljke se vade iz otopina i pomoću mikroskopa se bilježi duljina korijena koji je izrastao. Pomoću metode interpolacije dobivenih vrijednosti računa se vrijednost  $EC_x$ . Test je jednostavan, brz, jeftin te jednake ili veće osjetljivosti i selektivnosti od testa praćenjem dimenzija lišća. [33]

#### *Određivanje toksičnosti prema Danio rerio*

*Danio rerio* (slika 4), zbog specifičnih pruga na tijelu poznatije kao zebrice, malene su slatkovodne ribe koje se vrlo brzo razmnožavaju. Toksičnost se analizira pomoću embrija koji su vrlo pogodni za istraživanje jer su prozirni te se razvijaju van tijela majke. [35]



Slika 4. Riba *Danio rerio* [36]

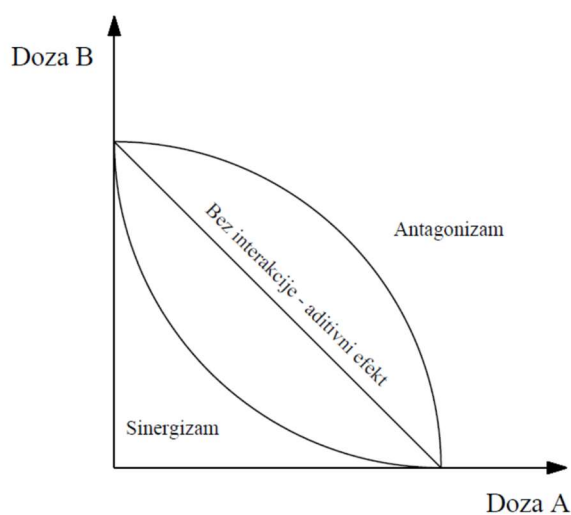
Analiza toksičnosti provodi se na svježe oplodjenim jajašcima u periodu od 96 sati. Koristi se pet različitih koncentracija otopine koja sadrži toksičnu tvar, a u otopinu svake koncentracije uranja se po 20 embrija. Svaka 24 sata prate se četiri glavna svojstva embrija: koagulacija fertiliziranih jajašaca, nedostatak stvaranja somita, nemogućnost odvajanja repa te otkucaji srca. Ukoliko se bilo koje od ova četiri svojstva pojavi određuje se da je embrij neživ, odnosno ne može se dalje razvijati. Na osnovu opažanja računa se vrijednost  $LC_{50}$  te donose zaključci o toksičnosti ispitivane tvari. Ovaj test pokazao se kao uspješan u velikom rasponu ispitivanih tvari s različitim svojstvima. [37, 38]

## Određivanje toksičnosti prema *Gammarus locusta*

*Gammarus locusta* maleni je rak koji je zbog svog kratkog životnog ciklusa pogodan za istraživanje kronične toksičnosti tvari. Bitno je da organizmi za ispitivanje kronične toksičnosti imaju kratak životni ciklus kako bi se u što kraćem vremenu moglo odrediti kako tvar utječe na funkcionalnost organizma. *G. locusta* posebno se koriste za istraživanje toksičnosti raznih sedimenata pri čemu se utjecaj toksične tvari može pratiti na jednoj jedinki ili na populaciji. Za to se koriste mladi i maleni organizmi, a test se provodi 28 dana. Tijekom istraživanja prati se utjecaj toksične tvari na razvoj i reproduktivnost organizama. [39, 40]

### 2.3. Toksičnost smjesa

U prirodi se tvari najčešće javljaju u obliku smjesa, pri čemu tvari u smjesi djeluju jedna na drugu. Prilikom interakcije, toksičnost tvari u smjesi može odstupati od toksičnosti samostalne tvari, odnosno može doći do povećanja ili smanjenja toksičnog efekta. Govorimo o pojavama sinergizma i antagonizma. [41] Do ovih pojava najčešće dolazi pri srednjoj ili velikoj razini izloženosti organizma toksičnoj smjesi, dok je pri maloj razini izloženosti vjerojatnost da će do njih doći mala ili se javljaju sa zanemarivo malenim utjecajem. [42]



Slika 5. Izobologram smjese s prikazanim efektima sinergizma i antagonizma

Sinergistički efekt predstavlja toksičnost smjese veću od kumulativne toksičnosti pojedinih komponenata smjese. Prilikom određivanja rizičnosti pojedine tvari potrebno je ispitati njezin utjecaj na druge tvari s kojima može doći u kontakt kako bi se smanjila mogućnost pojavljivanja sinergizma. Smjesa koja pokazuje antagonistički efekt ima nižu toksičnost od



pojedinih komponenata. Iako antagonizam ne predstavlja velik rizik, potrebno je promatrati i ovo odstupanje smjesa od predviđene toksičnosti. Primjerice bitno je znati kako tvari prisutne u raznim lijekovima utječu jedna na drugu te na tvari iz drugih lijekova kako ne bi došlo do poništenja određenih funkcija. [41] Najčešće korištena metoda za određivanje interakcija unutar smjese je pomoću izobolograma, koju je predložio njemački znanstvenik Walter Siegfried Loewe. Izobologram (slika 5) predstavlja dvodimenzionalni graf na čijim osima se nalaze vrijednosti doza (koncentracija) dviju komponenata smjese. Ravna linija povezuje doze toksičnih tvari koje imaju isti učinak na organizam (tzv. aditivni efekt). Ukoliko se dobiveni rezultati nalaze ispod linije aditivnog efekta, radi se o sinergističkim interakcijama tvari. Dobiveni rezultati koji se nalaze iznad linije aditivnog efekta opisuju antagonističke interakcije dviju tvari prisutnih u smjesi. [43]

### 3. Modeliranje toksičnosti smjesa

S obzirom na velik broj mogućih smjesa tvari teško je, odnosno nemoguće, eksperimentalno odrediti kakav će biti utjecaj svake smjese na različite organizme. Upravo zbog toga primjenjuju se različiti modeli koji predviđaju toksično ponašanje smjese na temelju toksičnog ponašanja pojedinih komponenata.

#### 3.1. Aditivni model

Aditivni model (eng. *Concentration Addition model*, CA) predložili su Loewe i Muischnek (1926), a temelji se na pretpostavci da sve komponente smjese imaju sličan mehanizam djelovanja te djeluju na isti dio organizma. S obzirom na to da se pretpostavlja da komponente ne reagiraju međusobno, one se mogu smatrati da su jedna drugoj ništa više doli sredstvo razrjeđenja. [44]

CA model se opisuje jednadžbom (5), pri čemu se računa vrijednost jedinice toksičnosti (eng. *toxicity unit*, TU) smjese,  $TU_{\text{MIX}}$  kao zbroj TU vrijednosti pojedinih tvari u smjesi,  $TU_i$ . Vrijednost TU pojedine komponente definirana je jednadžbom (6) kao omjer koncentracije toksične tvari  $i$  prisutne u ispitivanoj smjesi i koncentracije  $EC_{p,i}$  iste toksične tvari koja izaziva odabranu razinu inhibicije testnih organizama, pri čemu  $p$  označava promatrani postotak inhibicije (najčešće 50%):

$$TU_{\text{MIX}} = \sum_i TU_i \quad (5)$$

$$TU_i = \frac{c_i}{EC_{p,i}} \quad (6)$$

Kombiniranjem ovih dviju jednadžbi i pisanjem  $TU_{\text{MIX}}$  kao omjera koncentracije smjese,  $c_{\text{MIX}}$ , i koncentracije  $EC_{p,\text{MIX}}$  dobiva se jednadžba (7).

$$\frac{c_{\text{MIX}}}{EC_{p,\text{MIX}}} = \sum_i \frac{c_i}{EC_{p,i}} \quad (7)$$

Jednadžba (7) lako se prevodi u jednadžbu (8) u kojoj  $x_i$  predstavlja molarni udio  $i$ -te komponente u smjesi [41].

$$EC_{p,\text{MIX}} = \left( \sum_i \frac{x_i}{EC_{p,i}} \right)^{-1} \quad (8)$$

Iz navedenih jednadžbi vidljivo je da svaka komponenta smjese utječe na ukupnu toksičnost smjese prema koncentraciji. Dakle, čak i ako svaka pojedina tvar ima razinu

toksičnosti ispod praga na kojem se određuje kao toksična, smjesa će biti toksična zbog aditivnog učinka. [45]

CA model je jednostavan za korištenje i velika je prednost što zahtijeva malo podataka, samo EC (ili LC) vrijednosti svake komponente u smjesi te molarni udio komponenata u smjesi. Upravo zbog toga ovaj je model često korišten. Thrope i suradnici 2006. godine ispitali su CA model za predviđanje aktivnosti estrogenskih kemijskih smjesa u otpadnim vodama postrojenja za njihovo pročišćavanje kroz 14 dana *in vitro* testom s kalifornijskom pastrvom. Inicijalnim testom određeno je da CA model precizno predviđa estrogenski efekt poznatih smjesa. Problem u korištenju tog modela nastao je kao posljedica nepotpunog znanja o kemijskom sastavu ispitivane smjese iz okoliša te ograničenja uzrokovanih nesigurnošću u točnost podataka unesenih u model. [46] Ge i suradnici (2010.) pomoću CA modela predvidjeli su hormetičke učinke ionskih tekućih smjesa na aktivnost enzima luciferaze. Ispitali su učinke četiri smjese i sve su pokazale dobro slaganje između opaženih efekata i onih predviđenih CA modelom. Zbog toga su zaključili da je CA model dobar kao zadani model za kombinirani efekt molekula na molekulskom nivou. [47] Puckowski i suradnici 2017. godine ispitali su toksičnost smjese veterinarskih lijekova flubendazola i fenbendazola testom uz *D. magnu*. Zaključili su da smjesa ova dva lijeka izaziva efekt koji je u skladu s predviđenim uz pomoć CA modela. Uz pomoć izobolograma odredili su da smjesa pokazuje sinergistički efekt. [48]

Tanaka i Tada (2017) proširili su CA model predloživši generalizirani aditivni model (eng. *Generalized Concentration Addition model*, GCA). Ovaj model omogućava zbrajanje doprinosa različitih tvari s različitim oblicima odziva. Temelji se na pretpostavkama da smjesa nema jednako pravilo toksične interakcije (eng. *toxic interaction rule*) kao i pojedine komponente te da se koncentracija svake komponente može preoblikovati u ekvitoksičnu vrijednost (skalarna koncentracija bez dimenzije) u funkciji odgovora za dodavanje komponente. GCA je opisan jednadžbom (9).

$$R_{\text{MIX}}(c) = f \left[ \left( \sum_{i=1}^n \left( \frac{c_i}{EC_{x,i}} \right)^{\frac{\beta_i}{\beta_M}} \right)^{\beta_M} \right] \quad (9)$$

$R_{\text{MIX}}$  je funkcija ( $f$ ) odziva smjese, ovisna o stvarnoj koncentraciji  $c$ , efektivnoj koncentraciji  $EC_x$  na razini  $x$ , te koeficijentu nelinearnosti odziva  $\beta$  za pojedinu komponentu  $i$  odnosno smjesu  $M$ . Iako ovaj model pokazuje bolje rezultate od klasičnog CA modela, zbog zahtijeva funkcije koncentracija-odgovor barem jedne komponente smjese nije prikladan model za predviđanje toksičnosti smjesa. [49]

### 3.2. Model neovisnog djelovanja

Model neovisnog djelovanja (eng. *independent action*, IA) predložio je Bliss 1939. godine, a temelji se na pretpostavci da svaka komponenta smjese ima različit mehanizam djelovanja te neovisno djeluje na organizam. IA model je inicijalno razvijen za određivanje postotka smrtnosti organizama. Vjerojatnost da će organizam preživjeti izloženost toksičnoj tvari koncentracije A ili B označava se s  $P_S(c_A)$ , odnosno  $P_S(c_B)$ . Pod pretpostavkom da su te vjerojatnosti statistički neovisne jedna o drugoj, tada se zajednička vjerojatnost,  $P_S(c_A, c_B)$ , ili  $P_S(c_{MIX})$  ( $c_{MIX} = c_A + c_B$ ) računa kao:

$$P_S(c_A, c_B) = P_S(c_{MIX}) = P_S(c_A) \cdot P_S(c_B) \quad (10)$$

S obzirom da se najčešće prati smrtnost ispitanih organizama logično je zamijeniti vjerojatnost preživljavanja,  $P_S$ , s vjerojatnosti umiranja,  $P_D$ . Pri tome je vjerojatnost umiranja od zajedničke ekspozicije:

$$P_D(c_{MIX}) = 1 - P_S(c_{MIX}) \quad (11)$$

$$P_D(c_{MIX}) = 1 - P_S(c_A) \cdot P_S(c_B) \quad (12)$$

$$P_D(c_{MIX}) = 1 - [1 - P_D(c_A)] \cdot [1 - P_D(c_B)] \quad (13)$$

Ova se jednadžba može generalizirati za smjesu s  $n$  komponentata:

$$P_D(c_{MIX}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - P_D(c_i)] \quad (14)$$

Iako je IA model inicijalno razvijen kao model za analize kao što su analiza smrtnosti i preživljavanja, uspješno je primijenjen i u studijama stupnjevitog odgovora:

$$E_{MIX} = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (15)$$

gdje je  $E_{MIX}$  očekivani efekt,  $n$  broj komponentata smjese, a  $E(c_i)$  je efekt koji  $i$ -ta komponenta smjese izaziva ukoliko je primijenjena sama s koncentracijom  $c_i$ . [50]

IA model često je korišten te ga je moguće pronaći u različitim literaturama ispitivanja toksičnosti. Nys i suradnici (2015) ispitivali su reproduktivnu toksičnost binarnih i tercijarnih smjesa nikla, cinka i olova na *C. dubia*. Zaključili su da IA model najbolje opisuje opaženu toksičnost, bolje od CA modela. Dobivene rezultate usporedili su s rezultatima istog testa s *D. magna* pri čemu su zaključili da su opaženi efekti drugačiji, iako se radi o organizmima iz iste obitelji (Daphniidae). [51] Silva i suradnici 2019. godine ispitali su kako dugoročna izloženost na pesticid karbendiazim utječe na *D. magna* prilikom interakcije s drugom tvari (triklosan) ili kada se te dvije tvari nalaze u smjesi. Test se radio kroz nekoliko generacija organizama (njih

12) kako bi se bolje otkrio utjecaj pesticida na populaciju. Korišten je IA model jer način djelovanja karbendiazima i triklosana na porodicu *Daphnia* nije poznat te je, zbog različitih molekulskih struktura, pretpostavljen različit mehanizam djelovanja. [52]

### 3.3. Integrirani modeli

Prethodno opisani aditivni model i model neovisnog djelovanja najčešće su korišteni za modeliranje toksičnosti. Njihov nedostatak je u tome što funkcioniraju pod pretpostavkom da sve komponente smjese imaju isti model djelovanja, odnosno različit model djelovanja. S obzirom da su realne smjese sastavljene od različitih tvari čiji su mehanizmi djelovanja kompleksniji te za razne toksične tvari mehanizmi djelovanja nisu poznati, CA i IA modeli se ne mogu primijeniti za predviđanje njihovog djelovanja. Kako bi se riješio taj problem razvijeni su i testirani modeli koji kombiniraju CA i IA model. Junghans (2004) je predložio predviđanje mehanizma djelovanja smjesa kombinacijom CA i IA modela, odnosno dvostupnjevitim predviđanjem (eng. *two-stage prediction*, TSP). U prvom stupnju TSP modela komponente smjese dijele se u grupe, pri čemu su mehanizmi djelovanja komponenata u pojedinoj grupi isključivo slični. Na temelju toga vidljivo je da se ovaj stupanj zasniva na CA modelu. Nakon grupiranja određuje se toksičnost svake grupe. U drugom stupnju TSP modela IA model se koristi za integriranje predviđenih efekata svake grupe iz prvog stupnja. Zaključeno je da je kombinacija CA i IA modela u TSP model dobar pristup jer daje točne pretpostavke o toksičnosti smjese u slučaju kada se njene komponente mogu podijeliti u različite grupe na temelju mehanizma njihovog djelovanja. [53]

Olmstead i LeBlanc (2005) predložili su još jedan integrirani model kombiniranjem CA i IA modela [54]. Povezali su CA i IA jednadžbe:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x,i}} = 1 \quad (16)$$

$$EC_{50,MIX} = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - EC_{50}(c_i)] \quad (17)$$

kako bi dobili jednadžbu modela:

$$EC_{50,MIX} = 1 - \prod_{i=1}^n \left\{ 1 - \frac{100}{1 + \left[ \sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{50,i}} \right]^{-p'}} \right\} \quad (18)$$

gdje je  $EC_{50,MIX}$  toksičnost smjese,  $EC_{50,i}$  koncentracija tvari  $i$  koja uzrokuje 50% ispitivanog efekta,  $c_i$  koncentracija  $i$ -te tvari, a  $p'$  srednja vrijednost nagiba krivulja koncentracija-odziv svih komponenata u smjesi. Ispitivanje su provodili na smjesi koja se sastojala od 9 različitih tvari praćenjem toksičnog efekta izazvanog na *D. magna*. Smjese su podijeljene u različite grupe, ovisno o njihovom mehanizmu djelovanja. Inhibitori enzima acetilkolinesteraze (diazinon, klorpirifos i karbaril) stavljeni su u istu grupu. Preostale tvari stavljene su svaka u svoju grupu zbog različitih mehanizama djelovanja. Izračunata je zajednička toksičnost tvari u pojedinoj grupi pomoću CA modela, a za sve grupe zajedno toksičnost je izračunata pomoću integriranog modela. Iz jednadžbe (18) izračunata je toksičnost smjese ( $EC_{50,MIX}$ ) za dvije različite razine osjetljivosti:  $EC_5$  i  $EC_{50}$ . Za obje razine rezultati su pokazali dobru preciznost u predviđanju toksičnosti za jako osjetljivu i najmanje osjetljivu razinu toksičnosti smjesa. Ra i suradnici (2006) ispitali su Junghansov dvostupnjski model na kompliciranim smjesama prisutnim u otpadnim vodama u postrojenjima za njihovo tretiranje. Smjesa se sastojala od 10 komponenata, a test je izvedem pomoću *D. magna*. Komponente su raspoređene u 3 različite grupe: inhibitori acetilkolinesteraze, inhibitori narkoze i inhibitori korijena sadnica. Izvedena su dva različita testa toksičnosti. Prvi je bio test pomoću CA modela za jednostavne smjese istih mehanizama djelovanja i zatim je IA model bio primijenjen. Drugi test je bio pomoću TSP modela za smjese sličnog ili različitog mehanizma djelovanja. Iz rezultata je bilo vidljivo da je TSP model vrlo dobar za predviđanje toksičnosti, dok su CA i IA modeli pokazali različite vrijednosti pri mjerenju toksičnosti. Iz toga je zaključeno da je TSP model dobar za predviđanje toksičnost nasumičnih smjesa s različitim načinima djelovanja ako je poznata funkcija koncentracija-odgovor za pojedinačne komponente. [55] Qin i suradnici (2011) predložili su integrirani CA model s IA modelom na temelju modela višestruke linearne regresije (eng. *Integrated Concentration addition with Independent action based on the multiple linear regression Model*, ICIM). Model je prikazan jednadžbom (19).

$$\log EC_{x,MIX,exp} = b_0 + b_1 \log \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x,i}} \right)^{-1} + b_2 \log \left( E(EC_{x,MIX}) - 1 + \prod_{i=1}^n (1 - f_i(p_i EC_{x,MIX})) \right) \quad (19)$$

$EC_{x,MIX,exp}$  je eksperimentalno određena koncentracija smjese koja izaziva  $x\%$  efekta,  $p_i$  je omjer množinske koncentracije  $i$ -te komponente i efektivne ( $EC_{x,i}$ ) koncentracije koja bi izazivala isti efekt kao i smjesa,  $E(EC_{x,MIX})$  je efekt koji izaziva efektivna koncentracija smjese  $EC_{x,MIX}$ , a  $f_i$

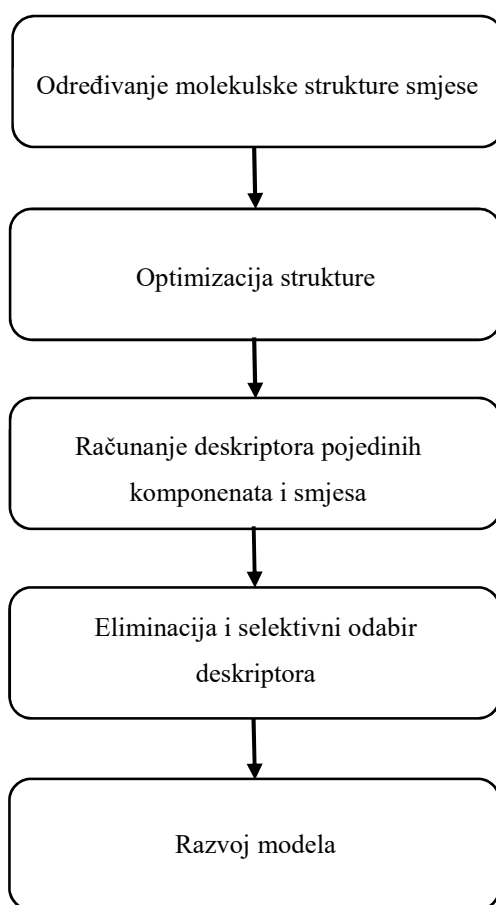
je Weibullova funkcija raspodjele za komponentu *i*. Kako bi se ispitala točnost predviđanja toksičnosti ovog modela korištena su dva seta podataka. Prvi set podataka sastojao se od 13 smjesa po 9 komponentata. 10 smjesa korištenih za obuku kreirano je uz korištenje fiksnog omjera koncentracije, a preostale tri smjese, korištene za validaciju, kreirane su na temelju fiksnog ekvivalenta toksičnog efekta. Drugi set podataka sastojao se od 6 smjesa po 6 komponentata. Četiri smjese korištene za obuku kreirane su pomoću fiksnog omjera koncentracije, a preostale dvije, korištene za validaciju, na temelju fiksnog ekvivalenta toksičnog efekta. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da ICIM model jako dobro predviđa toksičnost smjesa, bolje nego CA i IA modeli. Nadalje, zaključeno je i da je ICIM model precizan za sve testirane razine učinaka (5-90%). [56]

Iz navedenih pristupa razvoju integriranih modela vidljivo je da imaju dosta toga zajedničkog. Većina modela kreće od formiranja grupa smjesa prema njihovoj toksičnosti te se zatim za svaku grupu računa njena toksičnost uz pomoć aditivnog modela. Nakon toga koristi se model neovisnog djelovanja za integriranje te toksičnosti grupa kako bi se predvidjela ukupna toksičnost smjesa s različitim mehanizmima toksičnosti. Većina integriranih modela predstavlja poboljšanje u predviđanju toksičnosti. Osnovni nedostatak ovih modela je što zahtijevaju informacije o toksičnom djelovanju svake komponente smjese. Nadalje, primjena ovih modela ograničena je na smjese kod kojih ne dolazi do sinergizma i antagonizma. Osim toga, noviji integrirani modeli uvode parametre koje je potrebno računati pojedino za svaku komponentu, što primjenu tih modela čini složenijom i dugotrajnijom u usporedbi s konvencionalnim modelima (CA i IA). [41]

### 3.4. QSAR modeli

S intenzivnim razvojem računalnih tehnologija u posljednjih nekoliko desetljeća promijenile su se i mogućnosti prikupljanja, analiziranja, pohranjivanja i širenja informacija. Shodno tome razvile su se i razne računalne metode za ispitivanje novih tvari i pohranjivanja njihovih informacija u razne baze podataka. Modeli kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) zasnivaju se na pretpostavci da struktura molekule sadrži značajke odgovorne za njena fizikalna, kemijska i biološka svojstva. [57] Svi QSAR modeli izravno ili neizravno impliciraju načelo sličnosti pri čemu se očekuje da spojevi slične strukture imaju slične biološke aktivnosti. [58] Dakle, primjenom QSAR modela biološka aktivnost (ili reaktivnost, svojstva, itd.) nove ili netestirane tvari može se odrediti na temelju podataka o molekulskoj strukturi "slične" tvari čija su svojstva poznata i ispitana. Za

razvoj QSAR modela potrebne su tri komponente: baza podataka s izmjerenim eksperimentalnim vrijednostima biološke aktivnosti ili svojstava već testiranih tvari, podaci o molekulskim strukturama i/ili svojstvima za ispitivane tvari (deskriptori) te statističke (kemometrijske) metode koje će validirati povezanost ispitivane tvari i baze podataka o svojstvima ispitanih tvari. [57] Razvoj modela započinje određivanjem molekulske strukture ispitivane smjese. Kako bi se kemijska struktura optimizirala koriste se različite metode molekulske mehanike i poluempirijske kvantne metode. One opisuju elektronska i geometrijska svojstva molekula te njihove međusobne interakcije.



Slika 6. Shematski prikaz razvoja QSAR modela

Nakon optimizacije strukture računaju se molekularni deskriptori svih komponenata, a zatim smjesa, što rezultira opsežnom matricom molekulskih svojstava i odgovora (prethodno određeni toksični učinak). Deskriptori su opisani kao niz brojčanih veličina koje se koriste za opisivanje molekulske strukture. Zbog prevelikog broja mogućih deskriptora za uključivanje u model potrebno je neke od njih eliminirati. Broj molekulskih deskriptora smanjuje se tako što se eliminiraju deskriptori koje nije moguće računati za sve smjese, koji variraju vrlo malo ili



uopće ne variraju te deskriptori koji koreliraju međusobno (ako je vrijednost linearne korelacije  $R \geq 0,99$ ). Zatim se deskriptori selektivno odabiru numerički uz dvije metode: analiza glavnih komponenata i genetički algoritam. Model se razvija tako što se generiraju jednadžbe koje povezuju vrijednosti deskriptora s određenim odgovorom ( $y$ ) [41]:

$$y = f(\text{molekulski deskriptor}) \quad (20)$$

Na slici 6 prikazan je shematski prikaz procesa razvijanja QSAR modela.

### 3.4.1. Molekulski deskriptori

Kemijske strukture mogu se opisati velikim brojem molekulskih deskriptora koji se definiraju kao kemijske karakteristike u formi brojeva. Za izgradnju QSAR modela koristi se samo nekoliko važnih deskriptora koji se selektivno odabiru. Mogu biti topološki, geometrijski, konstitucijski, fizikalno-kemijski elektronski, i termodinamički.

Topološki deskriptori su 2D deskriptori koji opisuju raspored atoma unutar smjese. Daju informacije o veličini molekule, obliku, grananju, prisutnosti heteroatoma i višestrukih veza u numeričkom obliku. Imaju značajnu ulogu u modeliranju raznih fizikalno-kemijskih svojstava, bioloških aktivnosti i farmakokinetičkih svojstava.

Geometrijski deskriptori računaju se iz 3D koordinata atoma u pojedinim molekulama. U usporedbi s topološkim deskriptorima imaju veću moć razlikovanja sličnih kemijskih struktura i konformacija molekula. Također uključuju i informacije dobivene iz atomskih van der Waalsovih područja i njihovog preklapanja na površini molekule. Ovi deskriptori zahtijevaju optimizaciju kemijske strukture.

Konstitucijski deskriptori su jednostavni i najčešće korišteni, a opisuju molekularni sastav spoja bez ikakvih informacija o njegovoj topologiji. Konstitucijski deskriptori su broj atoma, broj veza, vrsta atoma, broj prstena i molekulska masa.

Fizikalno-kemijski deskriptori opisuju fizička i kemijska svojstva molekula koja se mogu odrediti iz 2D strukture. Ovi deskriptori imaju veliku ulogu pri određivanju koncentracije toksične tvari u organizmu te imaju veliku ulogu pri otkrivanju lijeka optimizacijom odabranih spojeva.

Elektronski deskriptori koriste se za opisivanje elektronskih svojstava molekule ili atoma, dok se termodinamički deskriptori koriste za povezivanje kemijske strukture i opaženog djelovanja molekule. [59]

### 3.4.2. Deskriptori smjesa

Kako bi se pomoću QSAR modela mogla odrediti toksičnost smjese potrebni su dobro osmišljeni deskriptori. Razvijeno je nekoliko jednadžbi u kojima se računa reprezentativna vrijednost deskriptora smjese,  $D_{\text{MIX}}$ , koji je mjera doprinosa svake komponente smjese sveukupnoj toksičnosti smjese. Najčešće korištena jednadžba je:

$$D_{\text{MIX}} = \sum_{i=1}^n x_i D_i \quad (21)$$

pri čemu je  $x_i$  molarni udio komponente  $i$  u smjesi, a  $D_i$  je molekularni deskriptor  $i$ -te komponente. [41]

Poznata su četiri tipa deskriptora smjese: deskriptori temeljeni na koeficijentu raspodjele smjese, integralni aditivni deskriptori, integralni ne aditivni deskriptori i fragmentirani ne aditivni deskriptori. [60]

### 3.4.3. Selektivni odabir deskriptora

Odabir deskriptora vrlo je bitan jer korištenje samo nekoliko deskriptora povećava razumijevanje modela, može smanjiti rizik prekomjernog prilagođavanja te pružiti brže i jeftinije modele. Osnovne metode za selektivni odabir deskriptora su analiza glavnih komponentata i genetički algoritam.

#### *Analiza glavnih komponentata*

Analiza glavnih komponentata (eng. *principal component analysis*, PCA) dobro je poznata tehnika analize i smanjenja podataka. PCA pri razvoju QSAR modela analizira izvornu matricu podataka u kojoj su molekule opisane pomoću deskriptora. Generiraju se nove varijable koje se nazivaju glavne komponente (eng. *principal components*, PC). PC su linearne kombinacije izvornih deskriptora sortirane tako da objašnjavaju što je više moguće varijanci (mjera disperzije koja uzima u obzir širenje svih podatkovnih točaka u skupu podataka) izvornih podataka. Jedna od najvažnijih osobina PC-a je da svaki ima različite informacije o promjenjivosti izvornih deskriptora. Važno je napomenuti da PCA model nije primjenjiv ukoliko veza između deskriptora nije linearna. [61]

#### *Genetički algoritam*

Genetički algoritam (eng. *genetic algorithm*, GA) je jedna od najčešće korištenih metoda za rješavanje kompleksnih problema optimizacije. Ovu metodu razvio je J. Holland te

se u području kemije koristi od 70-tih godina prošlog stoljeća. GA se koristi za reduciranje velikog skupa značajki na manji skup koji se lako može povezati s molekularnim svojstvom ili biološkom aktivnosti od interesa. GA je stohastička metoda koja simulira evolucijske strategije koje su prisutne u prirodnim sustavima za rješavanje problema optimizacije. Pri rješavanju problema tijekom razvijanja QSAR metode, GA izvodi nasumično pretraživanje u velikom broju molekulskih deskriptora. Ova metoda stimulira evoluciju populacije tako da svaki pojedinac u populaciji predstavlja podskup deskriptora koji se definira binarnim nizom koji se naziva kromosomom. Kromosom ima toliko gena koliko set ima deskriptora. Prilikom prirodne selekcije samo najjače jedinke preživljavaju jer sadrže najbolju kombinaciju gena i pri tome su druge jedinke uklonjene iz populacije. Jedinke koje su preživjele dalje se razmnožavaju pri čemu potomci imaju nove i bolje karakteristike od roditelja. Prema tom principu odvija se selekcija deskriptora pri čemu su samo najznačajniji deskriptori uzeti u obzir te iz njih proizlaze još značajnije kombinacije deskriptora. [62]

### **3.5. Primjena umjetne inteligencije u predviđanju toksičnosti**

U posljednje vrijeme sve se više razvija umjetna inteligencija, što se pozitivno reflektiralo i na razvoj metoda za predviđanje toksičnosti. Umjetna inteligencija (eng. *artificial intelligence*) definirana je kao sposobnost stroja kontroliranog računalom da odrađuje zadatke povezane s inteligentnim bićima, odnosno da strojevi sadrže intelektualne karakteristike kao ljudi. Pri tome je omogućeno prepoznavanje uzoraka, predviđanje i donošenje odluka. [63] Umjetna inteligencija sve se više koristi za predviđanje toksičnosti jer omogućuje točnije metode za određivanje potencijalnih toksičnih učinaka novih smjesa od tradicionalnih metoda, jeftinija je, zahtijeva kraće vrijeme testiranja i etičnija je jer ne koristi žive organizme u početnim stadijima istraživanja. Različita istraživanja temelje se na korištenju različitih algoritama strojnog učenja (eng. *machine learning*, ML) i dubinskog učenja (eng. *deep learning*, DL) kako bi se analizirale baze podataka i informacije o toksičnosti te identificirali potencijalni toksični učinci tvari. Strojno učenje je tip umjetne inteligencije koji koristi algoritme za učenje iz postojećih podataka, identificiranje obrazaca i daljnje predviđanje. Može analizirati velike količine podataka i procijeniti potencijalno toksične učinke lijekova u razvoju prije nego što se testiraju na ljudima. Za određivanje toksičnosti lijekova pomoću ML algoritma koriste se različite metode kao što su RT (eng. *random forests*), DT (eng. *decision trees*), k-NN (eng. *k-nearest neighbor*) i SVM (eng. *support vector machines*). Dubinsko učenje je područje ML-a koje koristi neuronske mreže (matematički modeli koji simuliraju funkcioniranje

ljudskog mozga) za učenje iz postojeće baze podataka. ML algoritmi imaju jednostavnu strukturu, kao što je linearna regresija, dok se DL temelji na kompleksnim umjetnim neuronskim mrežama te zbog toga zahtijeva veću količinu podataka i više računalne snage. DL modeli koriste se za predviđanje toksičnosti lijekova i vrlo su efektivni za određivanje toksičnosti smjese. Često korišteni DL modeli uključuju DNN (eng. *deep neural networks*), RNN (eng. *recurrent neural networks*), CNN (eng. *convolutional neural networks*), GNN (eng. *graph neural network*), GCNN (eng. *graph convolutional neural networks*) i GAT (eng. *graph attention network*).

Pri korištenju umjetne inteligencije za određivanje toksičnosti odabir baze podataka je vrlo važan jer kvaliteta i raznolikost podataka mogu imati bitan utjecaj na rad modela predviđanja. Kada se odabire baza podataka za predviđanje toksičnosti uz umjetnu inteligenciju potrebno je uzeti u obzir: raznolikost podataka (omogućuje generalizaciju modela na nove smjese), pristranost podataka (sistematske greške u podacima koje mogu dovesti do netočnih zaključaka), stanje podataka (moraju biti uravnoteženi između pozitivnih i negativnih toksičnosti), anotaciju podataka (točno označeni podaci), mogućnost skaliranja podataka (podaci moraju biti skalirani kako bi se lakše obradila velika količina podataka), dostupnost podataka (podaci moraju biti dostupni u digitalnom formatu), integraciju podataka (dostupni podaci moraju se moći integrirati s drugim bazama podataka) te obradu podataka (uklanjanje pogrešaka koje mogu utjecati na model). [64]

Korištenje umjetne inteligencije za modeliranje toksičnosti razvilo se u posljednjih nekoliko godina. S daljnjim razvojem tehnologije omogućit će se i razvoj ovakvog predviđanja toksičnosti čime će se smanjiti vrijeme potrebno za analizu, broj korištenih živih organizama te potrebni novčani resursi za istraživanje i razvoj lijekova.

## 4. Statističke metode u studijama toksičnosti

Studije toksičnosti izvode se s ciljem određivanja toksičnog utjecaja tvari na različite organizme, a informacije koje se prikupljaju ovise o području primjene tvari i razlogu izvođenja studije. Potrebno je odabrati statističku metodu prikladnu za obradu prikupljenih podataka o ispitivanoj tvari. Općenito, više statističkih metoda analize može se koristiti za obradu različitih vrsta prikupljenih podataka, ali bitno je naglasiti da upotreba različitih metoda može dovesti do različitih zaključaka za isti set podataka. Zato je bitno u potpunosti razumjeti mehanizam statističkih metoda i odrediti koja je optimalna za analizu prikupljenih podataka.

Ovisno o dizajnu i svrsi studije toksičnosti odabire se jedna od trenutno dostupnih statističkih metoda analize. Uz pretpostavku ovisnosti o dozi, usporedbe s kontrolnom grupom provode se Williamsovim testom (neparametarski test: Shirley test), u slučajevima gdje se ne očekuje ovisnost o dozi usporedbe se provode Dunnettovim testom (neparametarski test: Steel test), sve moguće parne usporedbe među grupama provode se Tukeyjevim testom (neparametarski test: Steel-Dwass test), a ukoliko je fokus stavljen na nekoliko specifičnih usporedbi među skupinama može se koristiti prilagođeni Bonferroni test, odnosno Studentov  $t$ -test (neparametarski test: Wilcoxonov test). [65]

Podaci se opisuju mjerenjem središnje tendencije i disperzije (raspršenja). Mjere središnje tendencije su aritmetička sredina (prosjeak varijabli), medijan (vrijednost koja se nalazi u sredini popisa podataka) i mod (vrijednost koja se najčešće pojavljuje). Na temelju asimetrije distribucije varijabli određuje se koja je od ovih mjera najprikladnija za korištenje. S obzirom na to da je aritmetička sredina, koja je najčešće korištena, posebno osjetljiva bolja mjera za središnju tendenciju je medijan. Pri opisu disperzije koriste se standardna devijacija (SD) i srednja vrijednost standardne pogreške (eng. *standard error mean*, SEM). SD je mjera varijabilnosti pojedinačnih vrijednosti, dok SEM predstavlja preciznost srednjih vrijednosti uzorka. Ove dvije vrijednosti mogu se povezati kao:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{\text{veličina uzorka}}} \quad (22)$$

iz čega je vidljivo da vrijednost SEM-a opada kako veličina uzorka raste.

Kada se provodi inferencijalna statistika (mjerenja se provode na uzorcima, a ne na populaciji) testira se nulta hipoteza. Ona pretpostavlja da ne postoji statistički bitna razlika između ispitivanih skupina te se potvrđuje ili odbacuje statističkim testovima. Ako pretpostavke o normalnosti nisu zadovoljene, mjere središnje tendencije i disperzije ne mogu se primijeniti te je potrebno razmotriti korištenje neparametarske statističke metode. [66]

Statističke metode se dijele na parametarske i neparametarske. Parametarske metode zahtijevaju da oblik raspodjele podataka slijedi simetričnu normalnu distribuciju (Gaussova krivulja), a neparametarske metode ne zahtijevaju pretpostavku o obliku raspodjele podataka i prikladne su za obradu podataka koji ne slijede normalnu distribuciju. Iz toga slijedi da upotreba neparametarskih metoda ima veliku prednost jer ne ovisi o obliku distribucije, te čak i kada je distribucija blizu normalnoj pokazuju vrlo dobru učinkovitost. Veliki nedostatak neparametarskih metoda je u tome što dolazi do velikog pogoršanja izvedbe kada je broj uzorka po ispitivanoj skupini malen (manje od 7). Dakle, pri studijama toksičnosti koje se izvode na velikim organizmima (gdje je broj ispitivanih organizama manji od 5) ne mogu se koristiti neparametarske metode. Kako bi se odredilo treba li metoda biti parametarska ili neparametarska može se koristiti preliminarni test, kao što je Bartlettov test koji se koristi za procjenu hipoteze o homogenosti varijance. Ako je ona značajna koristi se neparametarska metoda, a ako nije odabire se parametarska statistička metoda. Izbor parametarske ili neparametarske metode treba biti temeljen na oblicima raspodjele podataka koji se mogu istražiti upotrebom dijagrama okvira (eng. *box plot*) ili dijagrama raspršenosti (eng. *scatter plot*). Odstupanje od normalne distribucije prikazuje se izračunavanjem sumarne statistike, kao što je asimetrija.

Ukoliko se statistički test primjeni samo jednom moguće je nastalu pogrešku pripisati slučajnosti i zanemariti jer je manja od razine značajnosti. Međutim, kada se istovremeno provodi više statističkih testova u jednoj studiji povećava se vjerojatnost da je slučajnost značajna što predstavlja problem korištenja više statističkih testova odjednom. Kada se prilikom istraživanja provede nekoliko usporedbi među ispitivanim grupama problem višestrukih analiza rješava se tako što se cijeli niz promatra kao jedna analiza pri čemu se vjerojatnost da je pogreška slučajna povećava i značajnost slučajnosti smanjuje. Ova se statistička metoda naziva višestrukim usporedbama, a postoji nekoliko vrsta ovih metoda ovisno o kombinaciji skupina koje se uspoređuju. Tipične metode višestruke usporedbe su Bonferronijev, Dunnettov, Tukeyjev i Williamsov test. Prije višestruke usporedbe provodi se analiza varijance (ANOVA). ANOVA je generička statistička metoda koja rastavlja sveukupnu varijancu na zasebne elemente te se pomoću nje otkriva jesu li razlike između grupa podataka statistički značajne. ANOVA metodom se analizira razina varijance među grupama kroz uzorke preuzete iz svake grupe pomoću  $F$ -testa. Ovaj test je zapravo omjer dviju varijanci, primjerice za jednosmjerni ANOVA test (uspoređuje srednje vrijednosti interesnih skupina, testira nultu hipotezu) računa se kao omjer varijacija između srednjih vrijednosti uzorka i varijacija unutar uzoraka. [65, 67, 68]

## 4.4. Studentov $t$ -test

Ovaj test razvio je W. S. Gosset 1908. godine pod pseudonimom Student, zbog čega se i naziva Studentov  $t$ -test. To je statistička metoda testiranja hipoteze o značajnosti razlike između dva uzorka na temelju aritmetičke sredine njihovih podataka. Ovaj test zapravo služi za testiranje nul-hipoteze pri čemu je ona potvrđena ukoliko  $t$ -test pokaže da razlika među aritmetičkim sredinama nije statistički značajna, a ukoliko se pokaže da je ona značajna nul-hipoteza se odbacuje. [69]

Veličina uzoraka određuje vjerojatnost da je aritmetička sredina uzoraka ista aritmetičkoj sredini populacije. Kako se veličina uzoraka smanjuje dolazi do više nesigurnosti vezano uz točnost vrijednosti aritmetičke sredine što otežava statističku analizu. Studentov test prvi je koji rješava ove probleme pri izvođenju statističkih kalkulacija, a koristi se SEM tehnika.

S obzirom na nesigurnosti kada su veličine uzoraka male, pri određivanju statističke značajnosti u obzir se mora uzeti razlika između aritmetičkih sredina, raspršenost podataka (standardna devijacija) i veličina uzorka. Kod Studentovog  $t$ -testa ovi su koncepti povezani u jednu jednadžbu koja računa  $t$ -vrijednost iz koje se može odrediti statistička značajnost:

$$t = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (23)$$

pri čemu je  $t$  statistička vrijednost proporcionalna vjerojatnosti da je razlika između aritmetičkih sredina značajna. Što je ona veća to je veća i vjerojatnost da je ta razlika značajna.  $\mu_1$  i  $\mu_2$  predstavljaju srednje vrijednosti uzorka koji se promatra.  $\sigma$  je standardna devijacija dviju grupa, a ovaj test se temelji na pretpostavci da obje grupe imaju istu standardnu devijaciju. Iz jednadžbe (23) vidljivo je da se vrijednost  $t$  povećava kako se standardna devijacija smanjuje. Broj podataka u svakoj grupi opisuje se s  $n$ . [70]

Prema odnosu među skupinama podataka vezanih za dva uzorka koriste se dva različita oblika  $t$ -testa. Provedba  $t$ -testa dvaju uzoraka primjenjuje se kada su skupine podataka dva ispitivana uzorka statistički neovisne jedna o drugoj. Kako bi se ovaj oblik mogao koristiti potrebno je pretpostaviti da su podaci oba uzorka normalno raspodijeljeni i da imaju iste varijance. Upareni  $t$ -test koristi se kada se podaci ispitivanih uzoraka nalaze u uparenoj formi. Za ovu vrstu testa potrebno je samo da su razlike svakog para podataka normalno raspodijeljene. [71]

Ukoliko je došlo do zaključka da se  $t$ -test ne može koristiti kako bi se podaci ispravno procijenili, koristi se neparametarska statistička metoda.

#### 4.4.1. Wilcoxonov test

Ako podaci dvaju ispitivanih uzoraka ne prate normalnu distribuciju umjesto  $t$ -testa koristi se neparametarski test: Wilcoxonov test. Ovaj test predložio je F. Wilcoxon 1945. godine. Test ima dvije različite verzije: Wilcoxonov test sume rangova te Wilcoxonov test rangova s predznakom. [72]

##### *Wilcoxonov test sume rangova*

Wilcoxonov test sume rangova (eng. *rank-sum test*) koristi se za usporedbu dvije grupe podataka čiji podaci nemaju normalnu distribuciju. Ovo je neparametarska metoda Studentovog  $t$ -testa dvaju uzoraka. Podaci u obje grupe uređuju se i poredaju po uzlaznoj veličini, a zatim svaki broj u dvije grupe dobiva rang tako da se kreće od najmanjeg broja koji ima rang 1.0. Svaki od stupaca rangova (po jedan za svaku grupu podataka) zbraja se te se računa vrijednost:

$$\frac{(n)(n+1)}{2} \quad (24)$$

pri čemu  $n$  označava broj podataka u obje grupe. Dobivene vrijednosti uspoređuju se s onima već prije određenim rangovima te se određuje je li razlika statistički značajna.

Ovaj test često se naziva i Mann-Whitney U test, koji zapravo predstavlja proširenu verziju Wilcoxonova testa sume rangova. Umjesto usporedbe podataka korištenjem jednadžbe (24) uvodi se vrijednost  $U$  koja se računa za kontrolnu grupu ( $U_k$ ) i za testnu grupu ( $U_t$ ):

$$U_t = n_k n_t + \frac{n_t(n_t + 1)}{2} - R_t \quad (25)$$

$$U_k = n_k n_t + \frac{n_t(n_t + 1)}{2} - R_k \quad (26)$$

gdje su  $n_k$  i  $n_t$  veličine uzoraka za kontrolnu i testnu grupu, a  $R_k$  i  $R_t$  su vrijednosti zbrojeva rangova za kontrolnu i testnu grupu. [73]

##### *Wilcoxonov test rangova s predznakom*

Wilcoxonov test rangova s predznakom (eng. *signed-rank test*) predstavlja neparametarski test koji se koristi za analizu podataka uparenih parova ili za problem jednog uzorka. Ovaj test je neparametarska verzija Studentovog uparenog  $t$ -testa. Kod uparenih parova koristi se za testiranje hipoteze da je vjerojatnost distribucije prvog uzorka jednaka vjerojatnosti distribucije drugog uzorka. Nulta hipoteza ovog testa je da skup različitih parova ima



distribuciju vjerojatnosti sa središtem u nuli. Ključna pretpostavka je da razlike proizlaze iz kontinuirane simetrične distribucije.

Ako se primjerice provodi test mjerenja krvnog tlaka osoba prije i poslije režima vježbanja, zapisuju se izmjerene vrijednosti prije ( $x_i$ ) i poslije ( $y_i$ ) provođenja testa. One se oduzimaju jedna od druge pri čemu se dobiva vrijednost  $d_i$  ( $d_i = y_i - x_i$ ) nakon čega se određuje standardna vrijednost  $|d_i|$ . Te vrijednosti rangiraju se po veličini od najmanje do najveće i svakom rangu dodaje se znak + ili –, ovisno o tome je li originalna vrijednost razlike bila pozitivna ili negativna. Vrijednosti sa znakom + zbrajaju se pri čemu je njihova suma jednaka  $T_+$ , a suma vrijednosti sa znakom – jednaka je  $T_-$ . Kada postoji  $n$  razlika, ove dvije vrijednosti u zavisnosti su prema [74]:

$$T_- = \left\{ \frac{[n(n+1)]}{2} \right\} - T_+ \quad (27)$$

## 4.2. Tukeyjev test

J. Tukey osmislio je test kojim se koriste nezavisne P-vrijednosti za određivanje korisnosti hipoteze višestrukih varijabli. Taj test je prema njemu nazvan Tukeyjevim testom, također zvan testom iskrene značajne razlike (eng. *honest significant difference*, HSD). Ovim testom uspoređuju se aritmetičke sredine vrijednosti umjesto njihovih parova. Test se provodi nakon ANOVA testa koji može odrediti samo postoji li statistički značajna razlika među podacima, dok se Tukeyjevim HSD testom može odrediti koje su specifične grupe aritmetičkih sredina različite. Može se objasniti jednadžbom:

$$q = \frac{\bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min}}{\sqrt{\frac{MS_W}{n}}} \quad (28)$$

pri čemu su  $x_{\max}$  i  $x_{\min}$  najveća, odnosno najmanja srednja vrijednost,  $n$  je veličina pojedine grupe uzoraka, a  $MS_W$  je vrijednost dobivena iz ANOVA testa. Ako vrijedi da je  $q > q_{\text{kritično}}$  zaključuje se da su dvije aritmetičke sredine značajno različite te se odbacuje nulta hipoteza. Taj test ekvivalentan je:

$$\bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min} > q_{\text{kritično}} \sqrt{\frac{MS_W}{n}} \quad (29)$$

Tukeyjev test je tzv. *post hoc* test, što znači da se usporedbe među varijablama rade nakon što su podaci već prikupljeni. Osnovne pretpostavke ovog testa su da su promatranja

neovisna unutar skupina i između njih, grupe su za svaku aritmetičku sredinu normalno raspoređene te da postoji jednaka varijanca u svakoj grupi unutar svih grupa i povezana je sa svakom aritmetičkom sredinom u testu (homogenost varijance). [75-77]

### **4.3. Williamsov test**

Williamsov test je test višestruke usporedbe koji se primjenjuje u parametarskim analizama nakon što analiza varijance pokaže da postoji razlika. Velika prednost ovog testa je što uzima u obzir redoslijed skupina prema rastućoj (ili padajućoj) koncentraciji prilikom njihove usporedbe, što povećava osjetljivost testa. Koristan je statistički alat u toksikologiji jer pruža informacije o dokazima toksičnosti, a i o razini doze koja uzrokuje toksičnost. Vrlo je dobar za određivanje najniže opažene efektivne koncentracije.

Test se odvija postupno, a započinje usporedbom srednjih vrijednosti učinaka izazvanih na organizam prvorangiranog uzorka (npr. uzorak s najvećom koncentracijom) s učinkom kontrolnog uzorka. Zatim se isto radi sa sljedećim uzorkom, sve dok se ne pronađe razlika. Prema tome, test utvrđuje najnižu koncentraciju povezanu sa značajnim učinkom ispitivane tvari u skupini. Osim što test pretpostavlja da su podaci normalno raspoređeni i homogeni, bitno je da je niz ispitivanih vrijednosti monoton, odnosno da je svaka iduća srednja vrijednost učinaka na organizam manja ili jednaka, ili pak veća ili jednaka prethodnom učinku. U slučaju nepravilnosti u nizu vrijednosti postoji postupak zaglađivanja koji dodjeljuje istu srednju vrijednost učinaka dvjema vrijednostima koje odstupaju u seriji. Ovakav ispravak inače se može ponavljati više puta ako je potrebno, ali prilikom ispitivanja toksičnosti to nije preporučeno jer bi pojedina skupina mogla izgubiti na važnosti prilikom ispitivanja.

Zahtjevi ovog testa su da učinci moraju biti približno normalno raspoređeni, varijance unutar koncentracija moraju biti jednake, a opažanja moraju biti neovisna. Ti zahtjevi moraju biti ispunjeni već za prethodnu ANOVA metodu. Ako nisu ispunjeni koristi se neparametarski oblik ovog testa, Shirleyev test. [78]

#### **4.3.1. Shirleyev test**

Shirleyev test paralelan je s parametarskim Williamsovim testom i uzima u obzir poredak koncentracija prema rastućem (ili padajućem) redoslijedu. Koristi se za usporedbu učinaka ispitivanih tvari s kontrolnom grupom, ali za razliku od Williamsovog testa ne prethodi mu postupak testiranja hipoteze, odnosno ne koristi se neparametarski analog ANOVA testa.

Pretpostavlja da se učinci monotonno smanjuju, a ako ne, izglađuju se istim postupkom kao u Williamsovom testu. Veličina uzoraka mora biti pet ili više.

Grupe podataka rangiraju se prema stupnju učinaka korištenjem srednjih vrijednosti učinaka u kontrolnim i ispitivanim skupinama. I kontrolni i ispitivani učinci rangiraju se u istom nizu (prema koncentracijama). Postupak radi na osnovi broja rangova. Rang najveće koncentracije ispitivane tvari uspoređuje se s onim kontrolne grupe. Ako je razlika značajna usporedba se nastavlja sa sljedećom, nižom, koncentracijom dok se ne pronađe nikakva razlika. [78]

#### 4.4. Dunnettov test

Dunnettov test je standardni test koji uspoređuje srednje vrijednosti svakog ispitivanog učinka sa srednjom vrijednosti učinka kontrolne grupe. Za razliku od Williamsovog testa nema poretka podataka, a također se kontrolira razlika i pogreška cijelog eksperimenta (svih skupova podataka zajedno) između ispitivane i kontrolne grupe umjesto da se isto prati na parovima podataka. Test je prikladan za usporedbu ispitivane s kontrolnom grupom kada ne postoji intrinzični redoslijed podataka, odnosno ne očekuje se gradijent. Snaga ovog testa opada kako se broj testiranih grupa povećava.

Za izvođenje testa potrebna je normalna distribucija podataka, a on zapravo predstavlja proširenje Studentovog  $t$ -testa. Obično je postavljen u računalnim programskim paketima za izvođenje jednostranog testa značajnosti koji odgovara očekivanoj situaciji da će sva mjerenja u ispitivanim koncentracijama ići u istom smjeru kao i mjerenja izvođena na kontrolnoj grupi. Dunnettov test daje konzervativne rezultate (tendencija neuočavanja razlika) za normalne jednostrane testove, a primjenjuje se na eksperimente koji imaju jednak broj promatranja pri svakom testu. [78, 79] Dunnettovim testom ispituje se da li je zadovoljen kriterij:

$$|\bar{x}_j - \bar{x}_0| > t_d \sqrt{\frac{2MS_w}{n}} \quad (30)$$

pri čemu je  $n$  broj ispitivanih grupa,  $\bar{x}_0$  srednja vrijednost kontrolne grupe,  $\bar{x}_j$  srednja vrijednost ispitivane grupe  $j$ ,  $MS_w$  je vrijednost iz ANOVA testa, a  $t_d$  je Dunnettova kritična vrijednost. [80]

## 5. Zaključak

U ovom radu prikazan je pregled kemometrijskih pristupa u analizi toksičnosti potencijalno štetnih supstanci. Dana je definicija toksičnosti, kao i temeljna podjela toksičnih tvari. Iz priloženog je vidljivo da se toksičnost pojedinih tvari određuje pomoću živih organizama kao što su bakterije, kvasci, biljke i ribe. Informacije dobivene ovim testovima koriste se za procjenu rizika toksičnih smjesa i za predviđanje mogućih toksičnih efekata pomoću razvijenih kemometrijskih metoda.

Kroz dosadašnju primjenu, kemometrijske metode pokazale su se vrlo prikladnima za analizu toksičnosti supstanci, posebice smjesa, upravo zbog njihove brzine, efikasnosti, etičnosti i ekonomičnosti. S daljnjim razvojem računala doći će i do sve većeg razvoja kemometrijskih metoda, posebice QSAR metoda. S obzirom na sve veću upotrebu umjetne inteligencije nedvojbeno je da će se ona sve više pojavljivati i u analizi toksičnosti sa sve većom preciznošću.

## 6. Literatura

1. P. L. Williams, Statistical methods for toxicology, u S. R. Wilson, C. J. Burden (ur.) Biometrics. Vol. 2, Eolss Publishers, Oxford, UK, 2009, str. 194-223.
2. D. Arome, E. Chinedu, The importance of toxicity testing, J. Pharm. Biosci. 4 (2013) 146-148.
3. J. Kim, S. Kim, G. E. Schumann, Reliable predictive computation toxicology methods for mixture toxicity: toward the development of innovative integrated models for environmental risk assessment, Rev. Environ. Sci. Bio-Technol. 12 (2013) 235-256.
4. K. Héberger, Chemoinformatics–multivariate mathematical–statistical methods for data evaluation u K. Vekey, A. Telekes, A. Vertes (ur.) Medical Application of Mass Spectrometry. 1. izd, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2008, str. 141-169.
5. <https://biologydictionary.net/toxicity/> (pristup 16.5.2023.)
6. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1540-toxicity> (pristup 16.5.2023)
7. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45911> (pristup 16.5.2023.)
8. L. J. Casarett, J. Doull, Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7. izd., McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, SAD, 2008.
9. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GSH), 4. izd., Ujedinjeni narodi, New York i Geneva, 2011.
10. <https://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/cis/products/safetytm/toxic.htm> (pristup 11.6.2023.)
11. [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What\\_Are\\_EC10,\\_NOEC,\\_LOEC\\_and\\_MATC\\_in\\_Ecotoxicity\\_and\\_How\\_to\\_Use\\_Them\\_in\\_Risk\\_Assessment.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What_Are_EC10,_NOEC,_LOEC_and_MATC_in_Ecotoxicity_and_How_to_Use_Them_in_Risk_Assessment.html) (pristup 11.6.2023.)
12. <https://www.era-environmental.com/blog/acute-toxicity-estimate-hazard-classification> (pristup 11.6.2023.)
13. R. D. Combes, Progress in Development, Validation and Regulatory Acceptance of *In Vitro* Methods for Toxicity Testing, u J. Reedijk (ur.) Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2013, str. 1-25.

14. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test Guide No. 452: Chronic Toxicity Studies, Pariz, Francuska, 2018.
15. EPA Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine organisms, 4. Izd., U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), Washington, DC, SAD, 2002.
16. D. G. Christensen, K. L. Visick, *Vibrio fischeri*: laboratory cultivation, storage, and common phenotypic assays. *Curr. Protoc. Microbiol.* 57 (2020) e103.
17. S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.* 32 (2006) 265-268.
18. A. R. Silva, C. Sousa, D. Exner, R. Schwaiger, M. M. Alves, D. Y. Petrovykh, L. Pereira, pH-Induced Modulation of *Vibrio fischeri* Population Life Cycle, *Chemosensors* 9 (10) (2021) 283.
19. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission on *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-2:2007).
20. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission on *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria (ISO 11348-2:2007).
21. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission on *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria (ISO 11348-2:2007).
22. A. Tkaczyk, A. Bownik, J. Dudka, K. Kowal, B. Ślaska, *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review, *Sci. Total Environ.* 763 (2021) 143038.
23. G. Persoone, R. Baudo, M. Cotman, C. Blaise, K. Cl. Thompson, M. Moreira-Santos, B. Vollat, A. Törökne, T. Han, Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs, *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 393 (2009) 01.

24. S. Chamorro, L. Hernández, K. Saéz, G. Gómez, G. Vidal, Effects of Black Liquor Shocks on the Stability of Activated Sludge Treatment of Kraft Pulp Mill Effluent: Morphological Alteration in *Daphnia magna* and Mutagenicity and Genotoxicity Response in *Salmonella typhimurium*, *Sustainability* 14 (7) (2022) 3869.
25. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test (ISO 6341:2012).
26. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test Guide No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, Pariz, 2004.
27. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test Guide No. 211: *Daphnia magna* reproduction test, Pariz, 2012.
28. <https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/> (pristup 14.6.2023.)
29. L. Rumlova, J. Dolezalova, A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for rapid detection of toxic substances in water, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2012) 459-464.
30. L. Rumlova, J. Dolezalova, A new biological test of water toxicity – yeast *Saccharomyces cerevisiae* conductometric test, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38 (2014) 977-981.
31. J. E. Taraldsen, T. J. Norberg-King, New Method for Determining Effluent Toxicity Using Duckweed (*Lemna minor*), *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 761-767.
32. S. Radić, D. Stipaničev, P. Cvjetko, M. Marijanović Rajčić, S. Širac, B. Pevalek-Kozlina, M. Pavlica, Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 182-187.
33. J. Park, E. Yoo, K. Shin, S. Depuydt, W. Li, K.-J. Appenroth, A. D. Lillicrap, L. Xie, H. Lee, G. Kim, J. De Saeger, S. Choi, G. Kim, M. T. Brown., T. Han, Interlaboratory Validation of Toxicity Testing Using the Duckweed *Lemna minor* Root-Regrowth Test, *Biology* 11 (37) (2022) 37.
34. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Revised Proposal for a New Guideline 221, *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, Pariz, 2002.
35. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Zebrafish> (pristup 17.6.2023.)

36. Y. Jang, Y. Hur, J. Lee, Anti-Inflammatory Activity of the Active Compounds of *Sanguisorbae Radix* in Macrophages and *In Vivo* Toxicity Evaluation in Zebrafish, *Cosmetics* 6 (4) (2019) 68.
37. OECD Guidelines fo the Testing of Chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Pariz, 2013.
38. G. Carlsson, J. Patring, J. Kreuger, L. Norrgren, A. Oskarsson, Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Aquat. Toxicol.* 126 (2013) 30-41.
39. T. Neuparth, A. D. Correia, F. O. Costa, G. Lima, M. H. Costa, Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: 1. Biochemical endpoints, *Mar. Environ. Res.* 60 (2005) 69-91.
40. T. Neuparth, A. D. Correia, F. O. Costa, G. Lima i M. Helena Costa, Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: 2. Organism and population-level endpoints, *Mar. Environ. Res.* 60 (2005) 93-110.
41. M. Sigurnjak Bureš, M. Cvetnić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, M. Markić, H. Kušić, T. Bolanča, M. Rogošić, Š. Ukić, Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 1629-1655.
42. European Commission, Directorate-General for Health and Consumers, Toxicity and assessment on chemical mixtures (2011)
43. R. Altenburger, M. Nendza, G. Schüürmann, Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (8) (2003) 1900-1915.
44. N. Cedergreen, A. M. Christensen, A. Kamper, P. Kudsk, S. K. Mathiassen, J. C. Streibig, H. Sørensen, A Review of Independent Action Compared to Concentration Addition as Reference Models for Mixtures of Compounds with Different Molecular Target Sites, *Environ. Toxicol. Chem.*, 27 (7) (2008) 1621-1632.
45. K. A. Heys, R. F. Shore, M. G. Pereira, K. C. Jones, F. L. Martin, Risk assessment of environmental mixture effects, *RSC Adv.* 6 (2016) 47844-47857.



46. K. L. Thrope, M. Gross-Sorokin, I. Johnson, G. Brighty, C. R. Tyler, An Assessment of the Model of Concentration Addition for Predicting the Estrogenic Activity of Chemical Mixtures in Wastewater Treatment Work Effluents, *Environmental Health Perspectives* 114 (1) (2006) 90-97.
47. H. Ge, S. Liu, X. Zhu, H. Liu, L. Wang, Predicting Hormetic Effects of Ionic Liquid Mixtures on Luciferase Activity Using the Concentration Addition Model, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1623-1629.
48. A. Puckowski, S. Stolte, M. Wagil, M. Markiewicz, P. Łukaszewicz, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220 (3) (2017) 575-582.
49. Y. Tanaka, M. Tada, Generalized concentration addition approach for predicting mixture toxicity, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (1) (2016) 265-275.
50. T. Bachaus, Å. Arrhenius, H. Blanck, Toxicity of a Mixture of Dissimilarly Acting Substances to Natural Algal Communities: Predictive Power and Limitations of Independent Action and Concentration Addition, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 6363-6370.
51. C. Nys, C. R. Janssen, R. Blust, E. Smolders, K. A. C. De Schamphaelaere, Reproductive Toxicity of Binary and Ternary Mixture Combinations of Nickel, Zinc and Lead to *Ceriodaphnia dubia* is Best Predicted with the Independent Action Model, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (7) (2016) 1796-1805.
52. A. R. Silva, D. N. Cardoso, A. Cruz, S. Mendo, A. M. V. M. Soares, S. Loureiro, Long-term exposure of *Daphnia magna* to carbendiazim: how it affects toxicity to another chemical or mixture, *Environ. Pollut. Res.* 26 (16) (2019) 16289-16302.
53. M. Junghans, Studies on combination effects of environmentally relevant toxicants, Validation of prognostic concepts for assessing the algal toxicity of realistic aquatic pesticide mixtures. Disertacija, Universität Bremen, Bremen, Njemačka, 2004.
54. A. W. Olmstead, G. A. LeBlanc, Toxicity Assessment of Environmentally Relevant Pollutant Mixtures Using a Heuristic Model, *Integ. Environ. Assess. Manag.* 1 (2) (2005) 114-122.

55. J. S. Ra, B. C. Lee, N. I. Chang, S. D. Kim, Estimating the combined toxicity by two-step prediction model on the complicated chemical mixtures from wastewater treatment plant effluents, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (8) (2006) 2107-2113.
56. L. Qin, S. Liu, J. Zhang, Q. Xiao, A novel model integrated concentration addition with independent action for the prediction of toxicity of multi-component mixture, *Toxicology* 280 (2011) 164-172.
57. P. Gramatica, On the Development and Validation of QSAR Models u B. Reisfeld, A. N. Mayeno (ur.) *Computational Toxicology*, Vol. 2, Humana Press, Totowa, New Jersey, SAD, 2013, str. 499-526.
58. A. Tropsha, Best Practises for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation, *Mol. Inf.* 29 (2010) 476-488.
59. Danishuddin, A. U. Khan, Descriptors and their slection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design, *Drug Discov. Today* 21 (8) (2016) 1291-1302.
60. E. N. Muratov, E. V. Varlamova, A. G. Artemenko, P. G.. Polishchuk, V. E. Kuz'min, Existing and Developing Approaches for QSAR Analysis of Mixtures, *Mol. Inform.* 31 (3-4) (2012) 202-221.
61. C. Yoo, M. Shahlaei, The applications of PCA in QSAR studies: A case study of CCR5 antagonists, *Chem. Biol. Drug Des.* 91 (1) (2018) 137-152.
62. J. C. Sung, M. A. Hermsmeier, Genetic Algorithm Guided Selection: Variable Selection and Subset Selection, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42 (4) (2002) 927-936.
63. <https://www.britannica.com/technology/artificial-intelligence> (pristup 2.7.2023.)
64. T. T. V. Tran, A. Surya Wibowo, H. Tayara, K. T. Chong, Artificial Intelligence in Drug Toxicity Prediction: Recent Advances, Challenges, and Future Perspectives, *J. Chem. Inf. Model.* 63 (9) (2023) 2628-2643.
65. C. Hamada, Statistical analysis for toxicity studies, *J. Toxicol. Pathol.* 31 (2018) 15-22.
66. J. Na, H. Yang, S. Bae, K. Lim, Analysis of Statistical Methods Currently used in Toxicology Journals, *Toxicol. Res.* 30 (3) (2014) 185-191.

67. <https://www.qualtrics.com/experience-management/research/anova/> (pristup 7.7.2023.)
68. <https://blog.minitab.com/en/adventures-in-statistics-2/understanding-analysis-of-variance-anova-and-the-f-test> (pristup 8.7.2023.)
69. <https://www.britannica.com/science/Students-t-test> (pristup 8.7.2023.)
70. E. H. Livingston, Who Was Student and Why Do We Care So Much about His *t*-Test?, *J. Surg. Res.* 118 (2004) 58-65.
71. M. Xu, D. Fralick, J. Z. Zheng, B. Wang, X. M. Tu, C. Feng, The differences and similarities between two-sample *t*-test and paired *t*-test, *Shanghai Arch. Psychiatry* 29 (3) (2017) 184-188.
72. <https://www.investopedia.com/terms/w/wilcoxon-test.asp> (pristup 9.7.2023.)
73. C. G. Rousseaux, S. C. Gad, Statistical Assessment of Toxicologic Pathology Studies u W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig (ur.) Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Vol. 2, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 2013, str. 893-988.
74. R. F. Woolson, Wilcoxon Signed-Rank Test u R. D'Agostino, L. Sullivan, J. Massaro Wiley Encyclopedia of Clinical Trials. Vol. 1, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, SAD, 2008.
75. <https://sciencing.com/calculate-point-biserial-correlation-7303303.html> (pristup 9.7.2023.)
76. <https://real-statistics.com/one-way-analysis-of-variance-anova/unplanned-comparisons/tukey-hsd/> (pristup 9.7.2023.)
77. <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/statistics-definitions/post-hoc/tukey-test-honest-significant-difference/> (pristup 9.7.2023.)
78. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Method Development and Applications Section, Environmental Technology Centre, Environment Canada (2005)
79. K. Kobayashi, K. Sadasivan Pillai, A Handbook of Applied Statistics in Pharmacology. 1. izd., CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 2012.

80. <https://real-statistics.com/one-way-analysis-of-variance-anova/unplanned-comparisons/dunnetts-test-2/> (pristup 13.7.2023.)

## Životopis

Klara Zrinski [REDACTED] Svoje obrazovanje započela je u Osnovnoj školi „Gustav Krklec“ u Zagrebu, a nastavlja ga upisom na opći smjer X. Gimnazije „Ivan Supek“ kojeg završava 2019. odličnim uspjehom. Iste godine upisuje se na preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjeluje na CeSaR projektu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradila je u laboratoriju za istraživanje i razvoj tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o.