

STATE OF THE CONDITION OF ALTERNATIVE SIMULATION OF AN ESTIMATION OF PARAMETER OF SKIN IRRITATING OPERATING (REVIEW)

Voloschenko O.I., Payetska O.V., Yalovenko O.I.

СУЧАСНИЙ СТАН АЛЬТЕРНАТИВНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ОЦІНКИ ПОКАЗНИКА ШКІРНО-ПОДРАЗНЮВАЛЬНОЇ ДІЇ

Н

**ВОЛОЩЕНКО О.І.,
РАЄЦЬКА О.В.,
ЯЛОВЕНКО О.І.**
ДУ "Інститут гігієни
та медичної екології
ім. О.М. Марзєєва
АМН України",
м. Київ

УДК: 615.8:57.08 615.9(64 +
665.58)

Необхідною умовою надходження парфумерно-косметичної продукції на споживчий ринок є підтвердження безпечності при застосуванні згідно з призначенням, що задекларовано Директивою 76/768/ЄЕС (у законодавстві ЄС) та ДСанПін 2.2.9.027-99 (у законодавстві України) [1, 2]. Водночас Директива 2003/15/ЄС [3] вимагає поступової відмови від досліджень на тваринах найближчим часом (остаточно з 2009 р.) як таких, що суперечать сучасним вимогам біоетики. Така категоричність у постановці проблеми вимагає повної ревізії стану питання та відбору найбільш прийнятних альтернативних методів для проходження всіх етапів валідації та регламентації у рамках ЄС та ОЕСР (Організації економічного співробітництва та розвитку), що здійснюється компетентними організаціями COLIPA (Європейською асоціацією з косметики, засобів особистої гігієни та парфумерії), SCCNFP (Науковим комітетом з косметичних та непродовольчих продуктів, призначених для споживача в ЄС) і ECVAM (Європейським центром з валідації альтернативних методів досліджень) [4-6]. Для більшості косме-

тичних засобів основний шлях надходження до організму — нанесення на шкіру та її додатки, тому визначення подразнювальності дії засобу, його інгредієнтів на шкіру є найважливішим токсикологічним параметром при оцінці безпечності даної категорії продукції, і вибір альтернативних моделей для заміни традиційного методичного підходу з його оцінки є одним з пріоритетних.

Мета роботи: проаналізувати стан альтернативного моделювання дослідження показника шкірно-подразнювальності дії та виявити основні шляхи вирішення проблеми заміни традиційних підходів в оцінці даного показника токсикометрії на альтернативні.

Згідно зі стандартизованим методом первинний потенціал подразнення шкіри оцінюють за ступенем прояву еритеми та набряку шкіри тварини після одноразового перкутанного нанесення речовини на 4 години, який був запропонований Draize, удосконалений, сертифікований та регламентований у рамках ЄС та ОЕСР — метод OECD TG 404 [7]. Враховуючи вимоги біоетики, метод було доповнено стратегією поетапної оцінки, за якою необхідність кожного послідовного етапу зумовлена даними, отриманими у попередньому:

□ не проведення експерименту за методом Draize у випадку, коли рН засобу менше 2 або більше 11,5;

□ не проведення експерименту за методом Draize у випадку, якщо субстанція спричиняла корозію в одному з альтернативних корозійних тестів.

Основними кроками у розвитку методичних підходів щодо оцінки подразнювальності

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЯ КОЖНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР)

Волощенко О.И., Раецкая Е.В., Яловенко Е.И.

Проанализирована методическая база альтернативного моделирования оценки показателя кожно-раздражающего действия. Отмечена возможность использования *in vitro* моделей для выявления способности веществ вызывать необратимые повреждения кожи и отсутствие альтернативных методов исследования, дающих результаты, адекватные данным, полученным традиционным OECD TG 404. На сегодня в практике изучения кожно-раздражающего действия рекомендуется применять поэтапную стратегию оценки с использованием на скрининговом этапе методов *in vitro* и подтверждением полученных данных с конкретизацией степени выраженности эффекта *in vivo*.

го потенціалу засобів були подальша розробка, пошук, удосконалення, валідація, регламентація альтернативних методів, здатних частково чи цілком замінити традиційний метод *in vivo*. Враховуючи, що методи QSAR на сьогодні можуть мати лише прогнозує значення для деяких груп хімічних речовин, основну увагу сконцентрували на удосконаленні наявних сучасних *in vitro* моделей: і простих, і складних. Альтернативні методи оцінювали за двома напрямками:

□ відбір методів, які могли б виявляти подразнення/корозію шкіри;

□ відбір методів, які здатні показувати ступінь подразнення шкіри (встановлені критерії оцінки для кожного методу мають відповідати загальноприйнятим критеріям оцінки в умовах *in vivo*) [8, 9].

Перший напрямок є першочерговим завданням і спрямований на пошук методів для скринінгового етапу дослідження, другий — підтвердження ефекту подразнення з встановленням ступеня його прояву. Моделі, на яких виявляють корозійні властивості засобів, пропонують використовувати на початковому етапі досліджень для виведення з подальшого експерименту сильно подразнювальних речовин.

Корозія шкіри — це подразнення такої великої сили, яке не залишає можливості регенерації пошкодженої ділянки шкіри (некроз епідермісу, дерми). Переважна більшість косметичних засобів не здатна спричинити таку пошкоджувальну дію, але деякі інгредієнти проявляють подібну активність, тому існує необхідність встановити дозу речовини, за якої цей ступінь подразнення не проявляється. В

експериментах на тваринах цей показник оцінюється тим же методом, що і подразнення шкіри згідно з OECD TG 404. На даний момент два альтернативних методи були внесені у Додаток V Директиви небезпечних речовин 67/548/ЄЕС [10] для оцінки цього показника та у сучасну стратегію оцінки показника подразнення шкіри, яка передбачає використання *in vivo* та *in vitro* моделей.

Для оцінки корозійного потенціалу шкіри пропонують використовувати 2 методи, які валідовані ECVAM та прийняті OECPR [11, 12]:

□ the *in vitro* skin corrosion rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) test, заснований на реєстрації електричного опору ізольованої ділянки шкіри щура, що культивується в умовах *in vitro*, за дії речовини (TG 430) [11];

□ реконструйовані моделі еквіваленту епідермісу людини EPISKIN та EpiDerm, здатні реєструвати процеси життєздатності шкіри людини за життєздатністю клітин у культурі, (TG 431) [12-15]. EPISKIN — тримірна модель шкіри людини, яка являє собою бичачий колагеновий матрикс, покритий колагеном людини, розшарованим диференційованими кератиноцитами людини другого пасажу. Життєздатність клітин оцінюють за МТТ випробуванням (спектрофотометричним методом оцінки проліферації клітин з використанням барвника жовтого 3-(4,5-диметилазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій-бромиду), оцінкою активності клітин епідермісу за вивільненням цитокіну (інтерлекіну 1(IL-1) та визначенням цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (LDH) [12, 13]. EpiDerm представлена реконструйованими кератиноцитами людини, що зростають на спеціально виготовленому живильному культуральному середовищі. Оцінка токсичної дії речовини реєструється тільки за різницею між часом, необхідним для зменшення клітин у культурі на 50%, з експозицією речовини, що досліджується, та контрольної [12, 14-15].

У США для оцінки корозійної здатності прийнято тест

Corrositex, який виявляє пенетрацію речовин крізь гідровану колагенову матрицю, є мембранним фільтром. Використовується тільки для оцінки кислот, основ та їхніх похідних, поки що рекомендований для розгляду, але ще не прийнятий ЄС законодавством [16].

Для реєстрації подразнювальної дії засобів запропоновано деякі методи оцінки корозійної здатності засобів: EPISKIN, EpiDerm та інші моделі. Всі альтернативні моделі, за допомогою яких можна оцінити подразнювальний потенціал, поділяють на

□ моделі реконструйованої шкіри людини;

□ шкірні експлантати та культури органів;

□ методи QSAR (кількісна оцінка взаємодії "структура — активність").

Моделі реконструйованої шкіри людини є штучно створеними. Вони подібні шкірі людини, частіше тримірні, основними клітинами яких є зростаючі кератиноцити різних стадій диференціювання, що культивуються на різних субстратах на поверхні розподілу двох фаз "повітря — рідина" [17-19]. Деякі з них вже досягли рівня комерційного виробництва (EPISKIN, EpiDerm, The SkinEthic), інші потребують доопрацювання (the *inhouse* Cosmital model, (PCP) *in vitro*, RE-DED model тощо). Розглянуті вище EPISKIN, EpiDerm вже офіційно визнані, регламентація SkinEthic моделі — на стадії валідаційних випробувань, (PCP) *in vitro* — на етапі превалідаційних випробувань.

SkinEthic модель, розроблена M. Rosdy і L. Clauss [20], являє собою культуру нормальних кератиноцитів людини, що зростають на полікарбонатному живильному середовищі на поверхні розділу двох фаз — "повітря — рідина", моделює постійно зростаючу шкіру людини на межі розділу двох фаз. Модель рекомендують використовувати при оцінці ефекту одноразової аплікації і планують доопрацювати у напрямку випробування повторних доз, але процедура виконання ще потребує ретельної доробки. Оцінка ефекту подразнення реєструється за визначен-

ням життєздатності клітин, виділення інтерлікіну 1 (IL-1) та морфологічними змінами клітин у культурі [20, 21].

Методи із застосуванням моделей EPISKIN, EpiDerm, The SkinEthic показують високу кореляцію з методом *in vivo*, але можуть бути використані для виявлення подразнювального ефекту тільки при одноразовій аплікації і не дають адекватної характеристики ступеня прояву ефекту подразнення повною мірою.

Метод визначення клітинної проникності (PCP) *in vitro*, розроблений Pfaller і Troppmair, заснований на оцінці пошкодження епідермального бар'єру за параметрами TER (трансепідермальна резистентність) і трансепітеліальний транспорт маленьких молекул типу FITC-inulin (PCP). Речовини наносять на клітини, що засіяні на 24-рівневій пластині полікарбонатного фільтру. Бар'єрне ушкодження оцінюється за вимірюванням TER і PCP, які є і прогностичними показниками нефротоксичності. Впровадження методу знаходиться на етапі превалідації. Він може бути використаний для оцінки одноразових ушкоджень різних типів епітелію без адекватної (традиційної) характеристики ступеня виявлення ушкодження [22].

Шкірні експлантати та культури органів — моделі більш високого рівня конструювання. Вони утворені з експлантів шкіри ссавців або людини, функціонування яких підтримується у живильному середовищі *in vitro*.

The Mouse Skin Integrity Function Test (SIFT) є трансплантамом шкіри миші у модельному середовищі, відображає біохімічні процеси живої шкіри, має високу репродукційну здатність, міцні бар'єрні властивості. Оцінка цілісності рогового шару здійснюється вимірюванням параметрів трансепідермальної втрати води (TEWL) та електричного опору шкіри (ER). Перкутанна абсорбція хімічних речовин після експозиції продукту оцінюється за різницею показників TEWL та ER до та після аплікації. Але метод має низьку міжлабораторну відтворюваність. Значення TEWL і ER ви-

мірюють лише у вузькому діапазоні реєстрації подразнення [23-26].

Prediskin модель — це модель культури шкіри людини, яка отримана при пластичній хірургії від пацієнта і культивується *in vitro*. Засоби, що досліджуються, наносяться на шкіру на 20 годин, відсоток життєздатних клітин у культурі оцінюють за МТТ дослідженням. При зменшенні життєздатних клітин у культурі нижче 35% провадять гістологічні дослідження для виявлення характеру пошкодження. Її недоліком є занадто висока чутливість, яка спричиняє велику кількість псевдопозитивних результатів, тому випробовування поки що має обмежене прогностичне значення [23-24].

The Pig Ear Test являє собою модель вуха свині, що культивується *in vitro*. Реєстрація подразнення заснована на визначенні абсолютного збільшення TEWL поверхні шкіри вуха після експозиції речовини, але варіабельність отриманих результатів була занадто велика, тому випробовування матиме поки що обмежене прогностичне значення [23-24].

У програмі дослідження методів оцінки шкірно-подразнювального показника, прийнятою COLIPA, відзначено, що моделі, утворені із шкірних експлантів, та культури органів, як і моделі реконструйованої шкіри людини, потребують доробки у напрямку пошуку більш механізованих критеріїв оцінки, модернізації самої моделі для досягнення більшої адекватності природним умовам, ідентифікації специфічних біомаркерів подразнення при залученні методів молекулярної біології та генної інженерії. Сучасні методи не готові

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

для оцінки впливу багаторазових аплікацій засобу та ступеня прояву подразнювальної дії і можуть бути рекомендовані для використання на скринінговому етапі досліджень у комплексі батареї тестів *in vitro* [27].

Розроблений нами "Спосіб оцінки цитотоксичної дії засобів на основі поверхнево-активних речовин" пропонує застосовувати як *in vitro* моделі короткострокову суспензійну культуру еритроцитів, передбачає оцінку гемолітичної дії засобу на еукаріотичну клітину (еритроцит), оцінку відсотка денатурації гемоглобіну у клітинній культурі та розрахунок інтегрального показника Kc (коефіцієнта цитотоксичності), що враховує результати обох досліджень та показує ступінь цитотоксичної дії засобу. Спосіб придатний для оцінки тільки косметичних засобів на основі ПАР [28]. Проведені порівняльні дослідження розробленим способом та традиційним методом дослідження шкірно-подразнювальної дії *in vivo* показали, що даний метод при використанні на скринінговому етапі досліджень дозволяє розділити засоби на

□ такі, що однозначно не спричиняють шкірно-подразнювальну дію (при $Kc > 10$) і дослідження на тваринах можна не провадити;

□ такі, що потенційно здатні спричинити шкірно-подразнювальну дію (при $10 < Kc < 0$), тобто дослідження на тваринах необхідні;

□ препарати спричиняють шкірно-подразнювальну дію (при $Kc < 0$), тобто для підтвердження наявності ефекту дослідження на тваринах можна не провадити.

Розробка кількісних методів математичного моделювання

STATE OF THE CONDITION OF ALTERNATIVE SIMULATION OF AN ESTIMATION OF PARAMETER OF SKIN IRRITATING OPERATING (REVIEW)

Voloschenko O.I., Payetska O.V., Yalovenko O.I.

Methodical base of alternative simulation of an estimation of a parameter of skin irritating operating is parsed. Possibility of using in vitro of models for detection of capacity of matters to

call skin corrosion and absence of alternate method of testing adequate conventional OECD TG 404 is marked. Today in practice of analysis of a parameter of skin irritating operating it is recommended to apply an installment (step by step) a strategies of an estimation with usage on scrining a stage of methods in vitro and endorsement of the obtained data by concretization of a degree of an expressiveness of effect in vivo.

при використанні комп'ютерного програмування (in silico) оцінки взаємозв'язку структури та активності (методи QSAR) речовин для виявлення подразнювальної (корозійної) здатності речовин, засобів є перспективним напрямком наукового аналізу та узагальнення результатів досліджень. Але вони можуть використовуватися тільки на етапі прогнозування подразнювальної активності речовини і вимагають ретельної доробки, оскільки розраховані на вузький спектр речовин подібної хімічної будови (методи M. Barratt, H. Hayashi і співавторів, M. Smith та співавторів тощо) [29-31].

Існує низка інших альтернативних методів оцінки подразнювальної дії, але ми приділили увагу тим, які найбільш близькі до впровадження у практику санітарно-гігієнічних досліджень, є чи можливо будуть найближчим часом загально визначеними.

Висновки

Аналіз та узагальнення стану інформаційної та експериментальної бази альтернативного моделювання методу визначення показника шкірно-подразнювальної дії показує, що

□ незважаючи на широкий спектр існуючих альтернативних біологічних моделей жодна з них не може замінити тестування на тваринах при дослідженні показника шкірно-подразнювальної дії у повному обсязі, тому запропоновано вводити поетапну стратегію оцінки, яка враховує використання in vitro та in vivo методів, що зменшує використання тварин в експериментальних дослідженнях (урахування вимог біоетики) і прискорює темпи їх виконання;

□ альтернативні методи для оцінки корозії шкіри валі-

довано і прийнято ЄС (Додаток V Директиви 67/548/ЄЕС) і на рівні ОЕСР (TG 430 і TG 431) і можуть замінити традиційні підходи з оцінки цього показника;

□ оцінку шкірно-подразнювального потенціалу рекомендовано провадити у два етапи: перший — визначення рН та корозійної здатності in vitro, другий — проведення досліджень in vitro та in vivo засобів, подразнювальний ефект яких не встановлено на першому етапі. Моделі EPISKIN, EpiDerm та The Mouse Skin Integrity Function Test (SIFT) є найбільш перспективними при визначенні подразнювальної дії речовин для класифікації та маркування (подразнювальні / неподразнювальні);

□ на сучасному етапі впровадження альтернативні методи дослідження можуть бути запропоновані тільки при оцінці подразнення при одноразовій аплікації для констатації наявності ефекту, не враховуючи ступінь його прояву та повторну (багаторазову) експозицію;

□ більшість in vitro методів показує велику варіабельність показників та не відтворює увесь можливий діапазон прояву даного критерію;

□ для визначення ступеня подразнення при багаторазовому нанесенні необхідно провадити подальші дослідження у напрямку створення більш адекватної природним умовам механізованої моделі, ідентифікації нових маркерних генів подразнювальної дії. Інформація щодо виявлення біомаркерів є ключовою для повної оцінки ризику і нині може бути отримана тільки з експериментів на тваринах та з даних щодо подразнення шкіри на волонтерах;

□ при удосконаленні мате-

матичного моделювання прогнозування ризику подразнення використання моделей QSAR на початковому етапі проведення досліджень дозволить більш обґрунтовано планувати програму досліджень, що зумовить адекватний вибір батареї in vitro моделей для випробувань;

□ для оцінки подразнювальної дії косметичних засобів, серед яких більше 80% не повинні спричиняти подразнення шкіри, застосування in vitro методів виявлення засобів, які однозначно не подразнюють шкіру, значно спрощує випробування, скорочує кількість експериментальних тварин та собівартість досліджень, тому створення поетапної стратегії оцінки показника шкірно-подразнювальної дії при залученні на скринінговому етапі досліджень таких in vitro методів є перспективним напрямком розвитку методичної бази державної санітарно-епідеміологічної експертизи косметичних засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. EC. Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products // Official Journal of the European Communities. — 1976. — L262. — P. 169-200.

2. Державні санітарні правила і норми безпеки продукції парфумерно-косметичної промисловості: ДСанПін 2.2.9.027-99 / МОЗ України. — К., 1999. — 42 с.

3. EU. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products // Official Journal of the

European Union. — 2003. — L66. — P. 26-35.

4. New from ECVAM // NCA — Newsletter. — 2004. — № 17. — C. 13.

5. Rossignol M.R. 1.1. The 7-th Amendment to the Cosmetics Directive // ATLA. — 2005. — Vol. 33. — P. 19-20.

6. Safety Data Requirements for the Purposes of the Cosmetics Directive / I. Manou, C. Eskes, O. de Silva et al. // ATLA. — 2005. — Vol. 33. — P. 21-26.

7. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 404: Acute Dermal Irritation / Corrosion / Organisation for Economic Cooperation and Development. — Paris, France. — 2002. — 13 p.

8. Fentem J.H., Botham P.A. ECVAMs activities in validating alternative tests for skin corrosion and irritation // ATLA. — 2002. — Vol. 30, Suppl. 2. — P. 61-67.

9. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD series on testing and assessment / Organisation for Economic Cooperation and Development. — Paris, France. — 2001. — 249 p.

10. Annex I to Commission Directive 2000/33/EC adapting to technical progress for the 27-th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances // Official Journal of the European Union. — 2000. — L136. — P. 91-97.

11. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals № 430. In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) / Organisation for Economic Cooperation and Development. — Paris, France. — 2002. — 12 p.

12. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals № 431. In vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test / Organisation for Economic Cooperation and Development. — Paris, France. — 2002. — 8 p.

13. ECVAM Statement on the scientific validity of the EPISKIN test (an in vitro test for skin corrosivity) // ATLA. — 1998. — Vol. 26. — P. 277-280.

14. The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity 2. Results

and evaluation by the Management Team / J.H. Fentem, G.E.B. Archer, M. Ball et al. // Toxicology in Vitro. — 1998. — Vol. 12. — P. 483-524.

15. The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing / M. Liebsch, D. Traue, C. Barrabas // ATLA. — 2000. — Vol. 28. — P. 371-401.

16. ECVAM Statement on the application of the CORROSITEX assay for skin corrosivity testing // ATLA. — 2001. — Vol. 29. — P. 96-97.

17. Alternative methods for skin irritation testing: the current status. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 1 / P.A. Botham, L.K. Earl, J.M. Fentem et al. // ATLA. — 1998. — Vol. 2. — P. 195-211.

18. A revalidation study on in vitro tests for acute irritation: results and evaluation by the Management Team / J.H. Fentem, D. Rriggs, C. Elliott et al. // Toxicology in Vitro. — 2001. — Vol. 15. — P. 57-93.

19. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics / C. Faller, M. Bracher, N. Dami, R. Roguet // Toxicology in Vitro. — 2002. — Vol. 16. — P. 557-572.

20. Rosdy M.A., Clauss L.C. Complete human epidermal cell differentiation in chemical defined medium at the air-liquid interface on inert filter substrates // Journal of Investigative Dermatology. — 1990. — Vol. 5. — P. 409-414.

21. Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEtihc) applied to the testing of topical vehicles / A. de Brugerolle de fraissinette, V. Picarles, S. Chibout et al. // Cell Biology and Toxicology. — 1999. — Vol. 15. — P. 121-135.

22. Transepithelial resistance and inline permeability as endpoints in vitro nephrotoxicity testing / N. Duff, S. Carter, G. Feldman et al. // ATLA. — 2002. — Vol. 30, Suppl. 2. — P. 53-59.

23. Follow-up to the ECVAM Prevalidation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2 / V. Zuang, M. Balls, P.A. Botham et al. // ATLA. — 2002. — Vol. 30. — P. 109-129.

24. A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Ma-

agement Team / J.H. Fentem, D. Briggs, C. Chesne et al. // Toxicology in Vitro. — 2001. — Vol. 15. — P. 57-93.

25. A prevalidation study on the in vitro skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation in vivo: results and evaluation of ECVAM Phase III / J.K. Heylinling, S. Diot, W.J. Fasano W.J. et al. // Toxicology in Vitro. — 2003. — Vol. 17. — P. 123-138.

26. Heylings J.R., Clowes H.M., Hughes L. Comparison of tissue sources for the skin integrity function test (SIFT) // Toxicology in Vitro. — 2001. — Vol. 13. — P. 597-600.

27. Skin Irritation and Corrosion / V. Zuang, M.-A. Alonso, P.A. Botham et al. // ATLA. — 2005. — Vol. 33, Suppl. 1. — P. 35-46.

28. Волощенко О.І., Раєцька О.В., Яловенко О.І., Кузьміна А.І. Спосіб оцінки цитотоксичної дії засобів на основі поверхнево-активних речовин // Патент на корисну модель № 28727, зареєстр. 25.12.2007, заява № 2007 06922. Висновок про видачу деклараційного патенту на корисну модель за результатами формальної експертизи, затв. 21.08.2007, № 23856/1 від 13.09.2007.

29. Barratt M.D. Quantitative structure-activity relationships for skin irritation and corrosivity of neutral and electrophilic organic chemicals // Toxicology in vitro. — 1996. — Vol. 10. — P. 247-256.

30. A quantitative structure-activity relationships study of the skin irritation potential of phenols / H. Hayashi, Y. Nakamura, K. Higashi et al. // Toxicology in vitro. — 1999. — Vol. 13. — P. 915-922.

31. A robust structure-activity relationships (SAR) model for esters that cause skin irritation in humans / J.S. Smith, O.T. Macina, N.B. Sussman et al. // Toxicology in vitro. — 2000. — Vol. 55. — P. 215-222.