

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΥΣΗ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ**Δ.Δ. Βάρσου^{1,2,*}, Α. Αφαντίτης², Γ. Μελαγράκη³, Χ. Σαρίμβεης¹**¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα²NovaMechanics Ltd, Λευκωσία, Κύπρος³Στρατιωτική Σχολή Ευελπίδων, Βάρη, Ελλάδα(*dimitra.varsou@gmail.com)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στα πλαίσια της παρούσας Εργασίας αναπτύχθηκε μια καινοτόμος μεθοδολογία read-across για την πρόβλεψη ανεπιθύμητων αποκρίσεων που προκαλούνται όταν νανοσωματίδια εισέρχονται σε κάποιο βιολογικό μέσο. Η προτεινόμενη μεθοδολογία ενσωματώνει στοιχεία από τις δυο κυρίαρχες μεθοδολογίες read-across: της προσέγγισης των αναλόγων και της προσέγγισης της ομαδοποίησης και μπορεί να λάβει υπόψιν τα πολλαπλά είδη χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων. Στην εν λόγω μεθοδολογία δε χρειάζεται να καθοριστεί εκ των προτέρων μια υπόθεση read-across για τη δημιουργία των «γειτονιών» εντός των οποίων θα πραγματοποιηθεί η πρόβλεψη, αλλά μέσω μιας διαδικασίας μαθηματικής αριστοποίησης αναζητούνται τα εναλλακτικά όρια και ο συνδυασμός τους που θα οδηγήσει στην πιο αξιόπιστη πρόβλεψη. Η διαδικασία είναι ως επί το πλείστον αυτοματοποιημένη και απαιτεί ελάχιστες επεμβάσεις από τους χρήστες: τον αριθμό των κριτηρίων ομοιότητας που θα εφαρμοστούν για την επιλογή των γειτόνων ενός νανοσωματιδίου ενδιαφέροντος και το επίπεδο εξισορρόπησης μεταξύ ακρίβειας της πρόβλεψης και αριθμού νανοσωματιδίων με επιτυχή πρόβλεψη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχής παραγωγή και εμπορική εφαρμογή ποικίλων και καινοτόμων νανοϋλικών, παρόλη την συμβολή τους σε πολλούς τομείς (τεχνολογία, κατασκευές, ιατρική, κοσμετολογία κ.λπ.), εγείρουν προβληματισμούς σχετικά με την ασφάλεια για τους ζωντανούς οργανισμούς και το περιβάλλον, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν ελλειπείς τοξικολογικές μελέτες ή ακόμα κι αν απουσιάζουν εντελώς από τη Βιβλιογραφία. Ο πλήρης χαρακτηρισμός και τοξικολογική ανάλυση *in vitro* και *in vivo* όλων των υποψήφιων νανοδομών αλλά και όσων ήδη υπάρχουν στην αγορά απαιτεί μια σειρά χρονοβόρων πειραμάτων αυξημένου κόστους, όπως και την ενδεχόμενη χρήση πειραματόζωων^[1]. Για το λόγο αυτό αναζητούνται εναλλακτικές λύσεις που θα οδηγούν στην εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων σχετικά με την τοξικότητα των διαφόρων νανοσωματιδίων (ΝΣ) οι οποίες θα αποκλείονται από μελλοντικές πειραματικές μελέτες ως ήδη τοξικές. Σε αυτές τις λύσεις, που λειτουργούν ως φίλτρα που δίνουν προτεραιότητα στην πειραματική αξιολόγηση των ΝΣ, συγκαταλέγονται και οι υπολογιστικές μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να υπολογιστούν με σχετική ακρίβεια τυχόν ανεπιθύμητες ιδιότητες ή να περιγραφούν με μαθηματικές σχέσεις οι βιολογικές οδοί που ενεργοποιούνται και οδηγούν στην τοξική απόκριση των ΝΣ.

Ο επονομαζόμενος τομέας της «νανοπληροφορικής» έχει πρωτεύοντα ρόλο στο πεδίο της νανοτοξικότητας και υποστηρίζεται τόσο από τη διεθνή κοινότητα για την ασφάλεια των νανοϋλικών όσο και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών Προϊόντων^[2]. Ο τομέας αυτός περιλαμβάνει τόσο υπολογιστικές προσομοιώσεις όσο και ανάπτυξη προβλεπτικών μοντέλων, όπως για παράδειγμα μοντέλα ποσοτικών μεθόδων συσχέτισης δομής-ιδιοτήτων (Quantitative Structure Activity Relationships models- QSAR), που βασίζονται σε μεθόδους εξόρυξης δεδομένων και μηχανικής μάθησης. Τα μοντέλα τύπου QSAR χρειάζονται αρκούτσως μεγάλα σύνολα δεδομένων προκειμένου να παράγουν αξιόπιστες προβλέψεις, απαίτηση που δε μπορεί πάντοτε να ικανοποιηθεί, δεδομένου ότι στον τομέα της νανοτοξικότητας τα σύνολα δεδομένων είναι μικρά

(λιγότερα από 20 δείγματα ανά σύνολο), και οι πληροφορίες που περιέχονται είναι ασύνδετες μεταξύ των διαφόρων συνόλων. Για το λόγο αυτό, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Προϊόντων εισήγαγε το «Πλαίσιο Αξιολόγησης Read-Across» για την πρόβλεψη ιδιοτήτων μεταξύ μικρών ομάδων ΝΣ^[2,3].

Οι μεθοδολογίες read-across βασίζονται κυρίως στο ότι παρόμοια υλικά εμφανίζουν συγκρίσιμες ιδιότητες, επομένως η εκτίμηση της τοξικής απόκρισης ΝΣ που δεν έχουν ελεγχθεί πειραματικά μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα μέσα από ένα σύνολο παρόμοιων με τις υπό εξέταση ΝΣ^[4]. Υπάρχουν δυο προσεγγίσεις read-across: Σύμφωνα με την προσέγγιση της ομαδοποίησης (grouping), ΝΣ με παρόμοιες ιδιότητες εντάσσονται σε μια ομάδα και έχουν την ίδια τοξική απόκριση που χαρακτηρίζει και όλη την ομάδα. Σύμφωνα με την προσέγγιση των αναλόγων (analogues), για ΝΣ που δεν έχουν ελεγχθεί πειραματικά ως προς την τοξικότητά τους, μπορούν να βρεθούν μέσα από ένα σύνολο ΝΣ με γνωστή τοξική απόκριση, «συγγενή-δομικά» ΝΣ και να γίνει η πρόβλεψη ξεχωριστά για κάθε άγνωστο σωματίδιο με βάση την τοξικότητα των συγγενών του ΝΣ^[5,6]. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια αναλυτική μεθοδολογία τύπου read-across για την πρόβλεψη της τιμής της τοξικότητας ΝΣ με την προσέγγιση των αναλόγων, βασισμένη σε μεθοδολογίες μαθηματικής αριστοποίησης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθοδολογίας read-across το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε αφενός στην επιλογή μεταβλητών που περιέχουν σημαντική πληροφορία για την πρόβλεψη της εκάστοτε τοξικής απόκρισης και αφετέρου στη βέλτιστη επιλογή των ορίων που θα διαμορφώνουν τις «γειτονιές» συγγενών ΝΣ οδηγώντας σε πιο αξιόπιστες προβλέψεις. Και οι δυο αυτοί στόχοι, θα μπορούσαν να επιτευχθούν μέσω της ανάπτυξης ενός μοντέλου μαθηματικού προγραμματισμού όπου στόχος είναι να ελαχιστοποιηθεί το μέσο τετραγωνικό σφάλμα (mean squared error, MSE) μεταξύ των πραγματικών τιμών τοξικότητας και των τιμών που προκύπτουν από την προβλεπτική διαδικασία για κάθε ΝΣ i εντός του συνόλου με τουλάχιστον ένα γείτονα (Εξίσωση 1).

$$\min \text{MSE} = \frac{1}{\sum_i \text{pred}_i} \sum_i \text{pred}_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (1)$$

Όπου pred_i , μια δυαδική μεταβλητή που παίρνει την τιμή 1 εάν το ΝΣ έχει τουλάχιστον ένα γείτονα και 0 σε αντίθετη περίπτωση,

y_i , μια συνεχής μεταβλητή που περιέχει την πραγματική τιμή της τοξικής απόκρισης για κάθε i ΝΣ και

\hat{y}_i : μια συνεχής μεταβλητή που περιέχει την προβλεφθείσα τιμή της τοξικής απόκρισης για κάθε i ΝΣ.

Το εν λόγω πρόβλημα του μαθηματικού προγραμματισμού, μπορεί να επεκταθεί ενσωματώνοντας ένα ή περισσότερα κριτήρια ομοιότητας ανάλογα με τις διαφορετικές κατηγορίες ιδιοτήτων χαρακτηρισμού των ΝΣ που είναι διαθέσιμες (π.χ. βιολογικούς περιγραφείς, φυσικοχημικές ιδιότητες, μεταβλητές που προκύπτουν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής κ.α.). Τα κριτήρια αυτά μπορούν να επηρεάσουν την επιλογή των γειτόνων θέτοντας περισσότερα κατώφλια για την επιλογή των γειτόνων και εισάγοντας περιορισμό για την ικανοποίηση όλων των κατωφλίων προκειμένου να επιλεγεί ένας γείτονας. Η επέκταση για ένα ή περισσότερα κριτήρια θεωρείται τετριμμένη.

Ωστόσο, το παραπάνω πρόβλημα μαθηματικής αριστοποίησης δεν δύναται να επιλυθεί

αποτελεσματικά μέσω συμβατικών μεθόδων αριστοποίησης. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκε ένας καινοτόμος εξελικτικός αλγόριθμος βασισμένος στις αρχές των Γενετικών Αλγορίθμων που έχουν ήδη εφαρμοστεί σε διαδικασίες βέλτιστης επιλογής μεταβλητών.

Κατά τη διαδικασία αυτή κάθε πιθανή λύση (επιλεγμένες μεταβλητές και κατώφλια) απεικονίζεται ως ένα υβρίδιο «χρωμόσωμα» που αποτελείται από τόσα «γονίδια» όσο και ο αριθμός των διαθέσιμων μεταβλητών, προσθέτοντας -σε καθορισμένες θέσεις- τον αριθμό των κατωφλίων ανάλογα με τον αριθμό των κριτηρίων ομοιότητας που εφαρμόζονται. Τα γονίδια που εκφράζουν την επιλογή ή μη μιας ιδιότητας είναι δυαδικές μεταβλητές, ενώ τα γονίδια που εκφράζουν την τιμή των κατωφλίων είναι συνεχείς.

Τα δεδομένα αρχικά κανονικοποιούνται προκειμένου όλες οι μεταβλητές να αποκτήσουν το ίδιο εύρος τιμών και να συμμετέχουν ισότιμα στην ανάλυση. Στη συνέχεια δημιουργείται ένας τυχαίος πληθυσμός από χρωμοσώματα και καθένα αξιολογείται ως προς την προβλεπτική του ικανότητα: Υπολογίζονται οι ευκλείδειες αποστάσεις μεταξύ όλων των δειγμάτων του συνόλου δεδομένων (Εξίσωση 2), με βάση τις επιλεγμένες μεταβλητές, και στη συνέχεια υπολογίζονται για κάθε δείγμα οι γείτονες μεταξύ των δειγμάτων: εάν η ευκλείδεια απόσταση μεταξύ δυο ΝΣ είναι μικρότερη από την τιμή του κατωφλιού, τότε τα δυο ΝΣ θεωρούνται γείτονες.

$$dist_{i,j} = \sqrt{\sum_{l=1}^L attr_{\ell}(x_{i,\ell} - x_{j,\ell})^2}, i = 1, \dots, N, j = 1, \dots, N, i \neq j \quad (2)$$

Όπου, $attr_{\ell}$, η τιμή του ℓ γονιδίου, 1 ή 0 εάν η αντίστοιχη μεταβλητή έχει επιλεγεί ή όχι και $x_{i,\ell}$, η τιμή της μεταβλητής ℓ για το ΝΣ i .

Για κάθε ένα δείγμα αναφοράς, υπολογίζεται η πρόβλεψη read-across ως ο σταθμισμένος μέσος όρος των τοξικών αποκρίσεων όλων των γειτόνων του (εξίσωση (3)) και για όλες τις προβλέψεις υπολογίζεται το μέσο τετραγωνικό σφάλμα (εξίσωση (1)). Στο τέλος κάθε χρωμόσωμα βαθμολογείται με την τιμή του αντιστρόφου μέσου τετραγωνικού σφάλματος.

$$\hat{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^N neighb_{i,j} \cdot w_{i,j} \cdot y_j}{\sum_{j=1}^N neighb_{i,j} \cdot w_{i,j}}, i = 1, \dots, N \quad (3)$$

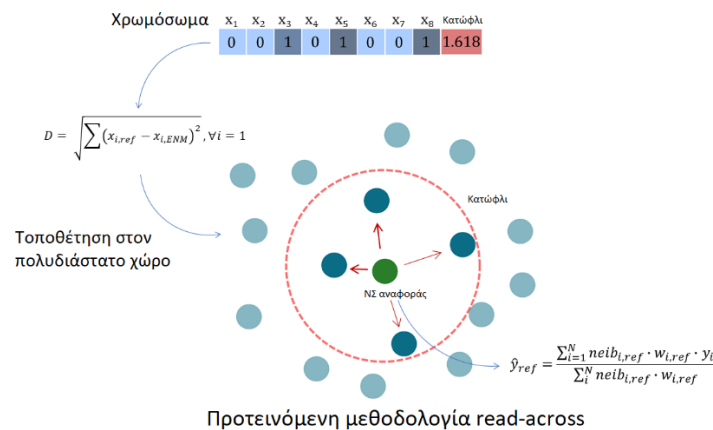
Όπου $neib_{i,j}$ μια δυαδική μεταβλητή που παίρνει την τιμή 1 εάν τα ΝΣ i και j είναι γείτονες και 0 σε αντίθετη περίπτωση και

$w_{i,j}$, οι σταθμικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην πρόβλεψη, ίσοι με την ανάστροφη τιμή της απόστασης $dist_{i,j}$.

Στις επόμενες επαναλήψεις, μέχρι να ολοκληρωθεί ένα καθορισμένο πλήθος «γενεών», επιλέγονται ζεύγη χρωμοσωμάτων, με βάση τη βαθμολογία τους, και εφαρμόζονται σε αυτά οι γενετικοί τελεστές της αναπαραγωγής και της μετάλλαξης: Τα χρωμοσώματα αρχικά διασταυρώνονται σε τυχαίες θέσεις και στη συνέχεια με βάση μια προκαθορισμένη τιμή πιθανότητας, οι τιμές των γονιδίων που αντιστοιχούν σε μεταβλητές μεταβάλλονται από 0 σε ένα και αντίστροφα, ενώ οι τιμές των γονιδίων που αντιστοιχούν σε κατώφλια μεταβάλλονται σύμφωνα με την εξίσωση (4). Ο νέος πληθυσμός χρωμοσωμάτων αξιολογείται ξανά, και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται. Το χρωμόσωμα που απέκτησε την υψηλότερη βαθμολογία κατά την εξελικτική διαδικασία, δίδεται και ως έξοδος του αλγορίθμου (Σχήμα 1).

$$thr_{new}^{GA} = \begin{cases} thr_{old}^{GA} + (thr_{max}^{GA} - thr_{old}^{GA}) \cdot (1 - r^{(1-g/maxGen)^{bGA}}), & \text{έναν τυχαίο αριθμό ισούται με 0} \\ thr_{old}^{GA} - (thr_{old}^{GA} - thr_{min}^{GA}) \cdot (1 - r^{(1-g/maxGen)^{bGA}}), & \text{έναν τυχαίο αριθμό ισούται με 1} \end{cases} \quad (4)$$

Όπου thr_{old}^{GA} , η προηγούμενη τιμή του κατώφλι,
 thr_{new}^{GA} , η νέα τιμή του κατώφλι μετά τη μετάλλαξη,
 thr_{max}^{GA} και thr_{min}^{GA} , τα προκαθορισμένα άνω και κάτω όρια της τιμής του κατώφλι,
 r , μια τυχαία τιμή μεταξύ 0 και 1,
 g , ο αριθμός της τρέχουσας γενεάς,
 bGA , μια παράμετρος που καθορίζει τον βαθμό εξάρτησης της μετάλλαξης από τον αριθμό της τρέχουσας γενεάς.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της προτεινόμενης μεθοδολογίας read-across χρησιμοποιώντας τις επιλεγμένες μεταβλητές ενός χρωμοσώματος και το υπολογισμένο κατώφλι. Οι επιλεγμένες μεταβλητές μέσω της ευκλείδειας απόστασης καθορίζουν τη θέση των ΝΣ στον πολυδιάστατο χώρο. Οι γείτονες για κάθε ΝΣ αναφοράς επιλέγονται με βάση τη σχετική τους θέση και το κατώφλι και χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη δημοσιευμένη ερευνητική εργασία *Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cell Association of Gold Nanoparticles* των Walkey και συνεργατών. Το σύνολο των δεδομένων αποτελείται από 84 ΝΣ χρυσού με διαφορετικές επιφανειακές επικαλύψεις για τα οποία είναι γνωστοί 40 φυσικοχημικοί δείκτες, το αποτύπωμα 129 πρωτεϊνών του σχηματιζόμενου πρωτεϊνικού στέμματος όταν τα ΝΣ βρίσκονται σε ένα βιομοριακό περιβάλλον και ένας δείκτης τοξικότητας (κυτταρική συσχέτιση)^[7]. Στο σύνολο των 129 πρωτεϊνών εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης συνόλου γονιδίων μέσω της διαδικτυακής εφαρμογής toxFlow και μόνο 63 πρωτεΐνες κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές^[8].

Η προτεινόμενη μεθοδολογία εφαρμόστηκε αρχικά λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις διαθέσιμες μεταβλητές και ένα κατώφλι ομοιότητας και στη συνέχεια θεωρώντας δυο είδη μεταβλητών και δυο κατώφλια ομοιότητας (ένα φυσικοχημικό και ένα βιολογικό). Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την αξιοπιστία της τόσο εκπαιδευοντας και εφαρμόζοντάς τη στο ίδιο σύνολο δεδομένων, όσο και εκπαιδευοντας την με ένα σύνολο εκπαίδευσης και εφαρμόζοντάς τη σε ένα εξωτερικό σύνολο αξιολόγησης^[9]. Δεδομένου του στοχαστικού χαρακτήρα της μεθόδου, έγιναν για κάθε συνδυασμό παραμέτρων 10 επαναλήψεις και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκπαίδευσης της μεθόδου χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους του Πίνακα 2.

Πίνακας 1. Τιμές παραμέτρων για την εκπαίδευση της προτεινόμενης μεθοδολογίας.

Παράμετρος	Τιμές
Αριθμός χρωμοσωμάτων	100
Πλήθος γενεών	1000
Πιθανότητα διασταύρωσης	0.7
Πιθανότητα μετάλλαξης	0.01
Πιθανότητα μετάλλαξης κατωφλιού	0.1
thrGA_min	0.1
thrGA_max	Μέση τιμή των μέγιστων αποστάσεων μεταξύ των ΝΣ
bGA	1
predFactor	0.6

Πίνακας 2. Αποτελέσματα εκπαίδευσης και αξιολόγησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας read-across, έχοντας πραγματοποιήσει 10 επαναλήψεις.

Εσωτερική αξιολόγηση	Ενιαίο κατώφλι		Δυο κατώφλια			
	min	max	Φυσικοχημικοί σταθμικοί παράγοντες		Βιολογικοί σταθμικοί παράγοντες	
			min	max	min	max
κατώφλια	0.9846	1.1728	0.2497	1.0554	0.4841	0.8822
			0.6766	1.2691	0.9780	1.1909
# μεταβλητές	46	59	39	62	50	62
# προβλεφθέντα ΝΣ	50	53	50	51	50	53
R ²	0.966	0.979	0.956	0.983	0.947	0.967
Εξωτερική αξιολόγηση	Ενιαίο κατώφλι		Δυο κατώφλια			
	min	max	Φυσικοχημικοί σταθμικοί παράγοντες		Βιολογικοί σταθμικοί παράγοντες	
			min	max	min	max
κατώφλια	1.3923	1.7148	0.6779	1.3573	0.8416	1.3832
			1.1047	1.5270	1.1309	1.4679
# μεταβλητές	50	57	47	62	48	62
# προβλεφθέντα ΝΣ	29	29	28	29	27	29
q ²	0.693	0.790	0.736	0.831	0.724	0.860

Μελετώντας τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται η βελτίωση της αξιοπιστίας των προβλέψεων όταν χρησιμοποιούνται δυο κριτήρια ομοιότητας (κατώφλια) ιδιαίτερα στην περίπτωση της εξωτερικής αξιολόγησης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια καινοτόμος μέθοδος πρόβλεψης read-across για την πρόβλεψη ανεπιθύμητων αποκρίσεων των ΝΣ όταν αλληλοεπιδρούν με έμβια όντα. Μέσω της μεθόδου, επιτυγχάνεται αφενός η μείωση του συνόλου των μεταβλητών σε εκείνες που περιέχουν την πιο χρήσιμη πληροφορία για την πρόβλεψη, και αφετέρου εντοπίζεται το όριο ή τα όρια που καθορίζουν τα γειτονικά ΝΣ γύρω από κάθε ΝΣ ενδιαφέροντος. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της προτεινόμενης μεθοδολογίας είναι η αυτοματοποιημένη εξεύρεση των αναλόγων-γειτόνων για κάθε ΝΣ, και η δυνατότητα να ληφθούν υπόψιν οι διαφορετικές κατηγορίες των ιδιοτήτων των ΝΣ και να συμβάλλουν ξεχωριστά στην επιλογή των γειτόνων. Επόμενο στόχο αποτελεί η επέκταση της μεθοδολογίας για την πρόβλεψη κλάσεων (κατηγορικές μεταβλητές).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφέας ΔΔΒ εκφράζει τις ευχαριστίες της προς το Ίδρυμα Ωνάση, το οποίο χρηματοδοτεί τις διδακτορικές της σπουδές. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου NanoCommons που χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Horizon 2020 Programme), με αριθμό σύμβασης 731032.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Gajewicz, A, Jagiello, K, Cronin, MT, Leszczynski, J, Puzyn, T. (2017). *Environ. Sci.: Nano.*, 4, 346-358
- [2] ECHA, Read-across Assessment Framework. 2015.
- [3] Schultz, T, Amcoff, P, Berggren, E, Gautier, F, Klaric, M, Knight, D, Mahony, C, Schwarz, M, White, A, Cronin, M. (2015). *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 72, 586–601.
- [4] L. Lamon, K. Aschberger, D. Asturiol, A. Richarz and A. Worth, *Nanotoxicology*, 2018, 1–19.
- [5] Mech, A, Rasmussen, K, Jantunen, P, Aicher, L, Alessandrelli, M, Bernauer, U, Bleeker, E, Bouillard, J, Di Prospero Fanghella P, Draisci, R. (2018). *Nanotoxicology*, 1–23.
- [6] ECHA, Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals, May 2017.
- [7] Walkey, CD, Olsen, JB, Song, F, Liu, R, Guo, H, Olsen, DWH, Cohen, Y, Emili, A, Chan, WC. (2014). *ACS Nano.*, 8(3): 2439-55.
- [8] Varsou, DD, Tsiliki, G, Nymark, P, Kohonen, P, Grafstrom, R, Sarimveis, H. (2018). *J. Chem. Inf. Model.*, 58 (3): 543–549.
- [9] Daszykowski, M, Walczak, B, Massart, D. (2002). *Anal. Chim. Acta*, 468, 91–103.