

การทำนายพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT และการเรียนรู้ของเครื่องคอมพิวเตอร์

Advancing skin toxicity predictions with HaCaT cells and machine learning

นายเฉลิมเดช ตฤณวิวัฒน์

รหัสหัวข้อ P18

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต

รายวิชา PS115 781 โครงการพิเศษทางด้านเภสัชศาสตร์ 2

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปีการศึกษา 2566

การทำนายพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT และการเรียนรู้ของเครื่องคอมพิวเตอร์

Advancing skin toxicity predictions with HaCaT cells and machine learning

นายเฉลิมเดช ตฤณวิวัฒน์

รหัสหัวข้อ P18

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต

รายวิชา PS115 781 โครงการพิเศษทางด้านเภสัชศาสตร์ 2

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น


ปีการศึกษา 2566

บทคัดย่อ

การระคายเคืองผิวหนัง (Skin irritation) คือการเกิดความเสียหายต่อผิวหนังชนิดย้อนกลับได้ จากการสัมผัสสารเคมี และจำเป็นต้องมีทดสอบก่อนขึ้นทะเบียนสารเคมีทุกชนิด โดยส่วนมากมักทดสอบกับสัตว์ทดลอง แต่การใช้สัตว์ทดลองนั้นมีข้อจำกัดด้านการเงิน จริยธรรม และมนุษยธรรม การใช้เทคนิคการหาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารเคมี (Quantitative Structure Activity Relationship; QSAR) ร่วมกับการเทคนิค แรนดอมฟอเรส (Random Forest) ซึ่งเป็นอัลกอริทึมการเรียนรู้ของคอมพิวเตอร์ (machine learning) คือการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อทำนายความเป็นพิษ เพื่อให้ผลที่ทำนายได้มีความน่าเชื่อถือจึงจำเป็นต้องทดสอบแบบจำลองเพื่อหาประสิทธิภาพของแบบจำลอง โดยแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ในการทำนายการระคายเคืองผิวหนังของสารเคมีซึ่งเป็นหนึ่งในการทดสอบทางเลือกที่ลดต้นทุนและไม่มีข้อจำกัดด้านจริยธรรมและมนุษยธรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างแบบจำลองที่ทำนายการระคายเคืองผิวหนังจากโครงสร้างของสารเคมีได้ โดยการศึกษานี้ใช้ฐานข้อมูลของสารเคมีที่ถูกทดสอบในหลอดทดลองกับเซลล์เคราติโนไซต์อมตะของมนุษย์ (HaCaT) และค่า Half maximal inhibitory concentration (IC50) เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพโดยหาค่า IC50 สูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์จะถูกลบเป็นสารเคมีที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง จากนั้นสร้างแบบจำลอง Random forest classifier ซึ่งใช้ข้อมูลโครงสร้างสารเคมีในรูปแบบลายพิมพ์ระดับโมเลกุล 2 รูปแบบคือ PubChem และ Substructure มาเปรียบเทียบเพื่อหาแบบจำลองที่ดีที่สุด และหาลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่มีอิทธิพลต่อความเป็นพิษสูง นอกจากนี้ยังหาประสิทธิภาพของแบบจำลองด้วยการคำนวณค่าความถูกต้อง แม่นยำ ความไว และความจำเพาะของแบบจำลอง จากผลการศึกษาพบว่าแบบจำลองมีความถูกต้อง ความแม่นยำ ความไว และความจำเพาะสูงระดับร้อยละ 64 ถึง 98 เมื่อเทียบกับกลุ่มทดสอบภายนอก นอกจากนั้นโครงสร้างสารเคมีหรือลายพิมพ์ระดับโมเลกุล ที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการทำนายการระคายเคืองผิวหนัง เช่น การมีออกซิเจนไม่ว่าจะเป็นหมู่คีโตน (ketone) หรือคาร์บอนิล (carbonyl) การมีวงแหวนที่ประกอบด้วยไนโตรเจน หรือการมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเคมีเป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแบบจำลองสามารถทำนายการระคายเคืองผิวหนังของสารเคมีได้

วิชา PS115781 โครงการพิเศษด้านเภสัชศาสตร์ 2

ภาคปลาย ปีการศึกษา 2566

ลายมือนักศึกษา 

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา 

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การทำนายพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT และการเรียนรู้ของเครื่องคอมพิวเตอร์ สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจาก ได้รับการสนับสนุนและความอนุเคราะห์ยิ่งจาก ผศ.ดร.ธราพงษ์ ศรีสงคราม อาจารย์สาขาวิชาเภสัชเคมี ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อคิด ข้อเสนอแนะ และตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ จนกระทั่งการวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง บรรลุ จุดประสงค์ที่คาดหวังไว้ได้ด้วยดี ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ผู้ศึกษาหวังว่างานวิจัยฉบับนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่สนใจศึกษาต่อไป

นายเฉลิมเดช ตฤณวิวัฒน์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
รายการคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
2.1 ความเป็นพิษทางผิวหนังและการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนัง	3
2.2 การนำข้อมูลเซลล์ HaCaT มาใช้ประโยชน์	4
2.3 การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT เพื่อประเมินความเป็นพิษทางผิวหนัง	4
2.4 การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT เพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง	5
2.5 การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยวิธีการเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning)	5
2.6 แบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest)	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	8

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.1 เครื่องดำเนินการวิจัย	8
3.2 วิธีการดำเนินงาน	8
3.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย	13
3.4 แผนการดำเนินการเกี่ยวกับกิจกรรมและระยะเวลาในการทำวิจัย	13
3.5 สถานที่ทำวิจัย	13
3.6 งบประมาณ	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
4.1 การกระจายของชุดข้อมูลสำหรับทำแบบจำลอง	15
4.2 การวิเคราะห์เชิงองค์ประกอบหลัก (PCA)	16
4.3 การสร้างและตรวจทานแบบจำลอง	18
4.4 พื้นที่การใช้ประโยชน์ (Applicability domain)	20
4.5 ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลอง	21
4.6 ความถูกต้องในการทำนาย Benchmark dataset ของแบบจำลอง	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	26
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูปที่ 1 แสดงการกระจายของโมเลกุลด้วยการใช้ logP กับมวลโมเลกุล	15
รูปที่ 2 แสดงการกระจายของสารเคมีด้วยการใช้ HBD กับ HBA	16
รูปที่ 3 การกระจายของสารเคมีด้วย PCA โดยใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุล PubChem	17
รูปที่ 4 การกระจายของสารเคมีด้วย PCA โดยใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุล Substructure	17
รูปที่ 5 Confusion matrix ของแบบจำลองด้วยการใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem	18
รูปที่ 6 Confusion matrix ของแบบจำลองด้วยการใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ Substructure	19
รูปที่ 7 ROC Curve ของแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem	19
รูปที่ 8 ROC Curve ของแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ Substructure	20
รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง Matric value กับ K values ของแบบจำลองที่ระบบ PubChem	20
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่าง Matric value กับ K values ของแบบจำลองที่ระบบ Substructure	21
รูปที่ 11 ความสำคัญของลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของแบบจำลองที่ใช้ระบบ PubChem	21
รูปที่ 12 ความสำคัญของลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของแบบจำลองที่ใช้ระบบ Substructure	22
รูปที่ 13 ผลลัพธ์ที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลสร้างขึ้นของแบบจำลองระบบ PubChem	22
รูปที่ 14 ผลลัพธ์ที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลสร้างขึ้นของแบบจำลองระบบ Substructure	23
รูปที่ 15 ตัวอย่างลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ PubChem ที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการทำนาย	23
รูปที่ 16 ตัวอย่างลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ Substructure ที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการทำนาย	24
รูปที่ 17 ผลลัพธ์การทดสอบ Benchmark dataset ของแบบจำลองระบบ PubChem	24
รูปที่ 18 ผลลัพธ์การทดสอบ Benchmark dataset ของแบบจำลองระบบ Substructure	25

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง Confusion matrix	11
ตารางที่ 2 แสดงแผนการดำเนินงาน	13
ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest)	19

รายการคำย่อ

FN = False negative

FP = False positive

IC50 = Half maximal inhibitory concentration

MCC = Matthews correlation coefficient

NRU assay = Neutral red uptake assay

OECD = Organization of Economic co-operation and Development

PC = Principal component

PCA = Principal component analysis

QSAR = Quantitative Structure Activity Relationship

ROC = Receiver Operating Characteristics

SMILES = Simplified molecular-input line-entry system

SVM = Support vector machine

TN = True negative

TP = True positive

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ความเป็นพิษทางผิวหนัง คือ ผลเสียที่เกิดจากการได้รับสารผ่านทางผิวหนัง ทั้งเกิดเฉพาะที่หรือทั้งระบบ ไหลเวียนโลหิตในมนุษย์หรือสัตว์ ฉะนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีก่อนที่จะสามารถนำไปใช้ได้เพื่อให้ความมั่นใจว่าสารเคมีที่จะนำไปใช้ในงานกิจกรรมต่าง ๆ นั้นมีความปลอดภัย โดยการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีมีการประเมิน 3 รูปแบบคือ 1) ประเมินการระคายเคืองผิวหนัง (Skin irritation) 2) ประเมินการกัดกร่อนผิวหนัง (Skin corrosion) 3) ประเมินการแพ้ของผิวหนัง (Skin sensitization)

ในปัจจุบัน การทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีสามารถทำการทดสอบได้โดยหลายวิธี ได้แก่ 1) ทดสอบในสารเคมี เช่น การทดสอบเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง Direct peptide reactivity assay 2) ทดสอบในหลอดทดลอง เช่น การทดสอบในหลอดทดลองเพื่อประเมินการกัดกร่อนผิวหนัง แบบจำลองเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกของมนุษย์ (Reconstructed human epidermis) การทดสอบในหลอดทดลองเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง The ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ 3) ทดสอบในสัตว์ทดลอง เช่น การทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง Guinea pig maximization test and Buehler test หรือ 4) ทดสอบโดยใช้แบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ โดยวิธีการทดสอบเหล่านี้ถูกกำหนดให้เป็นแนวทางการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีโดยองค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (OECD) ซึ่งเป็นองค์กรที่ได้รับการยอมรับทั่วโลก โดยองค์กรนี้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับแนวทางการทดสอบความเป็นพิษด้านต่าง ๆ

เซลล์ HaCaT เป็นเซลล์ไลน์เคราติโนไซต์อมตะของมนุษย์ (Immortalized human keratinocyte cell line) ชนิด aneuploid ซึ่งมีการพัฒนาให้เป็นเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์ในหลอดทดลอง เนื่องจากมีคุณสมบัติ differentiation capacity ที่สูง และสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นในหลอดทดลองได้ เพื่อใช้ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างแพร่หลายซึ่งรวมไปถึงงานวิจัยด้านพิษวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมี (Boelsma et al., 1999; Boukamp et al., 1988; Şenkal et al., 2022; Wilson, 2014)

การใช้เทคนิคการหาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารเคมี (Quantitative Structure Activity Relationship; QSAR) เป็นวิธีการที่สามารถเชื่อมโยงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลกับผลกระทบทาง

ชีวเคมี, ทางกายภาพ, เกล็ดชีววิทยา, ชีววิทยา ฯลฯ การใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นจาก QSAR สามารถทำการคำนวณผลกระทบทางเคมี, การค้นพบยาและการทำนายพิษของสารเคมี ในงานวิจัยนี้แบบจำลอง QSAR เป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างผลกระทบทางพิษวิทยากับโครงสร้างทางเคมี (Gajewicz et al., 2012)

การเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning) เป็นวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่เน้นการศึกษาถึงวิธีการเรียนรู้ของคอมพิวเตอร์จากข้อมูล ซึ่งมุ่งหาที่จะเรียนรู้ความสัมพันธ์เชิงสถิติจากด้วยการเน้นการคำนวณอัลกอริทึมที่มีประสิทธิภาพ (Deo, 2015)

การทดสอบความเป็นพิษในปัจจุบันสนับสนุนหลักการ 3Rs จึงนำมาสู่การพัฒนาแบบจำลองการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความเป็นพิษทางผิวหนังโดยใช้วิธีการเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning) เพื่อใช้ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีที่ต้องการทดสอบ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 พัฒนาแบบจำลองด้วยการใช้การเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning) ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังโดยใช้ข้อมูลความสัมพันธ์โครงสร้างและความเป็นพิษของสารเคมี

1.2.2 หาประสิทธิภาพและตรวจทานแบบจำลองในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังที่สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลความสัมพันธ์โครงสร้างและความเป็นพิษของสารเคมี

1.2.3 หาความถูกต้องของแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นด้วยการเรียนรู้ของเครื่องคอมพิวเตอร์โดยนำแบบจำลองไปทดสอบกับ Benchmark dataset

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ชุดข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมี

1.3.2 ได้แบบจำลองที่น่าเชื่อถือซึ่งสามารถใช้ทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2. ผลงานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการศึกษา ประกอบไปด้วย ความเป็นพิษทางผิวหนัง และการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนัง การนำข้อมูลเซลล์ HaCaT ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยการเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning) และแบบจำลอง Random forest

2.1 ความเป็นพิษทางผิวหนังและการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนัง

ความเป็นพิษทางผิวหนัง คือ ผลเสียที่เกิดจากการได้รับสารผ่านทางผิวหนัง ทั้งเกิดเฉพาะที่และ/หรือ ต่อทั้งระบบในมนุษย์หรือสัตว์ สามารถทดสอบความเป็นพิษเพื่อประเมินผลกระทบที่เกิดกับผิวหนังได้หลายประเภทแบ่งเป็นการทดสอบพิษเพื่อประเมินการระคายเคืองผิวหนัง การกัดกร่อนผิวหนังและการแพ้ของผิวหนัง (OECD, 2017; Singh, 2016)

2.1.1 การระคายเคืองผิวหนัง

การระคายเคืองผิวหนัง คือ การเกิดความเสียหายต่อผิวหนังชนิดย้อนกลับได้ (Reversible damage) จากการสัมผัสสารเคมี มีสาเหตุมาจากการเกิดการอักเสบเฉพาะที่ โดยลักษณะสำคัญของความเสียหายต่อผิวหนังชนิดนี้จะมีอาการเช่น อาการแดง อาการบวม อาการคันและอาการปวด (Mateeva & Angelova-Fischer, 2014; OECD, 2021)

2.1.2 การกัดกร่อนผิวหนัง

การกัดกร่อนผิวหนัง คือ การเกิดความเสียหายที่ย้อนกลับไม่ได้ต่อผิวหนังซึ่งเกิดจากการได้รับการสัมผัสกับสารเคมี โดยอาจเกิดเนื้อตายที่สังเกตได้อย่างชัดเจน หรือเกิดการตอบสนองในลักษณะอื่น ๆ เช่น การเกิดแผล การมีเลือดไหล การมีสะเก็ดแผล อาจเกิดการขีดของผิวหนัง การหลุดร่วงของขนที่สมบูรณ์ และการเกิดแผลเป็น (Mateeva & Angelova-Fischer, 2014; OECD, 2019)

2.1.3 การแพ้ของผิวหนัง

การแพ้ของผิวหนัง คือ การตอบสนองต่อสารกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง ในมนุษย์การตอบสนองอาจมีลักษณะต่าง ๆ เช่น อาการคัน บวม แดง ผื่นรูปแบบต่าง ๆ ในการแพ้ประเภทอื่น ๆ อาจมีรูปแบบแตกต่างออกไปอาจสังเกตเห็นเพียงอาการบวมแดง (Ibrahim et al., 2017; OECD, 2022)

2.2 การนำข้อมูลเซลล์ HaCaT มาใช้ให้เกิดประโยชน์

เซลล์ HaCaT เป็นเซลล์ไลน์เคราติโนไซต์อมตะของมนุษย์ (Immortalized human keratinocyte cell line) ชนิด aneuploid มักถูกใช้ในงานวิจัยทางพิษวิทยาในการทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารเคมี (Cytotoxicity) โดยหา IC50 ของสารเคมีที่นำมาทดสอบความเป็นพิษ และเนื่องจากการใช้มาอย่างแพร่หลายและยาวนานจึงทำให้มีฐานข้อมูลจำนวนมากสามารถนำมาต่อยอดให้เกิดประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบ หนึ่งในนั้นคือการนำฐานข้อมูลเหล่านี้มาสร้างแบบจำลอง (Pessina et al., 2001; Srisongkram, 2023)

2.3 การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT เพื่อประเมินการความเป็นพิษทางผิวหนัง

Sanchez et al. (2006) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษทางผิวหนังและดวงตาของสารลดแรงตึงผิวแบบประจุลบ 5 ชนิดเพื่อประเมินศักยภาพในการระคายเคือง (Irritation potential) ของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ด้วยการทดสอบในหลอดทดลองด้วยเซลล์ HaCaT โดยการใช้วิธีทดสอบ 2 วิธีคือ Neutral red assay และ MTT assay เพื่อประเมินการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability)

Neutral red assay เป็นการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ซึ่งช่วยในการประเมินความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากสารเคมีในหลอดทดลอง (in vitro) การทดสอบใช้ความสามารถของเซลล์ที่มีชีวิตในการรับและจับ Neutral red ซึ่งเป็นไอออนบวกในไลโซโซม เนื่องจากนั้น ความพิษที่เกิดขึ้นจะแสดงในรูปแบบของการลดการดูดซึมของ Neutral red ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร Neutral red หลังการสัมผัสกับสารเคมี (Ates et al., 2017)

MTT assay เป็นการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิต (viable cell) จะถูกตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ของ MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) เกิดเป็นเกลือฟอร์มาซานสีน้ำเงิน ที่สามารถวัดในเชิงปริมาณหลังจากสกัดจากเนื้อเยื่อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (OECD, 2019, 2021)

การรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ถูกกำหนดโดยจำนวนเซลล์ที่มีสุขภาพดีและการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับการเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับยีน โปรตีน และเส้นทางที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตหรือตายของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารพิษ (Adan et al., 2016)

ผลจากการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังในหลอดทดลองด้วยเซลล์ HaCaT โดยวิธี neutral red assay มีค่า IC50 สูงกว่า วิธี MTT assay แต่ถึงอย่างนั้นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกับความความเป็นพิษของสารเคมีในทั้งสองวิธีก็คล้ายคลึงกัน

2.4 การทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยเซลล์ HaCaT เพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง

Eskes et al. (2019) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำและการทำนายภายในห้องปฏิบัติการ (Intra-lab) ของ The Cocultured Activation Test (COCAT) คือการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT (เซลล์ไลน์เคราติโนไซต์มนุษย์) และเซลล์ THP-1 (ตัวแทนของ antigen presenting cells) ซึ่ง The Cocultured Activation Test (COCAT) ใช้ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง โดยใช้วิธีการทดสอบสารเคมีแบบปกปิด (Blind testing) ผลลัพธ์ของสารเคมี 80% ของ 15 ชนิดที่ใช้วัดค่าการทำซ้ำ คือ 100% สำหรับความไว (sensitivity) 75% สำหรับความจำเพาะ (specificity) 92.3% สำหรับความแม่นยำ (accuracy) และเมื่อนับรวมกับสารเคมีที่ยังไม่ได้ข้อสรุปจะมีความแม่นยำเท่ากับ 87.4% สรุปได้ว่าวิธี COCAT มีแนวโน้มที่ดีในการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง

2.5 การทำนายพิษทางผิวหนังด้วยวิธีการเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning)

Im et al. (2023) ได้ทำการศึกษาการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนังด้วยการใช้การเรียนรู้ของเครื่อง โดยการศึกษานี้ต้องการพัฒนาแบบจำลองการเรียนรู้ของเครื่องที่ใช้งานได้จริงเพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนังด้วยการใช้คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ 3 ประการ ได้แก่ แรงตึงผิว จุดหลอมเหลวและน้ำหนักโมเลกุล

การเรียนรู้ของเครื่อง (Machine learning) เป็นวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่เน้นการศึกษาถึงวิธีการเรียนรู้ของคอมพิวเตอร์จากข้อมูล ซึ่งมุ่งหาที่จะเรียนรู้ความสัมพันธ์เชิงสถิติจากการเน้นการคำนวณอัลกอริทึมที่มีประสิทธิภาพ (Deo, 2015)

ในการศึกษานี้ได้สร้างขึ้นจากข้อมูล Local lymph mode assay ของสารเคมี 482 ชนิดและพัฒนาขึ้นเป็นแบบจำลอง Random Forest เพื่อประเมินการแพ้ของผิวหนัง และได้ตรวจสอบความถูกต้องด้วยสารก่อ

ภูมิแพ้ในน้ำหอม 45 ชนิดที่ถูกประกาศโดยกรมการของสหภาพยุโรป (European Commission) และให้ผลลัพธ์คือคะแนน 54% สำหรับ penal 82% สำหรับ ternary, และ 96% สำหรับ binary ซึ่งดีกว่าโมเดล Support vector machine, QSAR (Chem tunes) และ Linear model สุดท้ายจึงทดสอบความถูกต้องเทียบกับ Direct Peptide Reactivity Assay และผลลัพธ์ที่ได้มีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน

Support vector machine (SVM) คือการแบ่งประเภทข้อมูลหลาย ๆ ประเภทในชุดข้อมูลเรียนรู้ด้วยพื้นผิวระหว่างข้อมูล กล่าวคือ SVM ช่วยให้แบบจำลองมีประสิทธิภาพที่สูงที่สุดด้วยการใช้หลักการลดความเสี่ยงโครงสร้าง (SRM) ซึ่งช่วยลดข้อผิดพลาดทั่วไปของแบบจำลอง แทนที่จะลดความผิดพลาดเฉลี่ยตามชุดข้อมูลเรียนรู้ (Cervantes et al., 2020)

การใช้เทคนิคการหาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารเคมี (Quantitative Structure Activity Relationship; QSAR) เป็นวิธีการที่สามารถเชื่อมโยงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลกับผลกระทบทางชีวเคมี, ทางกายภาพ, เภสัชวิทยา, ชีววิทยา ฯลฯ การใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นจาก QSAR สามารถทำการคำนวณผลกระทบทางเคมี, การค้นพบยาและการทำนายพิษของสารเคมี ในงานวิจัยนี้แบบจำลอง QSAR เป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างผลกระทบทางพิษวิทยากับโครงสร้างทางเคมี (Gajewicz et al., 2012)

Wilm et al. (2021) ได้ทำการศึกษาการทำนายศักยภาพของอาการแพ้ของผิวหนังจากโมเลกุลขนาดเล็กด้วยแบบจำลองการเรียนรู้ของเครื่องที่ฝึกอบรมด้วยคำอธิบายทางชีวภาพ ด้วยการใช้สาร 257 ชนิด และสร้างแบบจำลองที่ดีที่สุดในการศึกษาชื่อว่า Skin Doctor CP:Bio ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 0.82 และ Matthews correlation coefficient (MCC) เท่ากับ 0.53 (ที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.20) และแบบจำลองนี้สามารถนำไปพัฒนาแบบจำลองการเรียนรู้ของเครื่องที่ใช้ในการทำนายความเป็นพิษของโมเลกุลขนาดเล็ก

Matthews correlation coefficient (MCC) มีข้อดีในเรื่องของการใช้ประโยชน์จากสี่ค่า (TP, TN, FP, FN) ของ confusion matrix โดยที่ MCC เป็นรูปแบบของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ Pearson ค่า MCC มีช่วงค่าตั้งแต่ -1 ถึง 1 ค่า -1 แสดงถึงความไม่เห็นด้วยระหว่างค่าที่เป็นจริงและค่าที่ทำนาย ในขณะที่ค่า 1 ใน MCC หมายถึงความเห็นด้วยอย่างสมบูรณ์ระหว่างค่าที่เป็นจริงและค่าที่ทำนาย (Na et al., 2020)

2.6 แบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest)

Ietswaart et al. (2020) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเภสัชวิทยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง (in Vitro) ของผลิตภัณฑ์ยา 2134 ชิ้นกับอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจริงในมนุษย์ และสร้างแบบจำลอง Random forest เพื่อทำนายอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจริงในมนุษย์ด้วยข้อมูลเภสัชวิทยาในหลอดทดลอง (in Vitro) ของยา ซึ่งสามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเภสัชวิทยาในหลอดทดลองของยากับอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจริงในมนุษย์ได้ถึง 221 ความสัมพันธ์

Random forests เป็นวิธีการเรียนรู้สำหรับการจำแนกประเภท การทำนายหรืองานอื่น ๆ ที่ดำเนินการโดยการสร้างต้นไม้การตัดสินใจ (Tree decision) จำนวนมากในการเรียนรู้ สำหรับงานการจำแนกประเภท ผลลัพธ์ของ random forest คือประเภทที่ถูกเลือกโดยต้นไม้ส่วนมากที่สุด สำหรับงานเชิงปริมาณ หรือ regression จะทำโดยการคำนวณเฉลี่ยของการทำนายจากต้นไม้แต่ละต้น (Ho, 1998)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือดำเนินการวิจัย

1. Python
2. Visual studio code
3. Google Colab
4. Chemdoodle
5. Microsoft Excel
6. Microsoft word

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมงานวิจัยที่ใช้สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังโดยใช้ข้อมูลจากงานวิจัยของ Srisongkram. (2023) ซึ่งมีสารเคมีทั้งหมด 469 ตัว มีค่า Potential of Half maximal inhibitory concentration (pIC50) ซึ่งแปลงมาจาก IC50 ของสารเคมีแต่ละตัวที่ถูกทดสอบกับเซลล์เคราติโนไซต์อมตะของมนุษย์ (HaCaT) ด้วยการทำ NRU และ MTT assay มีข้อมูล Canonical Simplified molecular-input line-entry system (SMILES) และมีการตัดข้อมูลในส่วนที่เป็นข้อมูลที่ไม่มี Simplified molecular-input line-entry system (SMILES) ข้อมูลที่เป็นสารผสม (Mixture) ข้อมูลที่เป็นสารเคมีอนินทรีย์ (Inorganic) และข้อมูลซ้ำจากฐานข้อมูลเรียบร้อยแล้ว และใช้ข้อมูลจากงานวิจัยของ Han et al. (2021) เพื่อทดสอบความถูกต้องของแบบจำลองโดยใช้ข้อมูลในส่วนที่เป็นการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง (In vivo) เป็น Benchmark dataset

3.2.2 การปรับแต่งข้อมูล

เนื่องจากข้อมูลในงานวิจัยของ Srisongkram. (2023) ส่วนของค่า negative log cell viability of Half maximal inhibitory concentration (pIC50) ของสารเคมีแต่ละตัวไม่สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างแบบจำลองที่ต้องการจึงมีการแปลงค่าส่วนนี้เป็นข้อมูลรูปแบบ IC50 และสุดท้าย IC50 จะถูกแปลงเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพโดยหากค่า IC50 สูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์จะถูกนับเป็นสารเคมีที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง (Krippendorff

et al., 2007) หากนอกเหนือจากนั้นจะเป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง และข้อมูลจากงานวิจัยของ Han et al. (2021) ต้องแปลงโครงสร้างของสารเคมีแต่ละตัวเป็น SMILES และ Canonical SMILES ตามลำดับ จากนั้นตัดข้อมูลที่เป็สารผสม (Mixture) ข้อมูลที่เป็นสารเคมีอนินทรีย์ (Inorganic) และข้อมูลซ้ำออกจากฐานข้อมูลด้วย

3.2.3 การคำนวณคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

มีการคำนวณคุณสมบัติทางเคมีกายภาพคือ LogP มวลโมเลกุล Hydrogen bond donor (HBD) และ Hydrogen bond acceptor (HBA) เพื่อวิเคราะห์ว่าเราสามารถใช้อนุสมบัติทางเคมีกายภาพในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีได้หรือไม่ ด้วยการสร้างกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LogP กับมวลโมเลกุล และ Hydrogen bond donor (HBD) กับ Hydrogen bond acceptor (HBA) มีการแทนสีสารเคมีที่เป็นพิษด้วยสีแดง และสารเคมีที่ไม่เป็นพิษด้วยสีน้ำเงิน

3.2.4 การคำนวณลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (Molecular Fingerprints)

Canonical Simplified molecular-input line-entry system (SMILES) จะถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลโครงสร้างของสารเคมีก่อนเนื่องจากสามารถอธิบายโครงสร้างโมเลกุลให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลและรูปแบบข้อมูลชุดนี้จะไม่ซ้ำกันในแต่ละสารเคมีด้วยการแปลงมาจาก SMILES จากนั้นคำนวณลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (Molecular Fingerprints) ทั้งในรูปแบบ PubChem และ Substructure ด้วยข้อมูล Canonical SMILES ของสารเคมีโดยใช้ PaDEL descriptor ที่เขียนด้วยภาษา Python จากนั้นนำลายพิมพ์ระดับโมเลกุลไปพัฒนาแบบจำลองเพื่อใช้ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังด้วยการใช้การเรียนรู้ของเครื่อง

3.2.5 สร้างกราฟการวิเคราะห์เชิงองค์ประกอบหลัก (Principal component analysis)

การวิเคราะห์เชิงองค์ประกอบหลัก (PCA) คือวิธีการลดมิติของข้อมูลลงเพื่อให้สามารถสำรวจวิเคราะห์ข้อมูลได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยจะใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (Molecular Fingerprints) ทั้งในรูปแบบ PubChem และ Substructure เพื่อคำนวณเป็น PC score 1 และ PC score 2 จากนั้นนำ Score ที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ PC2 กับ PC1 ทั้งด้วยการใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุล PubChem และ Substructure มีการแทนสีสารเคมีที่เป็นพิษด้วยสีแดงและสารเคมีที่ไม่เป็นพิษด้วยสีฟ้า และใช้ Kernel density estimation (KDE) เพื่อแสดงการกระจายของข้อมูลสารเคมีด้วยวงสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษและวงสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษ

3.2.6 สร้างและออกแบบแบบจำลอง

การสร้างแบบจำลองด้วยการใช้เทคนิคการหาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารเคมี (Quantitative Structure Activity Relationship; QSAR) ร่วมกับการเทคนิคแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ซึ่งเป็นอัลกอริทึมการเรียนรู้ของคอมพิวเตอร์ (machine learning) จะใช้ข้อมูลงานวิจัยของ Srisongkram. (2023) เพื่อเป็นข้อมูลในการสร้างแบบจำลอง โดยทำการแบ่งชุดข้อมูลออกเป็น 2 ชุด ในสัดส่วน 70:30 คือข้อมูลชุดเรียนรู้ (training set) มีทั้งสิ้น 328 ตัว และข้อมูลชุดทดสอบ (Test set) มีทั้งสิ้น 141 ตัว

ในส่วนข้อมูลชุดเรียนรู้ที่ใช้สำหรับสร้างแบบจำลองจะมีการตัดค่าที่เป็นค่าคงที่และค่าที่มีความสัมพันธ์สูงมากกว่า 0.7 ออก เนื่องจากจำนวนลายพิมพ์ระดับโมเลกุลมีจำนวนมาก และมีความเป็นไปได้ที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลหลายลายพิมพ์ที่ส่งผลคล้ายคลึงกัน จึงสามารถตัดออกเพื่อให้เหลือเพียงลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษและลดความซับซ้อนของแบบจำลองลง

จากนั้นจึงทำการปรับพารามิเตอร์ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส คือ จำนวนการตัดสินใจเริ่มต้น ($n_estimators$) ความลึกของการตัดสินใจ (Max depth) และจำนวนลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่จำเป็นต่อการตัดสินใจ (Max features) โดยจะกำหนดเริ่มต้นที่ $n_estimators = 10, 100, 1000$ max depth = 5, 10, 15 max depth = 10, 20, 30 เพื่อค้นหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในช่วงเริ่มต้น และทำการสุ่มพารามิเตอร์อย่างละเอียดยีกครั้งเพื่อสร้างแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด จากนั้นจึงนำแบบจำลองสุดท้ายที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพและใช้งานจริง

3.2.7 ประเมินและตรวจทานแบบจำลอง

การทดสอบภาวะสารูปสนิทธิ (Goodness-of-fit test) จะถูกใช้ในการประเมินแบบจำลองการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความเป็นพิษทางผิวหนังของสารด้วยการเรียนรู้ของเครื่อง (OECD, 2014) โดยใช้ Confusion matrix ในประเมินด้านความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) และมีตัวแปร 4 ตัวที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณ (Bank & Schmehl, 1989; Wang et al., 2010) ได้แก่

- 1) True positive (TP) คือ สิ่งที่ทำนายตรงกับสิ่งที่เกิดขึ้นจริง กรณีทำนายได้ผลบวก สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลบวก
- 2) True negative (TN) คือ สิ่งที่ทำนายตรงกับสิ่งที่เกิดขึ้นจริง กรณีทำนายได้ผลลบ สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลลบ

- 3) False positive (FP) คือ สิ่งที่ทำนายไม่ตรงกับสิ่งที่เกิดขึ้นจริง กรณีทำนายได้ผลบวก สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลลบ
- 4) False negative (FN) คือ สิ่งที่ทำนายไม่ตรงกับสิ่งที่เกิดขึ้นจริง กรณีทำนายได้ผลลบ สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลบวก

ตารางที่ 1 แสดง Confusion matrix

Confusion matrix	สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลบวก	สิ่งที่เกิดขึ้นให้ผลลบ
ทำนายได้ผลบวก	True positive	False positive
ทำนายได้ผลลบ	False negative	True negative

ความไว (sensitivity) คือ สัดส่วนผลบวกที่เป็นจริง ใช้แยกผลลบที่ไม่เป็นจริงออกเนื่องจากยิ่งความไวมากเท่าใด โอกาสได้ผลลบที่ไม่เป็นจริงยิ่งน้อยลงเท่านั้น คำนวณได้จาก $\text{Sensitivity} = \text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})$

ความจำเพาะ (specificity) คือ สัดส่วนผลลบที่เป็นจริง ใช้แยกผลบวกที่ไม่เป็นจริงออก ยิ่งความจำเพาะสูงเท่าใด ยิ่งสามารถแยกผลลบที่ไม่เป็นจริงได้มากเท่านั้น คำนวณได้จาก $\text{Specificity} = \text{TN}/(\text{TN} + \text{FP})$

ความถูกต้อง (Accuracy) คือ ความสามารถที่บ่งบอกว่าการทดสอบมีผลใกล้เคียงกับค่าจริง คำนวณได้จาก $\text{Accuracy} = (\text{TP} + \text{TN})/(\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN})$

ความแม่นยำ (Precision) คือ ความสามารถในการจำแนกผลบวกจริงจากผลบวกทั้งหมด คำนวณได้จาก $\text{Precision} = \text{TP}/(\text{TP} + \text{FP})$

โดยจะทำการทดสอบชุดข้อมูล 3 รูปแบบ คือ 1)การทดสอบด้วยชุดข้อมูลเรียนรู้ (training set) 2)การทดสอบ Cross validation ที่ละ 5 ข้อมูล 3)ทดสอบด้วยชุดทดสอบ (test set) และจะใช้ข้อมูลจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ (Test set) เป็นประสิทธิภาพของแบบจำลอง

3.2.8 Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve

Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองรูปแบบคือลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem และแบบ Substructure โดยจะแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริง (True positive rate) กับอัตราผลบวกไม่จริง (False positive rate) และค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve: AUC) ซึ่งบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของความสามารถในการทำนายของแบบจำลอง โดย $\text{AUC} = 1$ หมายถึงมีความสามารถในการทำนายสูงที่สุด

3.2.9 ตรวจสอบประสิทธิภาพของแบบจำลองในพื้นที่การใช้ประโยชน์ (Applicability Domain)

พื้นที่การใช้ประโยชน์ คือ พื้นที่ที่แบบจำลองสามารถทำนายได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงทางโครงสร้างเคมีหรือลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของสารเคมีที่ใช้สร้างแบบจำลองและสารเคมีทดสอบ โดยใช้สมการทั้งสองในการแบ่งสารเคมีที่อยู่ในพื้นที่การใช้ประโยชน์และสารเคมีที่อยู่นอกพื้นที่การใช้ประโยชน์

ถ้า $D_i < D_k + (z \times s_k)$ สารเคมีอยู่ในพื้นที่การใช้ประโยชน์

หาก $D_i \geq D_k + (z \times s_k)$ สารเคมีจะอยู่นอกพื้นที่การใช้ประโยชน์

โดย D_i = ระยะห่างระหว่างสารเคมีที่ทำนายกับสารเคมีที่ใกล้เคียงที่สุด

D_k and s_k = ค่าเฉลี่ยและ SD ของ D_i แต่ละตัวในชุดข้อมูลเรียนรู้

z = ค่าที่ใช้บ่งชี้ถึงนัยสำคัญ และเราใช้ $z = 0.5$

จากนั้นสร้างแผนภูมิที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Matrix value กับ K value เพื่อหา K value ที่ทำให้แบบจำลองมีค่า Matrix value เหมาะสมที่สุดในการใช้งาน

3.2.10 ตรวจสอบลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลอง

ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลองถูกสร้างจากอัลกอริทึม SHAP ที่เขียนด้วยภาษา Python เพื่อวิเคราะห์หาลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่แบบจำลองให้ความสำคัญสูงเพื่อทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมี และใช้ Chemdoodle ในการสร้างลายพิมพ์ระดับโมเลกุลเพื่อแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของลายพิมพ์ระดับโมเลกุลนั้น ๆ

SHAP (Shapley additive explanations) เป็นวิธีการทฤษฎีเกมในการอธิบายผลลัพธ์ของแบบจำลองการเรียนรู้ของเครื่อง โดยสามารถกำหนดค่าความสำคัญของแต่ละคุณลักษณะสำหรับการทำนายใด ๆ

3.2.11 ทดสอบแบบจำลองกับ Benchmark dataset

ทดสอบแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองรูปแบบทั้ง PubChem และ Substructure กับ Benchmark dataset ที่อยู่ใน Applicability Domain เพื่อหาความถูกต้องในการทำนายของแบบจำลองที่สร้างขึ้น

3.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

1.4.1 เป็นการวิจัยโดยใช้การเรียนรู้ของเครื่องคอมพิวเตอร์ (Machine learning) เพื่อสร้างแบบจำลอง และใช้ทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีโดยใช้ข้อมูลจากงานวิจัยของ Srisongkram. (2023)

1.4.2 ข้อจำกัดในรูปแบบของข้อมูลที่นำมาใช้สร้างแบบจำลองการจำแนกประเภท (Classification) ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนัง โดยในงานวิจัยนี้ใช้ pIC50 แล้วทำการแปลงค่าเป็นข้อมูลสำหรับทำแบบจำลองที่ต้องการ

3.4 แผนการดำเนินการเกี่ยวกับกิจกรรมและระยะเวลาในการทำวิจัย (ระยะเวลา 3-6 เดือน)

ตารางที่ 2 แสดงแผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินงาน	พ.ศ. 2566					พ.ศ. 2567	
	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.
1.จัดทำเค้าโครง							
2.รวบรวมข้อมูลสำหรับสร้างแบบจำลอง							
3.สร้างและออกแบบแบบจำลอง							
4.ประเมินและตรวจทานแบบจำลอง							
5.วิเคราะห์ข้อมูลด้วยแบบจำลองและประเมินประสิทธิภาพของแบบจำลอง							
6.สรุปผลการศึกษาในการพัฒนาแบบจำลองการเรียนรู้ของเครื่อง จัดทำรูปเล่มและเสนอโครงการวิจัย							

3.5 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.6 งบประมาณ

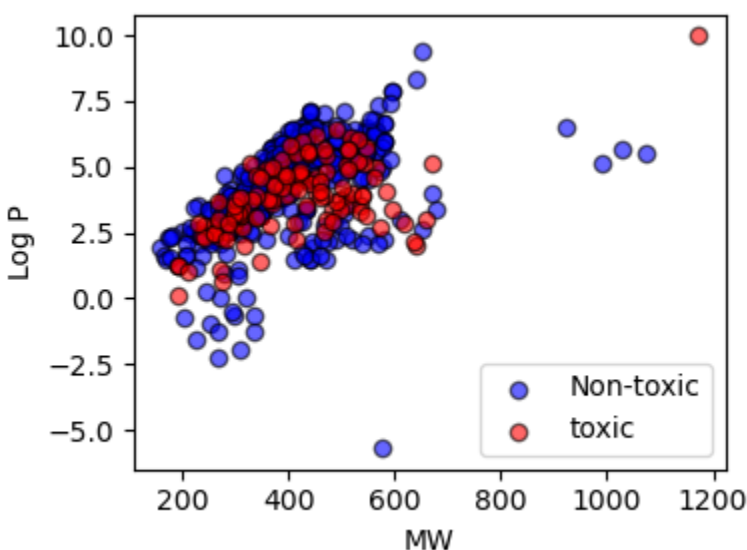
งบประมาณจัดโครงการ จากการสนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์ เป็นเงินทั้งสิ้น 2,000 บาท

บทที่ 4

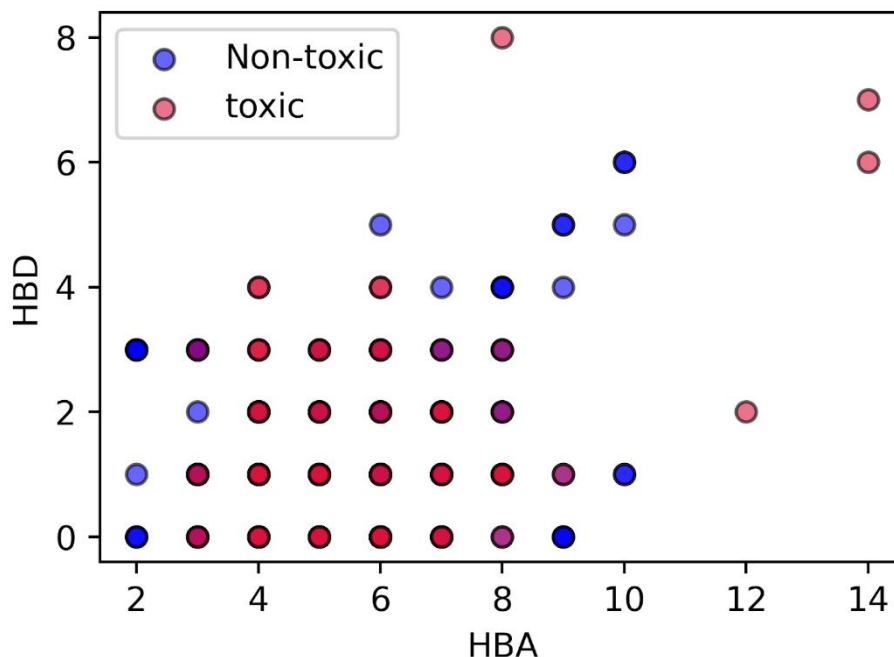
ผลการทดลอง

4.1 ชุดข้อมูลสำหรับทำแบบจำลอง

การทดลองได้เน้นการวิเคราะห์การกระจายของสารเคมีโดยใช้คุณลักษณะทางเคมีกายภาพและลายพิมพ์ระดับโมเลกุลต่าง ๆ รูปที่ 1 แสดงการกระจายของสารเคมีจำนวน 469 ตัวด้วยการใช้ลักษณะทางเคมีกายภาพคือ LogP กับมวลโมเลกุลโดยใช้อัลกอริทึมที่สร้างด้วยภาษา Python มีค่าเฉลี่ยมวลโมเลกุลอยู่ที่ 400.68 ± 127.49 และมี LogP เฉลี่ยอยู่ที่ 4.0 ± 1.79 และรูปที่ 2 แสดงการกระจายของสารเคมีจำนวน 469 ตัว ด้วยการใช้ลักษณะทางเคมีกายภาพคือ Hydrogen bond donor (HBD) กับ Hydrogen bond acceptor (HBA) โดยใช้อัลกอริทึมที่สร้างด้วยภาษา Python พบว่ามีค่าเฉลี่ย HBD เท่ากับ 1.29 ± 1.26 และค่าเฉลี่ย HBA เท่ากับ 5.3 ± 2.1 ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษและวงกลมสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษ จากผลลัพธ์ที่ได้บ่งชี้ว่าไม่สามารถแยกสารเคมีที่เป็นพิษต่อผิวหนังด้วยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เมื่อดูจากรูปจะพบว่าสารเคมีที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพคล้ายคลึงกัน



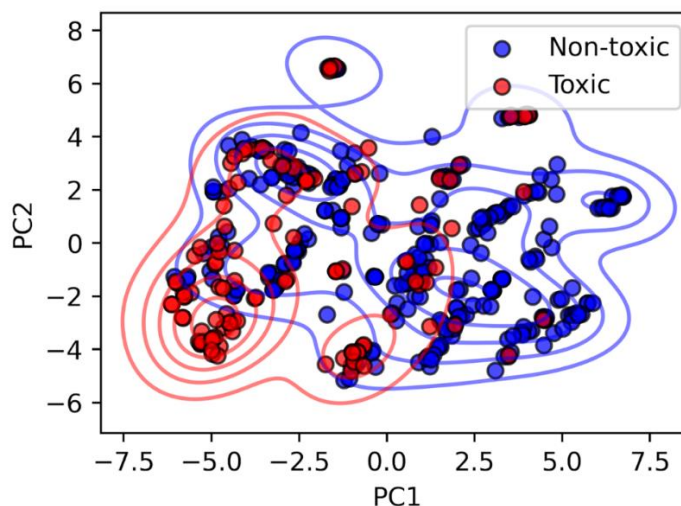
รูปที่ 1 แสดงการกระจายของโมเลกุลจำนวน 469 ตัวด้วยการใช้ลักษณะทางเคมีกายภาพคือ logP กับมวลโมเลกุล ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับโมเลกุลที่ไม่เป็นพิษและวงกลมสีแดงสำหรับโมเลกุลที่เป็นพิษ



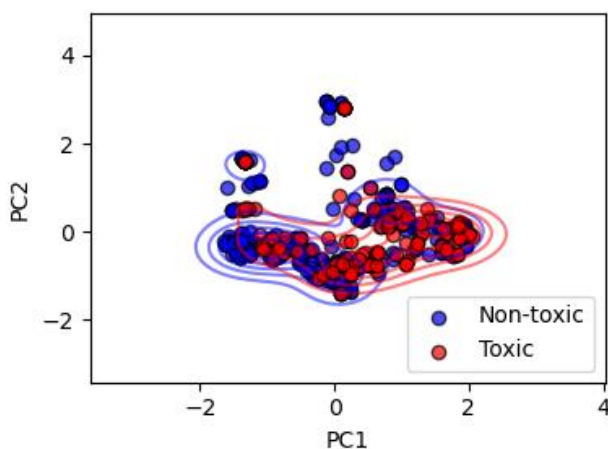
รูปที่ 2 แสดงการกระจายของสารเคมีจำนวน 469 โมเลกุลด้วยการใช้ลักษณะทางเคมีกายภาพคือ Hydrogen bond donor กับ Hydrogen bond acceptor ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษ และวงกลมสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษ

4.2 การวิเคราะห์เชิงองค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA)

การทดลองได้เน้นการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง PC score 1 กับ PC score 2 ที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ PubChem และ Substructure ของสารเคมี 469 โมเลกุล ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษและวงกลมสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษ ดังรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ และมี Kernel density estimation (KDE) ซึ่งแสดงถึงการกระจายของข้อมูล โดยมีวงสีฟ้าแทนการกระจายของสารเคมีที่ไม่เป็นพิษ ขณะที่สีแดงแทนการกระจายของสารเคมีที่เป็นพิษ จากผลลัพธ์บ่งชี้ว่าไม่สามารถแยกสารเคมีที่เป็นพิษต่อผิวหนังด้วยการทำการวิเคราะห์เชิงองค์ประกอบหลัก (PCA) ได้ เมื่อสังเกตจากรูปจะพบว่าสารเคมีที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษมีการกระจายคล้ายคลึงกันเหมือนดังที่แสดงด้วย KDE ของทั้งสองที่ซ้อนทับกัน



รูปที่ 3 การกระจายของสารเคมี 469 โมเลกุลด้วยการใช้ Principal component Score 1 กับ Principal component Score 2 โดยการแปลงจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของ PubChem ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษและวงกลมสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษ

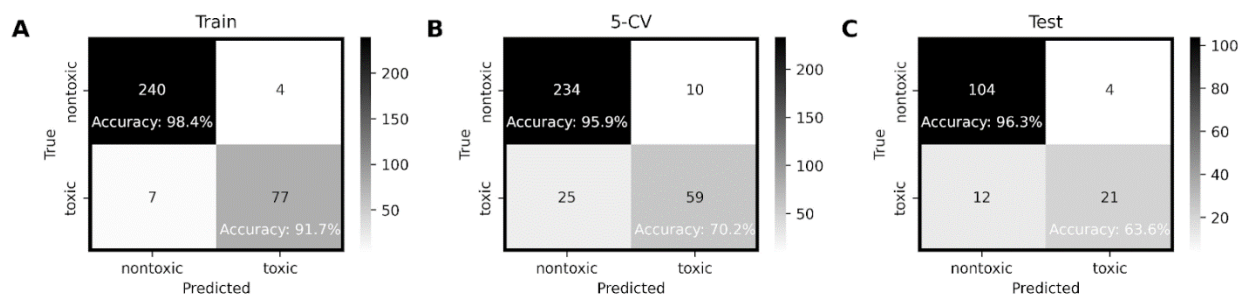


รูปที่ 4 การกระจายของสารเคมี 469 โมเลกุลด้วยการใช้ Principal component Score 1 กับ Principal component Score 2 โดยการแปลงจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของ Substructure ซึ่งแทนจุดข้อมูลเป็นวงกลมสีน้ำเงินสำหรับสารเคมีที่ไม่เป็นพิษและวงกลมสีแดงสำหรับสารเคมีที่เป็นพิษ

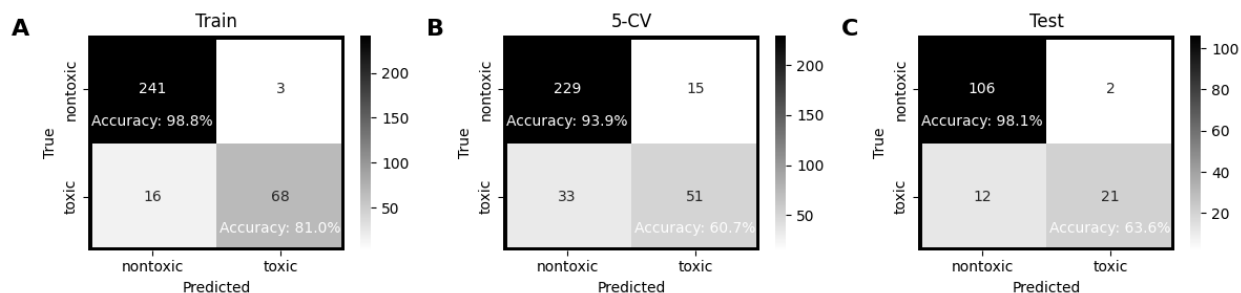
4.3 การสร้างและตรวจทานแบบจำลอง

ใช้อัลกอริทึมสร้างแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ด้วยภาษา Python โดยให้ตัวแปรต้นเป็นลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem และแบบ Substructure ในขณะที่ตัวแปรตามเป็นความเป็นพิษทางผิวหนังเพื่อใช้ทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของสารเคมีที่ต้องการ และหาประสิทธิภาพของแบบจำลองโดยดูจากค่าตัวแปร ดังรูปที่ 5 และ 6 และพารามิเตอร์ที่แสดงประสิทธิภาพของแบบจำลอง ได้แก่ ความถูกต้อง (Accuracy) แม่นยำ (Precision) ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ดังตารางที่ 2 ซึ่งบ่งชี้ว่าแบบจำลองที่สร้างด้วยลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันและสามารถใช้ในการทำนายความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมีโดยใช้ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลของสารเคมีนั้นได้

ตาราง confusion matrix ที่แสดงผลลัพธ์ของการทดสอบแบบจำลองโดยแสดงดังรูปที่ 5 และ 6 ซึ่งแบ่งเป็นการทดสอบแบบจำลองด้วยชุดข้อมูลเรียนรู้ (training set) การทดสอบแบบ Cross validation และการทดสอบด้วยชุดทดสอบ (test set)



รูปที่ 5 Confusion matrix ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem A) เป็นการทดสอบด้วยชุดข้อมูลเรียนรู้ (training set) B) เป็นการทดสอบ Cross validation ทีละ 5 ข้อมูล C) เป็นการทดสอบด้วยชุดทดสอบ (test set)

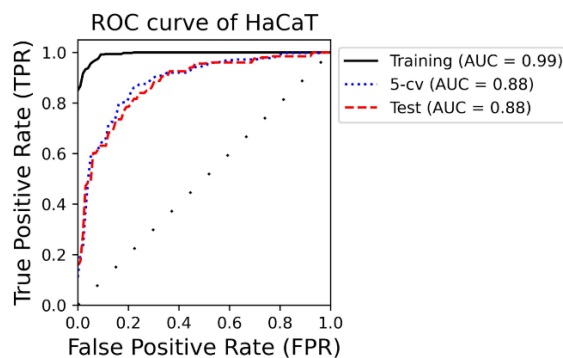


รูปที่ 6 Confusion matrix ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ Substructure A) เป็นการทดสอบด้วยชุดข้อมูลเรียนรู้ (training set) B) เป็นการทดสอบ Cross validation ที่ละ 5 ข้อมูล C) เป็นการทดสอบด้วยชุดทดสอบ (test set)

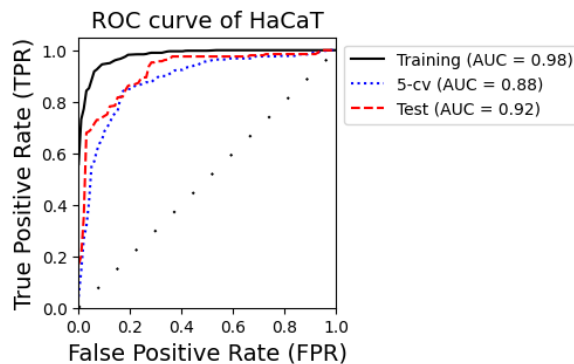
ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองรูปแบบคือลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem และแบบ Substructure

Model	accuracy			precision			sensitivity			specificity		
	train	cv	test	train	cv	test	train	cv	test	train	cv	test
PubChem	0.97	0.89	0.89	0.95	0.85	0.84	0.92	0.70	0.64	0.98	0.96	0.96
Substructure	0.94	0.85	0.90	0.96	0.77	0.91	0.81	0.61	0.64	0.99	0.94	0.98

Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองรูปแบบคือลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem และแบบ Substructure ดังรูปที่ 7 และ 8 โดยผลลัพธ์ทั้งสองบ่งชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองทั้งสองที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการทำนายได้ดีเนื่องจากมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve: AUC) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 88



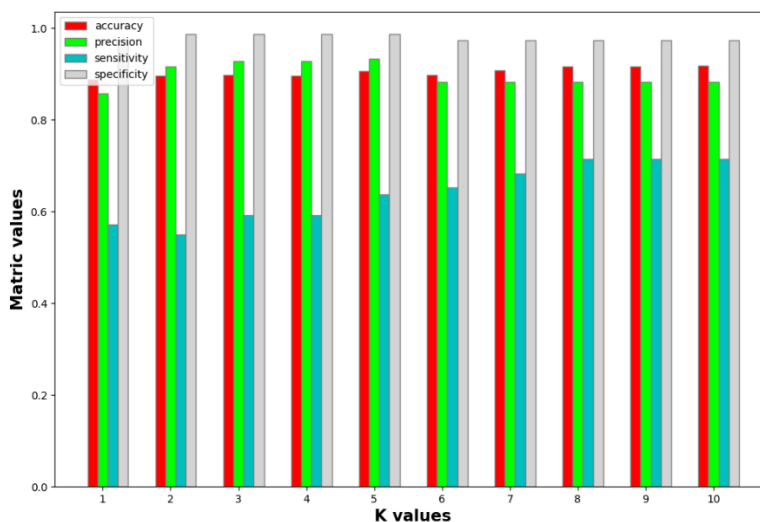
รูปที่ 7 Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem



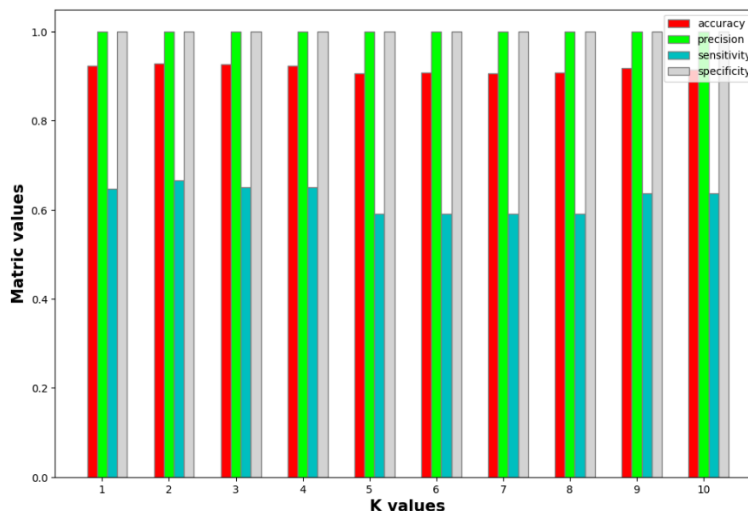
รูปที่ 8 Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve ของแบบจำลองแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ Substructure

4.4 พื้นที่การใช้ประโยชน์ (Applicability Domain)

แบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยลายพิมพ์ระดับโมเลกุล PubChem มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อใช้ค่า k nearest neighbor (kNN) ที่ 10 ขณะที่แบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยลายพิมพ์ระดับโมเลกุล Substructure มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อใช้ค่า k nearest neighbor (kNN) ที่ 3 สังเกตได้จากรูปที่ 9 และ 10 ซึ่งเป็นแผนภูมิแสดงพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพแบบจำลองกับค่า k nearest neighbor (kNN) โดยสังเกตจากค่าความถูกต้อง (Accuracy) เป็นหลัก



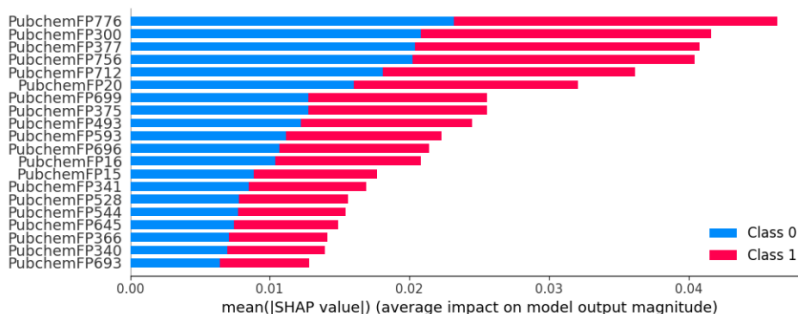
รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Matric value และ K values ของแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem



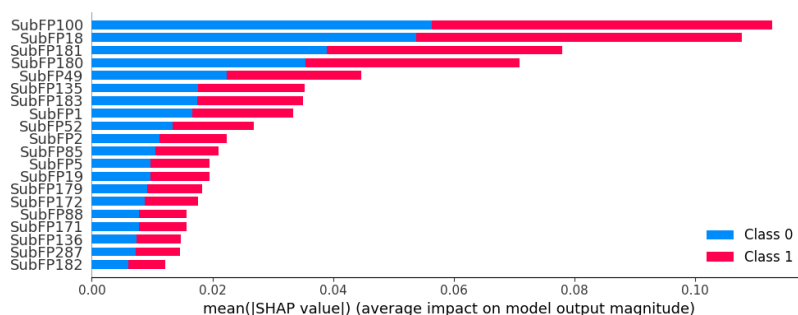
รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Matric value และ K values ของแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ Substructure

4.5 ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลอง

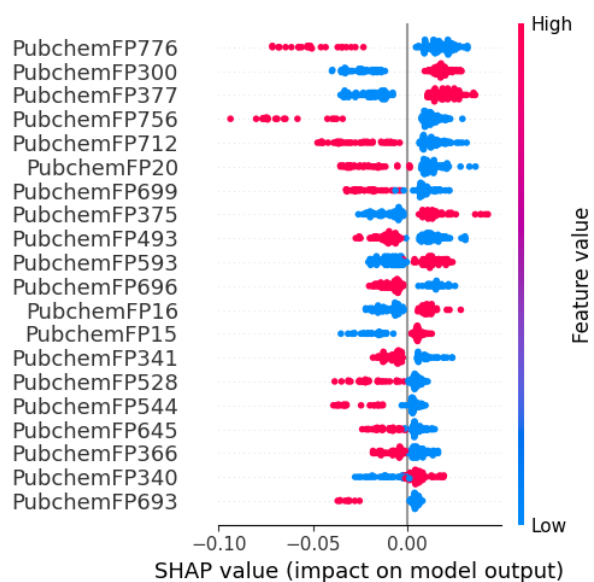
ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลทั้งสองรูปแบบแสดงดังรูปที่ 11 และ 12 บ่งชี้ว่าลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่อยู่ด้านบนสุดของรูปส่งผลต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของสารเคมีมากที่สุดในแต่ละแบบจำลอง และผลกระทบที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญเหล่านี้สร้างขึ้นเป็นผลกระทบรูปแบบใด (ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษทางผิวหนังหรือไม่) แสดงดังรูปที่ 13 และ 14 โดยหาก SHAP value ที่เป็นบวกแสดงเป็นสีฟ้า (สีฟ้าทางด้านขวาของรูป) เช่น PubChemFP776 บ่งชี้ว่าลายพิมพ์ระดับโมเลกุลนั้นส่งผลให้ไม่เกิดความเป็นพิษทางผิวหนัง ขณะที่ SHAP value ที่เป็นบวกแสดงเป็นสีแดง (สีแดงทางด้านขวาของรูป) เช่น PubChemFP300 บ่งชี้ว่าลายพิมพ์ระดับโมเลกุลนั้นส่งผลให้เกิดความเป็นพิษทางผิวหนังของสารเคมี



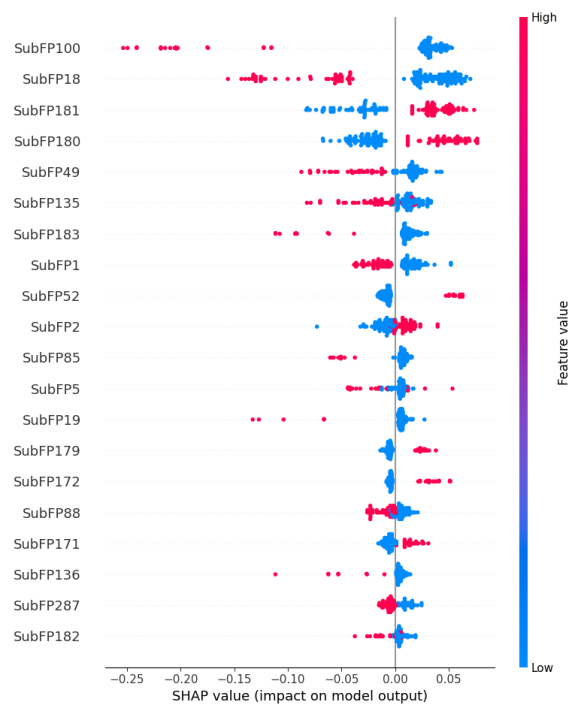
รูปที่ 11 แสดงถึงสำคัญของลายพิมพ์ระดับโมเลกุลต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุล PubChem



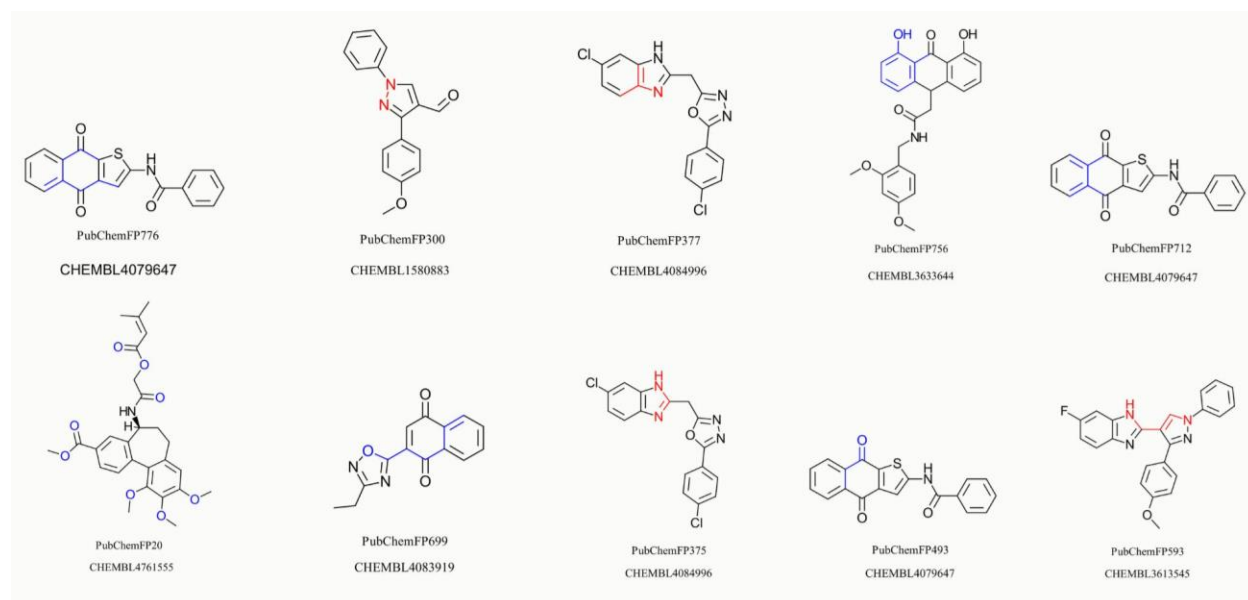
รูปที่ 12 แสดงถึงความสำคัญของลายพิมพ์ระดับโมเลกุลต่อการทำนายพิษทางผิวหนังของแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุล Substructure



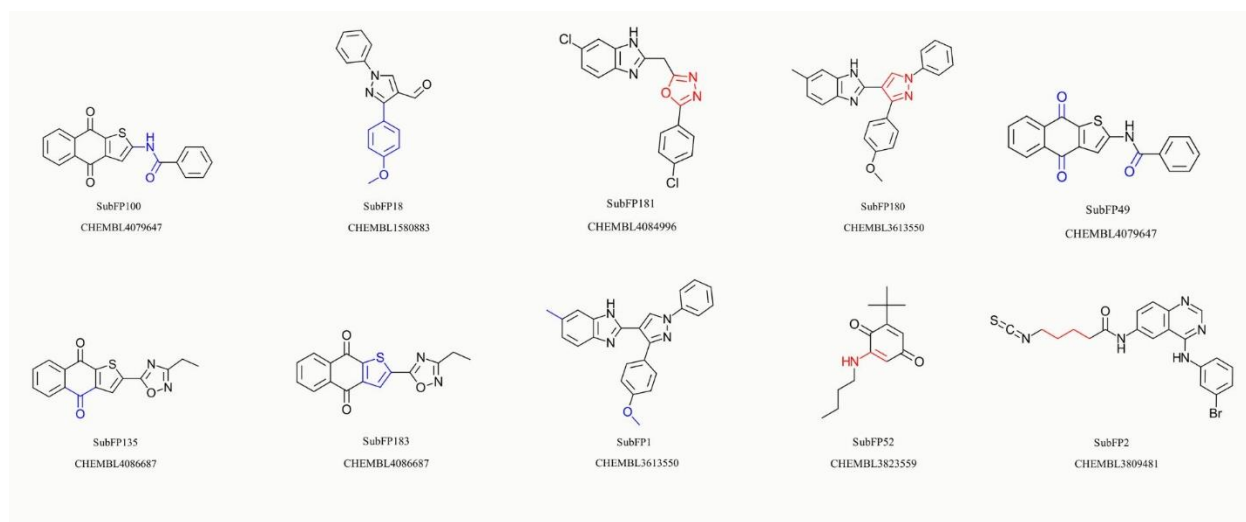
รูปที่ 13 แสดงถึงผลลัพธ์ที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญสร้างขึ้นของแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุล PubChem



รูปที่ 14 แสดงถึงผลลัพธ์ที่ลายพิมพ์ระดับโมเลกุลที่สำคัญสร้างขึ้นของแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุล Substructure



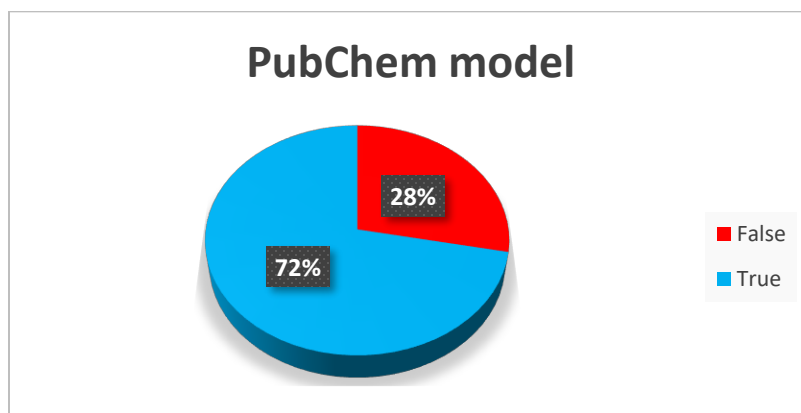
รูปที่ 15 ตัวอย่างลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ PubChem ที่สำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำนาย



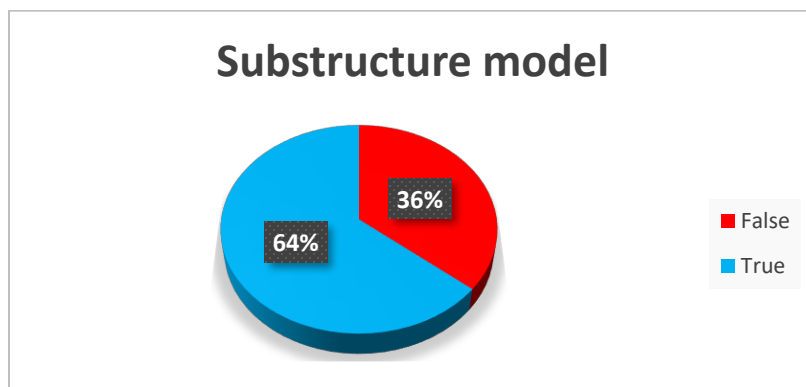
รูปที่ 16 ตัวอย่างลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ Substructure ที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการทำนาย

4.6 ความถูกต้องในการทำนาย Benchmark dataset ของแบบจำลอง

ผลลัพธ์หลังจากทดสอบแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ PubChem และ Substructure กับข้อมูลชุดทดสอบที่อยู่ใน Applicability Domain ซึ่งมีสารเคมีทั้งสิ้น 64 ตัว มีอัตราความถูกต้องอยู่ที่ 73% และ 64% ตามลำดับ แสดงให้เห็นดังรูปที่ 19 และ 20



รูปที่ 17 ผลลัพธ์หลังจากทดสอบแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ PubChem กับข้อมูลชุดทดสอบที่อยู่ใน Applicability Domain ซึ่งมีสารเคมีทั้งสิ้น 64 ตัว มีอัตราความถูกต้องอยู่ที่ 72%



รูปที่ 18 ผลลัพธ์หลังจากทดสอบแบบจำลองที่สร้างจากลายพิมพ์ระดับโมเลกุลรูปแบบ Substructure กับข้อมูลชุดทดสอบที่อยู่ใน Applicability Domain ซึ่งมีสารเคมีทั้งสิ้น 64 ตัว มีอัตราความถูกต้องอยู่ที่ 64%

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถใช้ข้อมูลจากงานวิจัยของ Srisongkram. (2023) เป็นฐานข้อมูลโดยมีสารเคมีทั้งหมด 469 ตัว ในการสร้างแบบจำลองด้วยการใช้เทคนิคการหาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารเคมี (Quantitative Structure Activity Relationship; QSAR) ร่วมกับการเทคนิคแรนดอมฟอเรส (Random Forest) ซึ่งเป็นอัลกอริทึมการเรียนรู้ของคอมพิวเตอร์ (machine learning) มีประสิทธิภาพในการทำนายความเป็นพิษได้ในโดยมีช่วง Matrix value ของแบบจำลองทั้งที่สร้างด้วยลายพิมพ์ระดับโมเลกุลแบบ PubChem และ Substructure ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 64-98 ซึ่งมีค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความจำเพาะ (Specificity) สูงกว่าการทดสอบในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ EpiSkin™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24 และ KeraSkin™ (Han et al., 2021) และสามารถนำแบบจำลองที่สร้างขึ้นไปทำนายความเป็นพิษของ Benchmark dataset ได้ผลลัพธ์คือมีความถูกต้องอยู่ที่ร้อยละ 72 และ 64 ด้วยแบบจำลองที่สร้างด้วยลายพิมพ์โมเลกุลแบบ PubChem และ Substructure ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221.
<https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Rodrigues, R. M. (2017). Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1601, 19–26.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2
- Bank, H. L., & Schmehl, M. K. (1989). Parameters for evaluation of viability assays: Accuracy, precision, specificity, sensitivity, and standardization. *Cryobiology*, 26(3), 203–211.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(89\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90015-1)
- Boelsma, E., Verhoeven, M. C., & Ponc, M. (1999). Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *The Journal of Investigative Dermatology*, 112(4), 489–498. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771.
<https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Cervantes, J., Garcia-Lamont, F., Rodríguez-Mazahua, L., & Lopez, A. (2020). A comprehensive survey on support vector machine classification: Applications, challenges and trends. *Neurocomputing*, 408, 189–215. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2019.10.118>
- Deo, R. C. (2015). Machine Learning in Medicine. *Circulation*, 132(20), 1920–1930.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.001593>
- Eskes, C., Hennen, J., Schellenberger, M. T., Hoffmann, S., Frey, S., Goldinger-Oggier, D., Peter, N., Van Vliet, E., & Blömeke, B. (2019). The HaCaT/THP-1 Cocultured Activation Test (COCAT)

- for skin sensitization: A study of intra-lab reproducibility and predictivity. *ALTEx*, 36(4), 613–622. <https://doi.org/10.14573/altex.1905031>
- Gajewicz, A., Rasulev, B., Dinadayalane, T. C., Urbaszek, P., Puzyn, T., Leszczynska, D., & Leszczynski, J. (2012). Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(15), 1663–1693. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.014>
- Han, J., Lee, G.-Y., Bae, G., Kang, M.-J., & Lim, K.-M. (2021). ChemSkin Reference Chemical Database for the Development of an In Vitro Skin Irritation Test. *Toxics*, 9(11), 314. <https://doi.org/10.3390/toxics9110314>
- Ho, T. K. (1998). The random subspace method for constructing decision forests. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 20(8), 832–844. <https://doi.org/10.1109/34.709601>
- Ibrahim, M. S., El-Wassefy, N. A., & Farahat, D. S. (2017). 8—Biocompatibility of dental biomaterials. In L. Tayebi & K. Moharamzadeh (Eds.), *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering* (pp. 117–140). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00008-6>
- Ietswaart, R., Arat, S., Chen, A. X., Farahmand, S., Kim, B., DuMouchel, W., Armstrong, D., Fekete, A., Sutherland, J. J., & Urban, L. (2020). Machine learning guided association of adverse drug reactions with in vitro target-based pharmacology. *EBioMedicine*, 57, 102837. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102837>
- Im, J. E., Lee, J. D., Kim, H. Y., Kim, H. R., Seo, D.-W., & Kim, K.-B. (2023). Prediction of skin sensitization using machine learning. *Toxicology in Vitro*, 93, 105690. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105690>
- Krippendorff, B.-F., Lienau, P., Reichel, A., & Huisinga, W. (2007). Optimizing Classification of Drug-Drug Interaction Potential for CYP450 Isoenzyme Inhibition Assays in Early Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(1), 92–99. <https://doi.org/10.1177/1087057106295897>

- Mateeva, V., & Angelova-Fischer, I. (2014). Chapter 2 - Irritant Contact Dermatitis: Clinical Aspects. In H. Maibach & G. Honari (Eds.), *Applied Dermatotoxicology* (pp. 11–39). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420130-9.00002-5>
- Na, K.-S., Geem, Z. W., & Cho, S.-E. (2020). Machine learning-based prediction of persistent oppositional defiant behavior for 5 years. *Nordic Journal of Psychiatry*, 74(7), 505–510. <https://doi.org/10.1080/08039488.2020.1748711>
- OECD. (2014). *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models*. <https://doi.org/10.1787/9789264085442-en>
- OECD. (2017). *Guidance on Grouping of Chemicals, Second Edition*. <https://doi.org/10.1787/9789264274679-en>
- OECD. (2019). *Test No. 431: In vitro skin corrosion: Reconstructed human epidermis (RHE) test method*. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>
- OECD. (2021). *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- OECD. (2022). *Test No. 406: Skin Sensitisation*. <https://doi.org/10.1787/9789264070660-en>
- Pessina, A., Raimondi, A., Cerri, A., Piccirillo, M., Neri, M. G., Croera, C., Foti, P., & Berti, E. (2001). High sensitivity of human epidermal keratinocytes (HaCaT) to topoisomerase inhibitors. *Cell Proliferation*, 34(4), 243–252. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7722.2001.00214.x>
- Sanchez, L., Mitjans, M., Infante, M. R., & Vinardell, M. P. (2006). Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicology Letters*, 161(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.015>
- Şenkal, S., Burukçu, D., Hayal, T. B., Kiratlı, B., Şişli, H. B., Sağraç, D., Asutay, B., Sümer, E., Şahin, F., & Doğan, A. (2022). 3D CULTURE OF HaCaT KERATINOCYTE CELL LINE AS AN in vitro TOXICITY MODEL. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 23(2), 211–220. <https://doi.org/10.23902/trkjnat.1158811>

- Singh, A. K. (2016). Chapter 7—Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. In A. K. Singh (Ed.), *Engineered Nanoparticles* (pp. 295–341). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00007-8>
- Srisongkram, T. (2023). Ensemble Quantitative Read-Across Structure–Activity Relationship Algorithm for Predicting Skin Cytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 36(12), 1961–1972. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00238>
- Wang, N., Zeng, N. N., & Zhu, W. (2010). *Sensitivity, Specificity, Accuracy, Associated Confidence Interval And ROC Analysis With Practical SAS Implementations*.
- Wilm, A., Garcia de Lomana, M., Stork, C., Mathai, N., Hirte, S., Norinder, U., Kühnl, J., & Kirchmair, J. (2021). Predicting the Skin Sensitization Potential of Small Molecules with Machine Learning Models Trained on Biologically Meaningful Descriptors. *Pharmaceuticals*, 14(8), 790. <https://doi.org/10.3390/ph14080790>
- Wilson, V. G. (2014). Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1195, 33–41. https://doi.org/10.1007/7651_2013_42