



# KİMYASALLARIN OLUŞTURDUĞU ALERJİK TEMAS DERMATİT POTANSİYELİNİN DOĞRUDAN PEPTİT REAKTİVİTE YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

*ASSESSMENT OF THE POTENTIAL OF ALLERGIC CONTACT DERMATITIS BY CHEMICALS BY DIRECT PEPTIDE REACTIVITY METHOD*

Özge ÜLKER<sup>1\*</sup> , Alper GÖKBULUT<sup>2</sup> , Nuran COŞKUN<sup>1</sup> , Pelin KAVAS<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Kozmetik ürün, farklı kimyasal bileşiklerin bir kombinasyonu olup genellikle cilt koşullarını veya insan vücudunun kokusunu temizlemek ve iyileştirmek için kullanılır, güzelliği artırır. AB'de, bitmiş kozmetik ürünler üzerinde hayvan testlerinin kullanılmasına ilişkin bir test yasağı 2004'ten beri yürürlükteyken, 2013'te deri hassasiyet testi de dahil olmak üzere her türlü hayvan toksisitesi testi için bir pazarlama yasağı yürürlüğe girmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Deri hassasiyet testi için ECVAM tarafından üç farklı in-vitro ve bir kimyasal yöntem geliştirilmiş ve onaylanmıştır. Doğrudan Peptit Reaktivite Deneyi (DPRA) bir in-chemico yöntemidir. Testin amacı, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesine katkıda bulunmaktır. Düşük moleküler ağırlıklı maddelerin (haptener) ciltteki proteinlere kovalent bağlanması olan haptenizasyon, alerjide önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, DPRA gibi peptit reaktivite deneylerinden elde edilen bilgiler, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesi hakkında bilgi sağlar. Çalışmamızda hassasiyet potansiyeli bilinen kimyasalları uygulanarak DPRA'yı kılavuza göre kurmak amaçlanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Kozmetik bileşenlerin deri hassasiyet sınıflandırmasına yönelik DPRA çalışmamızın sonuçları, bu kimyasallar ile yapılan önceki in-vivo ve ex-vivo çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Çalışmaya eklenen ve kuvvetli iritasyon özelliğine sahip sodyum dodesil sülfat (SDS) uygulaması, DPRA yönteminin iritasyon ve alerji ayırımı yapabileceğini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Daha güvenilir bir deri hassasiyet değerlendirmesi sağlamak için iki veya daha fazla yaklaşımdan elde edilen en iyi sonuçların nasıl birleştirileceği

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Özge Ülker  
e-posta / e-mail: oulker@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033189

Gönderilme / Submitted : 03.04.2023

Kabul / Accepted : 21.08.2023

Yayınlanma / Published : 20.09.2023

değerlendirilmelidir. Alternatif yöntemlerden elde edilen veriler, tek başına bir yöntem olarak kullanılmamalı, kanıt yaklaşımının ağırlıklı bir parçası olarak diğer bilgilerle birlikte değerlendirilmelidir. Bu nedenle, duyarlaştırıcı ve duyarlaştırıcı olmayan maddeler arasında ayırım yapmak mümkündür.

**Anahtar Kelimeler:** Alerjik temas dermatit potansiyeli, DPRA, hapten, in-chemico

## ABSTRACT

**Objective:** Cosmetics are composed of a variety of chemical compounds and are typically applied to the skin for purpose of cleaning, improvement of skin conditions and also body odor, as well as enhancing beauty. Since 2004, there has been an animal testing restriction on completed cosmetic goods in the EU, and in 2013, a marketing ban for all animal toxicity experiments, including skin sensitization tests, went into effect. ECVAM has created and verified three different in vitro and one in-chemico method for skin sensitization tests.

**Material and Method:** The In-chemico method known as Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) is used. The test's objective is to aid in the evaluation of chemicals' potential to cause skin sensitivity. An essential process in allergies is thought to be haptization, in which a low molecular weight substance called haptens creates a covalent bond with proteins in the skin. Therefore, the evaluation of the skin sensitization potential of chemicals is based on data from peptide reactivity tests, such as DPRA. Our study's goal was to build up the DPRA in accordance with the guidelines by using compounds known for their sensitization potency.

**Result and Discussion:** Our DPRA study's susceptibility classification of cosmetic compounds produced results that agreed with those of earlier in-vivo and ex-vivo tests on these substances. In order to demonstrate that, the DPRA approach can distinguish between irritation and allergy, sodium dodecyl sulfate (SDS) was used in this study, which has a strong irritation feature. A more accurate estimate of the sensitization potential can be achieved by integrating the best results from two or more methods. The weight-of-evidence technique should be used in conjunction with information from various sources rather than using it as a stand-alone strategy. As a result, a differentiation between sensitizing and non-sensitizing chemicals can be understood.

**Keywords:** Allergic contact dermatitis potency, DPRA, hapten, in-chemico

## GİRİŞ

Kozmetik ürün güvenliği için kullanılan toksisite testlerinde deney hayvanı kullanımı Mart 2013 yılında tamamen yasaklanmıştır [1,2]. İnsan sağlığının ve çevrenin korunmasını amaçlayan Avrupa yönetmeliklerinde belirtildiği üzere, kimyasalların deri hassasiyeti potansiyellerinin ölçümü için hayvan kullanımını tamamen ortadan kaldırmak için hayvan deneylerine alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Deri hassasiyeti, yasal düzenlemelerde, insanlarda alerjik temas dermatiti (ACD)'ni ifade etmek için kullanılan bir terimdir; deri hassasiyeti potansiyeli, kimyasalların güvenlik ve risk değerlendirmelerinde dikkate alınan önemli bir sağlık son noktasıdır.

Deri hassasiyeti değerlendirilmesi için mekanik temelli ve hayvanlarda uygulanmayan test yöntemlerinin özellikle kozmetikler için geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Deri hassasiyeti için mevcut olan bazı testler, hayvanların kullanımına dayandığı için günümüzde kozmetik güvenliği açısından önemini yitirmiştir. Bunlar arasında geleneksel kobay testleri (Buehler Testi ve Kobay Maksimizasyon Testi [3] ve Lokal Lenf Dügümü Testi (LLNA) [4,5], radyo-izotopik olmayan varyantlar bulunmaktadır [6]. LLNA, geleneksel kobay testlerine göre bir iyileştirme yöntemi olarak kabul edilmesine ve insan maruziyetinde güvenli seviyeleri belirlemek için tam risk değerlendirmesinde gerekli olan deri hassasiyetinin anlaşılmasında büyük bir öneme sahip olmasına rağmen, deney hayvanlarının kozmetik ürün testlerinde kullanımının yasaklanmasından sonra yerine geçebilecek alternatif (*in vitro* ve *in chemico*) yöntemler araştırılmaktadır. REACH'e göre bu son nokta için hayvansal olmayan, alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasına daha fazla ihtiyaç vardır [7,8].

Deri hassasiyeti için farklı alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan Doğrudan Peptit Reaktivite Yönteminin (Direct Peptide Reactivity Assay-DPRA) aynı zamanda *in chemico* bir yöntemdir. Alerjik temas dermatiti mekanizmasında rol oynayan haptizasyon

olayı temel alınarak geliştirilmiştir. DPRA, potansiyel sensitizanların, lizin veya sistein (Ac-RFAACAA-COOH ve AcRFAAKAA-COOH) içeren sentetik peptitlerle reaktivitesini ölçerek, deri sensitizasyonu advers etki yolağını gösterir. UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (UV-YPSK) elde edilen piklerin değerlendirildiği ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods) tarafından da 2013 yılında valisyonu tamamlanan bir yöntemdir [9]. Validasyon, yöntemin tekrarlanabilirliği (laboratuvarlar içinde ve laboratuvarlar arasında) hakkında sonuçların tutarlılığına göre yapılmaktadır [10], 2015 yılında OECD test kılavuzuna (TG) girmiştir ve özellikle kozmetik firmaları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır [11,12].

Alerjik temas dermatit (alerjik kontakt dermatit), çok önemli sosyoekonomik etkileri olan ve sık görülen deri hastalıklarından biri olan Tip IV (Gecikmiş tip hipersensitivite)'ün bir alt tipidir. [13]. Alerjik temas dermatiti, kimyasal maddelere maruziyette en sık görülen advers etki olması açısından büyük önem taşımaktadır [14]. Bir kimyasal maddenin piyasaya sürülmesinden önce mutlaka biyoyumluluk ve toksisite testlerinden biri olan alerjik kontakt dermatit (deri sensitizasyon) testinin yapılması zorunludur [15]. Kozmetik ürün içeriğinde birçok farklı kimyasal madde bulunmaktadır ve listelenen 30.000 kimyasal madde vardır [16]. Bu 30.000 kimyasalın ortalama %86'sının toksisitesinin, insan ve çevre üzerinde etkilerine ilişkin veriler halen yetersizdir. Avrupa Birliği'ndeki en son kimyasal güvenlik uygulaması olan REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals-Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, Yetkilendirilmesi ve Sınırlandırılması) sisteminde değişiklikler mevcuttur. Bu değişim ile birlikte, üreticinin ürün başvuru dosyalarında toksisite verilerini sunması zorunlu olup nihai ürünün insan sağlığı üzerindeki güvenliği üreticinin sorumluluğuna verilmektedir [17,18].

Alerjik temas dermatiti, düşük moleküler ağırlıklı reaktif kimyasalların neden olduğu gecikmiş tipte bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur [19]. Alerjik temas dermatit (ACD) deri hassasiyetine neden olma yeteneğine sahip maddelerle ilişkili olarak immün sistem aracılığıyla ortaya çıkan bir toksisite reaksiyonudur [14]. Deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesi, yeni ve mevcut maddelerin güvenlik değerlendirmesinin önemli bir bileşenini temsil etmektedir.

Alerjik temas dermatite yol açan cilt hassaslaşması insidansı, sanayileşme ile yoğun olarak kullanılan potansiyel hassaslaştırıcılar nedeniyle artmaktadır. Bu kimyasalları tespit etmek için gerekli testler insan testleri, hayvan testleri ve *in vitro* testler olarak ayrılabilir. Çalışmamız için yama testi sonuçlarına göre insan testlerinde en sık kullanılan testlerden biri olan parafenilendiamin (PPD), Peru balzamu ve koku karışımı seçilmiştir [20]. Bu makalenin amacı, yaygın olarak kullanılan bu maddelerin alerjik temas dermatit potansiyelini saptamak ve değerlendirmek için alternatif bir yöntem olan DPRA'yı kullanmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### DPRA

OECD Test Klavuzu'nda No 442C: "Deri Hassasiyetinde Doğrudan Peptid Reaktivite Testi (DPRA)" olarak belirtilmektedir. TG 442C, göre deride hassasiyet oluşturanlar ve hassasiyet oluşturmayanlar arasındaki farkı desteklemek için önerilen bir *in chemico* prosedür olarak kabul edilmektedir.

Araştırmamızda kullanılan yöntem detayları, Doğrudan Peptid Reaktivite Testinde EURL - ECVAM doğrulama çalışmasında kullanılan Standart Çalışma Prosedürüne (SOP) dayanmaktadır [11,21].

### Kullanılan Peptidler ve Çözeltiler

Sistein veya lizin içeren sentetik heptapeptidler, (sistein peptit - Ac-RFAACAA COOH; lizin peptidi - Ac-RFAAKAA-COOH) kullanılmıştır (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Almanya). Sistein ve lizin çözeltileri sırasıyla 0,501 mg/ml ve 0,518 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Sistein peptiti için; 100 mM sodyum fosfat tampon (pH: 7.5), lizin peptiti için; 100 mM amonyum asetat tampon (pH: 10.5) hazırlanmıştır.

### Standart Peptit Çözeltilerinin Hazırlanması

8 ml tampon çözeltisini (Sistein peptidi için pH: 7.5 fosfat tamponu, lizin peptidi için pH: 10.2 amonyum asetat tamponu) 2 ml asetonitril ile karıştırarak yaklaşık 10 ml seyreltme tamponu (dilüsyon tamponu) hazırlanmıştır. 1600 µl peptit stok solüsyonunu (0.667 mM'de) 400 µl asetonitril ile seyrelterek 0.534 mM'de başlangıç standardı "STD-1" hazırlanmıştır. Seri seyreltme yaparak 0.534 mM - 0.0167 mM aralığını kapsayan peptit stok çözeltisinin standartları hazırlanmış ve Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Standart peptit çözeltileri

	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6	STD-7 (dilüsyon tampon çözeltisi)
mM peptit (Sistein, Lizin)	0.534	0.267	0.1335	0.0667	0.0334	0.0167	0.000

### Test Kimyasallarının ve Pozitif Kontrol Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmamızda test kimyasalı olarak PPD (parafenilendiamin), geraniol, izoöjenol ve SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak sinamik aldehit kullanılmıştır. Test kimyasalları ve pozitif kontrol çözeltileri her iki peptit için de (lizin ve sistein) protokol doğrultusunda tartılarak asetonitril'de çözülmüştür. SDS (sodyum dodesil sülfat)'nin asetonitril içerisindeki çözünürlüğü az olduğu için distile su içerisinde çözülerek test kimyasal çözeltisi hazırlanmıştır.

### Numunelerin Hazırlanması ve Ko-elüsyon (Co-elution) Kontrolü

Test kimyasallarının ve pozitif kontrolün her iki peptit ile üçlü numuneleri hazırlanmıştır. Aşağıda her bir numunenin 220 nm'de absorpsiyonunu ve bir peptit ile benzer bir retansiyon süresine sahip olup olmadığını ve veri analizine müdahale edip edemeyeceğini doğrulamak için peptit olmadan bir numune hazırlanmıştır. Bu durum ko-elüsyon (co-elution) kontrolü olarak adlandırılmaktadır. Test kimyasallarının inkübasyonunda kullanılan peptitlerin hazırlanışı Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Test kimyasallarının inkübasyonunda kullanılan peptitlerin hazırlanışı

1:10 oranı Sistein Peptit	1:50 oranı Lizin Peptit
750 mikrolitre sistein stok çözeltisi (Ko-elüsyon kontrolü için pH: 7.5 olan fosfat tampon çözeltisi) + 250 mikrolitre test kimyasal çözeltisi (Referans kontrol-A için uygun bir solvent-asetonitril)	750 mikrolitre lizin stok çözeltisi (Ko-elüsyon kontrolü için pH: 10.2 olan amonyum asetat tampon çözeltisi) + 250 mikrolitre test kimyasal çözeltisi (Referans kontrol-A için uygun bir solvent-asetonitril)

Test kimyasalı ve peptit çözeltisi, belirtilen miktarlarda küçük şişelere eklendikten sonra vortekslenip karanlıkta 24 saat oda sıcaklığında (25°C'de) bekletilerek oluşan numune serisinin YPSK analizi gerçekleştirilmiştir.

### Referans Kontrol Hazırlanması

Referans kontrol, test kimyasalını çözmek için kullanılan çözücü ile peptit inkübasyonuna dayanır. Referans kontrol A, asetonitril ile farklı peptitlerin inkübasyonu ile hazırlanmıştır. Amaç çözücünden kaynaklı bir protein eksilmesinin olup olmadığını tespit etmektir.

Her standart, test kimyasal ve kontrol numunelerinden eşit hacimlerde sisteme enjekte edilmiştir.

### Yöntem Koşulları

Agilent 1100 serisi YPSK-PDA (ABD) sistemi kullanılmıştır. Zorbax SB-C18 2.1 mm x 100

mm x 3.5 µ kolon üzerinde ayırım gerçekleştirilmiştir.

Mobil faz A, %0.1 h/h TFA içeren su; 1000 ml distile su içerisine 1 ml TFA (trifloroasetik asit) eklenerek hazırlanmıştır.

Mobil faz B, %0.085 h/h TFA içeren ACN; 1000 ml asetonitril içerisine 0.85 ml TFA eklenerek hazırlanmıştır. YPSK koşulları Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3. YPSK Koşulları**

<b>Kolon</b>	Zorbax SB-C18 2.1 mm x 100 mm x 3.5 µ			
<b>Kolon sıcaklığı</b>	30°C			
<b>Numune sıcaklığı</b>	25°C			
<b>Dedektör</b>	Miktar tayini için 220 nm sinyalli Sabit Dalgaboyu absorbands UV dedektörü			
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	7 µl			
<b>Çalışma süresi</b>	20 dakika			
<b>Akış hızları</b>	<b>Zaman</b>	<b>Akış</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	0 dk	0.35 ml/dk	90	10
	10 dk	0.35 ml/dk	75	25
	11 dk	0.35 ml/dk	10	90
	13 dk	0.35 ml/dk	10	90
	13.5 dk	0.35 ml/dk	90	10
	20 dk	0.35 ml/dk		

### Veri Analizi

Her test kimyasalı için peptit konsantrasyonu, 220 nm dalga boyunda belirlenmiştir. YPSK’dan elde edilen uygun piklerin pik alanı ölçümü yapılmış ve standart serisinden (STD-1 ile STD-7) elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrileri kullanılarak peptit konsantrasyonu hesaplanmıştır. Her test kimyasalının peptitin tükenme yüzdesi, aşağıdaki formülle belirlenmiştir.

$$\% \text{Peptit Tükenmesi} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Peptit Pik Alanı}}{\text{Referans Kontrol Ortalama Pik Alanı}} \right) \right] \times 100$$

Elde edilen pik alanları ve standartların konsantrasyonlarına dayalı olarak doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

### Yöntemin Geçerlilik Kriterleri

Elde edilen ölçümler sonucunda kalibrasyon doğrusallığı  $r^2 > 0.990$  olarak bulunmalıdır. Referans kontrol-A’nın ortalama peptit konsantrasyonu 0.50 +/- 0.05 mM olmalıdır [11]. OECD klavuzunda yer alan ve pozitif kontrol için ortalama Peptit Tükenme Yüzde değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

**Tablo 4. Sinamik aldehit (pozitif kontrol) için üç enjeksiyonun ortalama Peptit Tükenme Yüzde değerleri**

	<b>Yüzde peptit tükenmesi (Sistein için)</b>		<b>Yüzde peptit tükenmesi (Lizin için)</b>	
	Alt sınır	Üst sınır	Alt sınır	Üst sınır
<b>Pozitif kontrol (Sinamik aldehit)</b>	60.8	100.0	40.2	69.4

Pozitif kontrol tekrarları için maksimum standart sapmalar; Yüzde sistein tükenmesi için standart sapma < %14.9. Yüzde lizin tükenmesi için standart sapma < %11.6 olmalıdır [11].

### Değerlendirme Modeli

OECD klavuzunda yer aldığı üzere, kimyasal maddelerin değerlendirme modelinde, ölçüt olarak sistein ve lizin proteinlerinin % tükenme ortalama değerleri ve sadece sistein protein yüzde tükenmesi değerleri kullanılmış ve Tablo 5'de gösterildiği gibi sınıflandırılma yapılmıştır.

**Tablo 5.** Sistein 1:10 / Lizin 1:50 Tahmin Modeli

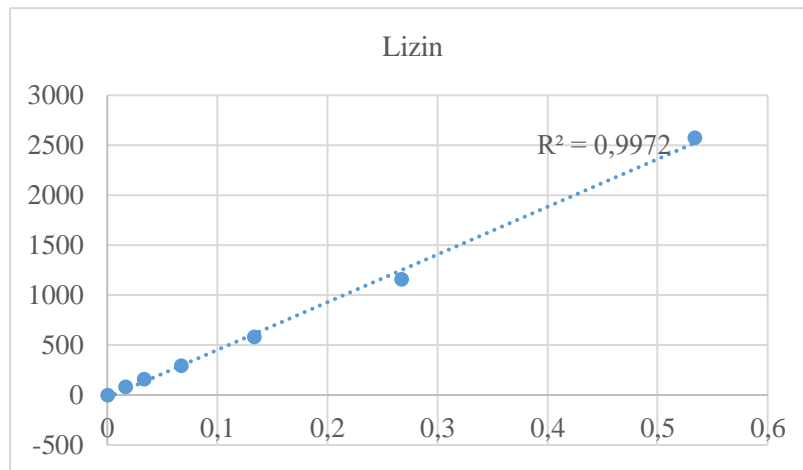
Sistein ve Lizin % Tükenme Ortalaması	Reaktivite Sınıfı	DPRA Tahmini <sup>2</sup>
%0 < ortalama % tükenme < %6.38	Reaktivite yok veya minimum düzeyde	Negatif
%6.38 < ortalama % tükenme < %22.62	Düşük reaktivite	Pozitif
%22.62 < ortalama % tükenme < %42.47	Orta reaktivite	
%42.47 < ortalama % tükenme < %100	Yüksek reaktivite	

**Tablo 6.** Sistein 1:10 Tahmin Modeli

Sistein (Cys) % Tükenmesi	Reaktivite Sınıfı	DPRA Tahmini <sup>2</sup>
%0 < Cys % tükenme < %13.89	Reaktivite yok veya minimum düzeyde	Negatif
%13.89 < Cys % tükenme < %23.09	Düşük reaktivite	Pozitif
%23.09 < Cys % tükenme < %98.24	Ortalama reaktivite	
%98.24 < Cys % tükenme < %100	Yüksek reaktivite	

## SONUÇ VE TARTIŞMA

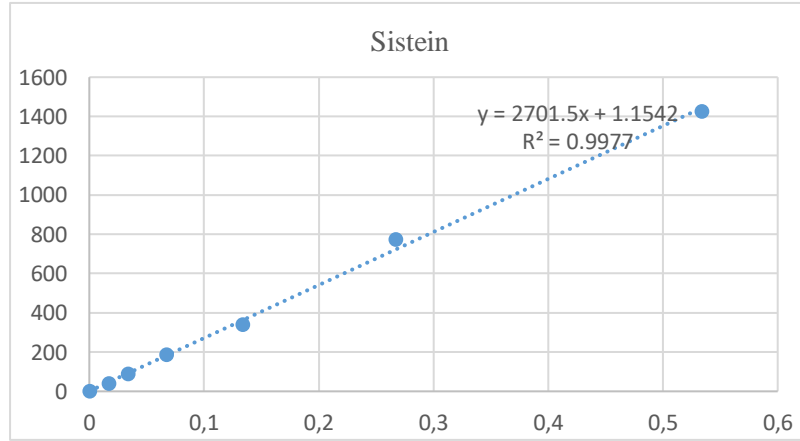
Standartlardan (STD-1 ile STD-7) türetilen doğrusal kalibrasyon doğrusu kullanılarak test kimyasalları ve pozitif kontrol ile hazırlanan numunelerin lizin ve sistein konsantrasyonu hesaplanmıştır (Şekil 1, Şekil 2). Protokol doğrultusunda hazırlanan lizin ve sistein çözeltileri 24 saat inkübe edildikten sonra her numunede peptid konsantrasyonu 220 nm'de verdiği pik alanından hareketle belirlenmiş ve Tablo 7 ve Tablo 8'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Lizin için kalibrasyon standart doğru grafiği. Grafikte x konsantrasyon; y ise pik alanını ifade etmektedir. ( $r^2 = 0.9972$ )

**Tablo 7.** Test kimyasallarının, pozitif kontrolün lizin ile inkübasyonu sonucu hazırlanan numunelerin pik alanları

Kimyasal	Pik alanı	Ortalama ± standart sapma (SS)
Parafenilendiamin (PPD)	61	71 ± 10
	81	
	71	
Geraniol	1865	1853.3 ± 11.50
	1842	
	1853	
İzoöjenol	1823	1820.3 ± 2.51
	1818	
	1820	
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (TC-4)	14.89	16.63 ± 1.74
	18.37	
	16.63	
Pozitif kontrol (sinnamik aldehit)	179	183.5 ± 4.5
	188	
	183.5	
Referans kontrol-A	1948	1973.3 ± 25.501
	1999	
	1973	

**Şekil 2.** Sistein için kalibrasyon standart doğru grafiği. Grafikte x konsantrasyon; y ise pik alanını ifade etmektedir. ( $r^2= 0.9977$ )**Tablo 8.** Test kimyasallarının, pozitif kontrolün sistein ile inkübasyonu sonucu hazırlanan numunelerin pik alanları

Kimyasal	Pik alanı	Ortalama ± standart sapma (SS)
Parafenilendiamin (PPD)	11	10.6 ± 0.57
	10	
	11	
Geraniol	848	850.3 ± 2.51
	853	
	850	
İzoöjenol	83	80.4 ± 2.50
	78	
	80.2	

**Tablo 8 (devamı).** Test kimyasallarının, pozitif kontrolün sistein ile inkübasyonu sonucu hazırlanan numunelerin pik alanları

Kimyasal	Pik alanı	Ortalama ± standart sapma (SS)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	1084	1083.6 ± 1.52
	1085	
	1082	
Pozitif kontrol (sinnamik aldehit)	112	111.45 ± 1.17
	110.1	
	112.25	
Referans kontrol-A	1264	1261.6 ± 2.51
	1262	
	1259	

Tablo 9’da gösterilen lizin, sistein ve ışığında, çalışmamızda kullandığımız *in chemico* bir test yöntemi olan DPRA ile parafenilendiamin, geraniol, izoöjenol, SDS’nin allerjik kontakt dermatit oluşturma potansiyellerine dair veriler elde edilmiştir.

**Tablo 9.** Test kimyasallarının, pozitif kontrolün sistein, lizin, toplam peptit tükenme yüzdeleri

	% Sistein Tükenmesi	% Lizin Tükenmesi	% Peptit Tükenmesi
<b>Pozitif Kontrol (sinnamik aldehit)</b>	91.16	90.58	Yüksek
<b>PPD (parafenilendiamin)</b>	99.11	96.2	Yüksek
<b>Geraniol</b>	32.71	6.08	Düşük
<b>İzoöjenol</b>	93.63	6.59	Yüksek
<b>SDS (sodyum dodesil sülfat)</b>	14.16	99.15	Yüksek

DPRA ile haptenezasyon olarak kabul edilen, düşük moleküler ağırlıklı maddelerin (haptenerin) deri proteinlerine kovalent bağlanmasıyla temsil edilen cilt hassaslaşmasının başlatılması süreci incelenmiştir. Kullanılan test maddeleri aktivitelerine göre çok düşük, düşük, orta veya yüksek olarak sınıflandırılmıştır.

Kozmetik bileşenlerin hassasiyet sınıflandırmasına yönelik DPRA çalışmamızın sonuçları, tahriş edici kimyasal SDS dışında önceki *in-vivo* ve *ex-vivo* çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. lizin tükenme yüzdesi yanlış pozitif sonuç vermiş olup sistein tükenmesi daha güvenilir olarak saptanmıştır. Sonuçlarımıza göre, lizin ve sistein kombinasyonunun kılavuzlara göre önerildiği bu yöntemde sadece sistein tükenmesi sonuçlarının da kullanılabilmesi önerilmiştir. Çalışmamızın kapsamında, DPRA ile kimyasalların hassasiyet potansiyelini araştırmak için doğrulanmış bir yöntem oluşturulmuştur. Yöntemin özellikle iritasyon ve alerji ayırımı yapabilme yeteneğinin tespiti için SDS’nin (sodyum dodesil sülfat) de test kimyasalı olarak araştırılması yönetime önemli bir katkı sağlamıştır.

Allerjik kontakt dermatit, önemli bir mesleki ve çevresel sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hassasiyet potansiyelinin ölçümü, kişisel bakım ürünlerinde ve kozmetik ürünler içerisinde bulunan bileşenlerin geliştirilmesi, risk değerlendirmesinde temel bir unsurdur.

Kullanılan kimyasal maddenin allerjik kontakt dermatite neden olma potansiyelini yapılan test sonuçları göstermektedir [22]. Alternatif yöntemler, test başına hayvan sayısını azaltırken, hayvan refahını da göz ardı etmeden kullanılan yöntemlerin dışında ve/veya yer değiştirme ile sonuçlanan yeni teknikleri içermektedir, bu da toksikolojik bir son noktayı belirlemektedir. Konu, amaç ve tekniğe uygunsa *in vivo* yöntemler tercih edilerek veya entegre şekilde kullanılabilir. Alternatif yöntemlerin entegre edilmesi, *in vivo* yöntemlere olan ihtiyacı azaltmaktadır. Günümüzde kullanılacak kimyasal madde sayısının sürekli arttığı düşünüldüğünde, alternatif yöntemlerin kullanılması hassasiyet



ölçümünün optimizasyonuna yarar sağlayacaktır [15]. Düşük moleküler ağırlıklı kimyasalların deri hassasiyet reaksiyonlarını tetiklediği ve ortaya çıkardığı süreç oldukça karmaşıktır ve kimyasalın cilde nüfuz etme, protein ile reaksiyona girme ve hücre aracılı bağışıklık tepkisini tetikleme yeteneği ile ilgili birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle, deri hassasiyet ölçümünde tek bir yöntem kullanılması önerilmemektedir.

DPRA kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı kimyasal maddelerin deri hassasiyet potansiyelleri değerlendirilirken oksidasyon ile bozulma sonucunda çıkan ürünlerin peptit tüketimine etkisinin araştırıldığı çalışmalara da rastlanmıştır [2,23,24].

DPRA, deri hassasiyet potansiyelinin belirlenmesinde hızlı, ucuz ve uygulanabilir yöntemlerden biri olması nedeniyle oldukça avantajlıdır. Ancak DPRA yöntemi, bilinmeyen veya değişken kompozisyondaki madde ve karışımların, metal bileşiklerin, kompleks reaksiyon ürünlerinin, biyolojik materyallerin ve prohaptenlerin tespitinde kullanılamaz [2]. Yanlış negatif sonuçlara neden olmamak için sistein veya lizin dışındaki aminoasitlere karşı yapılan tercihli reaktifliğe sahip kimyasallar test edilmemelidir.

Hayvan deneylerine alternatif yöntemler, dünya çapında giderek daha önemli hale gelmektedir. ancak kabul edilen alternatif yöntemlerin, test maddelerinin deri hassasiyet potansiyelini belirlemede hayvan modellerine kıyasla yeterli olmaları gerekmektedir.

Alternatif yöntemlerin entegrasyonu *in vivo* yöntemlere olan ihtiyacı azaltsa da, kullanılacak olan test maddesinin duyarlaştırıcı potansiyelini belirlemek için hayvan modellerine kıyasla kabul edilen alternatif yöntemler doğru ve güvenilir sonuç vermelidir. Çalışmamızda kullandığımız alternatif bir yöntem olan DPRA'nın, hayvan modelleri ile elde edilen sonuçlarla benzer sonuçlar vermesi yöntemin geçerliliğini doğrulamaktadır, ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Özetle, hayvan modellerine alternatif yöntemlerin uygulama alanını genişletmek ve gelişimlerini tamamlamak için düzenleyici otoriteler, bilim ve endüstri arasındaki işbirliğinin devam etmesi ve yeni veri tabanlarının oluşturulması yeni sentezlenen kimyasal maddelerin duyarlaştırıcı potansiyellerini tahmin etmekte büyük önem taşımaktadır.

## TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 19L0237003).

## YAZAR KATKILARI

Kavram: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Tasarım: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Denetim: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Kaynaklar: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Malzemeler: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Literatür Taraması: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Makalenin Yazılması: Ö.Ü., N.C.; Kritik İnceleme: Ö.Ü., A.G., N.C., P.K.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünler Üzerinde Yapılan Hayvan Deneylerine Alternatif Test Metotlarına İlişkin Kılavuz Sürüm 1.0 <https://titck.gov.tr/storage/announcement/M7kWn1JB.pdf>, Erişim tarihi: 13.01.2023.

2. Barentsen, H.M, Jonis, S., Pelgrom, S.M.G.J., Rijk, J.C.W., Westerink, W.M.A., Paulussen, J.J.C. (2019). REACH alternative testing strategy for skin sensitization in practice: Fact or fiction? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 106, 292-302. [\[CrossRef\]](#)
3. OECD, Guidelines for Testing of Chemicals No 406.
4. Ülker, O.C., Ates, I., Atak, A., Karakaya, A. (2013). Evaluation of non-radioactive endpoints of *ex vivo* local lymph node assay-BrdU to investigate select contact sensitizers. *Journal of Immunotoxicology*, 10(1), 1-8. [\[CrossRef\]](#)
5. Maeda, Y., Takeyoshi, M. (2019). Proposal of GHS sub-categorization criteria for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 107, 104409. [\[CrossRef\]](#)
6. Reuter, U., Heinrich-Hirsch, B., Hellwig, J., Holzum, B., Welsch, F. (2003). Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 17-26. [\[CrossRef\]](#)
7. U.S. Public Health Service National Institutes of Health (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA A Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products.
8. Köse, Ö., Erkekoğlu, P., Sabuncuoğlu, S., Koçer-Gümüşel, B. (2017). Phototoxic effect of cosmetic products: Its mechanism and alternative test methods. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2), 207-215.
9. Esen, B., Ülker, Ö.C. (2021). 3R Kuramına Göre Güncel Deri Duyarlılığı Testleri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 10(1), 76-88. [\[CrossRef\]](#)
10. Casati, S., Griesinger, C., Whelan, M. (2013). EURL ECVAM Recommendation on the direct peptide reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing. EUR 26383. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2013. JRC85936.
11. OECD (2015). Organisation for Economic Cooperation and Development. Test Guideline 442C: In Chemico, Skin Sensitisation, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).
12. Maxwell, G., Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Diembeck, W., Gerberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Ovigne, J.M., Sakaguchi, H., Schroeder, K., Tailhardat, M., Teissier, S., Winkler, P. (2011). Skin sensitisation: The colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 28(1), 50-55. [\[CrossRef\]](#)
13. Uter, W., Schnuch, A., Geier, J., Frosch, P.J. (1998). Epidemiology of contact dermatitis. The information network of departments of dermatology (IVDK) in Germany. *European Journal of Dermatology*, 8, 36-40.
14. Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Dearman, R.J. (2002). Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology*, 2(2-3), 201-211. [\[CrossRef\]](#)
15. Commission of the European Communities, Europäische Kommission, Commission of the European Communities. Directorate-General XI-Environment, Nuclear Safety, & Civil Protection. (1987). EINECS: European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (Vol. 8). Office for Official Publications of the European Communities.
16. Kuleli, B. (2011). Doktora Tezi. İş sağlığı ve güvenliği yönetim sistemi-TS 18001: 2004'e REACH kimyasallar politikalarının etkileri ve bir risk değerlendirme modeli kurulumu. Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
17. Tugay, D., Aycan, M. B. (2013). Bitirme ödevi. Biyoçeğerlik Çalışmaları. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri, Türkiye.
18. Xu, H., Bjarnason, B., Elmets, C.A. (2000). Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: Potential differences at cellular and molecular levels. *American Journal of Contact Dermatitis*, 11(4), 228-234. [\[CrossRef\]](#)
19. Akyol, A., Boat, A., Peksard, Y., Gurgey, E. (2005). Contact sensitivity to standard series allergens in 1038 patients with contact dermatitis in Turkey. *Contact Dermatitis.*, 52, 333-337. [\[CrossRef\]](#)
20. EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitisation testing.
21. Almeida, A., Sarmento, B., Rodrigues, F. (2017). Insights on *in-vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *International Journal of Pharmacy*, 519(1-2), 178-185. [\[CrossRef\]](#)
22. Lee, J., Cho, A., Gautam, R., Kim, Y., Shin, S., Song, E., Kim, H., Yong, S.J., Acharya, M., Jo, J.H., Mahartan, A., Shim, I.S., Kim, H.M., Kim, P.J., Kim, T.S., Lee, J.K., Kang, M.J., Jeong, T.C., Kim, C.Y., Kim, H.A., Heo, Y. (2019). Prediction of the skin sensitization potential of didecyltrimethylammonium chloride and 3,7-dimethyl-2,6-octadienal and mixtures of these compounds with the excipient ethylene glycol through the human cell line activation test and the direct peptide reactivity assay. *Toxicology and Industrial Health*, 35(8), 507-519. [\[CrossRef\]](#)

23. Avonto, C., Wang, Y.H., Chittiboyina, A.G., Vukmanovic, S., Khan, I.A. (2019). *In-chemico* assessment of potential sensitizers: Stability and direct peptide reactivity of 24 fragrance ingredients. *Journal of Applied Toxicology*, 39(2), 398-408. [\[CrossRef\]](#)