



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DERİ DUYARLANDIRMASI TESTİ OLAN DİREKT PEPTİT
REAKTİVİTE YÖNTEMİ (DIRECT PEPTIDE REACTIVITY
ASSAY-DPRA) İLE BAZI KİMYASAL MADDELERİN
DUYARLANDIRMA POTANSİYELLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pelin KAVAS

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özge ÜLKER**

**2021
ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERİ DUYARLANDIRMASI TESTİ OLAN DİREKT PEPTİT
REAKTİVİTE YÖNTEMİ (DIRECT PEPTIDE REACTIVITY
ASSAY-DPRA) İLE BAZI KİMYASAL MADDELERİN
DUYARLANDIRMA POTANSİYELLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pelin KAVAS

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özge ÜLKER**

**2021
ANKARA**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Deri Duyarlandırması Testi Olan Direkt Peptit Reaktivite Yöntemi (Direct Peptide Reactivity Assay-Dpra) İle Bazı Kimyasal Maddelerin Duyarlandırma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Pelin KAVAS

Tarih :...../...../2021

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Pelin KAVAS tarafından hazırlanan

“DERİ DUYARLANDIRMASI TESTİ OLAN DİREKT PEPTİT REAKTİVİTE
YÖNTEMİ (DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY-DPRA) İLE BAZI
KİMYASAL MADDELERİN DUYARLANDIRMA POTANSİYELLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/08/2021

Doç. Dr. İlker ATEŞ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Özge ÜLKER
Ankara Üniversitesi
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	7
2.1. Deneysel Açıklama	7
2.2. Sonucun Değerlendirilmesi	8
2.3. Prosedür	8
2.4. Validasyon Çalışmaları	8
2.5. Yasal Kabul	8
2.6. Prosedür Detayları	9
2.7. Materyal ve Hazırlık	9
2.8. Ekipmanlar	9
2.9. Asetonitril Hakkında Not	10
2.10. Re-ajanların Hazırlanması	10
2.10.1. 100 mM Sodyum Fosfat Tampon Hazırlanması	10
2.10.2. 100 mM Amonyum Asetat Tampon Hazırlanması	11
2.11. HPLC Fazlarının Hazırlanması	11
2.12. Test Kimyasallarının Hazırlanması	11
2.12.1. Test Kimyasallarının Tartımı	13
2.13. Lizin ve Sistein Peptit Solüsyonlarının Hazırlanması	13
2.14. HPLC Sisteminin Hazırlanması ve Kullanılması	13
2.15. Pozitif Kontrol Çözeltilisinin Hazırlanması	14
2.16. Referans Kontrol Hazırlanması	14
2.17. Numune Hazırlanması ve Co-Elüsyon Kontrolü	14
2.18. Test Kimyasallarının Hazırlanması	14
2.19. Standart Peptit Çözeltilerinin Hazırlanması	15
2.20. Seri seyreltme prosedürü ve detayları	16
2.21. Hedef Ölçümü	16
2.21.1. HPLC Analizi	16
2.21.2. HPLC Koşulları	17
2.21.3. Veri Analizi	17
2.21.4. Kabul Kriterleri	18
2.22. Tahmin Modeli	19
3. BULGULAR	22
3.1. Lizin için Standartlara Ait Kromatogramlar	24
3.2. Lizin için Kimyasallara Ait Kromatogramlar	27

3.3. Sistein için Standartlara Ait Kromatogramlar	34
3.4. Sistein için Kimyasallara Ait Kromatogramlar	38
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	54



ÖNSÖZ

“Deri Duyarlandırması Testi Olan Direkt Peptit Reaktivite Yöntemi (Direct Peptide Reactivity Assay-DPRA) ile Bazı Kimyasal Maddelerin Duyarlandırma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi” başlıklı yüksek lisans tez çalışmam süresince bilimsel ve mental desteklerini her daim hissettiğim, zamanını ve sabrını benimle paylaşan, güler yüzünü ve anlayışını her zaman hissettiren danışman hocam Doç. Dr. Özge ÜLKER’e sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, tezim kapsamında yer alan deneylerde bana her zaman yardımcı olan Doç. Dr. Alper GÖKBULUT’a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da hayatım boyunca desteklerini ne olursa olsun benden esirgemeyen, her zaman güvenlerini tam olarak hissettiğim, her zaman yanımda olan biricik aileme ve sevgili eşime teşekkür ederim.

Saygılarımla

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACD	Alerjik Kontakt Dermatit
AOP	Advers Etki Yolu
Co-el	Koelüsyon
COLIPA	Avrupa Kozmetik Derneği
CV	Varyans Katsayısı
Cys	Sistein
DC	Dendritik Hücre
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPRA	Doğrudan Peptit Reaktivite Deneyi
EURL ECVAM	Hayvan Deneilerine Alternatifler için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
Lys	Lizin
MA	Moleküler Ağırlık
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı
REACH	Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, Yetkilendirilmesi ve Kısıtlanması
SOP	Standart Operasyon Prosedürü
STD	Standart
VMG	Validation Management Group-Doğrulama Yönetim Grubu

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Sistein 1:10 / Lizin 1:50 tahmin modeli	20
Şekil 2.2. Sistein 1:10 tahmin modeli	20
Şekil 3.1. Lizin için elde edilen r^2 grafiği	23
Şekil 3.2. Lizin standart-1	24
Şekil 3.3. Lizin standart-2	24
Şekil 3.4. Lizin standart-3	25
Şekil 3.5. Lizin standart-4	25
Şekil 3.6. Lizin standart-5	26
Şekil 3.7. Lizin standart-6	26
Şekil 3.8. Lizin standart-7	27
Şekil 3.9. Lizin ve PPD	27
Şekil 3.10. Lizin ve PPD (parafenilendiamin) koelüsyon grafiği	28
Şekil 3.11. Lizin ve Geraniol	28
Şekil 3.12. Lizin ve Geraniol koelüsyon grafiği	29
Şekil 3.13. Lizin ve İzöjenaol	29
Şekil 3.14. Lizin ve İzöjenol koelüsyon grafiği	30
Şekil 3.15. Lizin ve Sodyum Dodesil Sülfat	30
Şekil 3.16. Lizin ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) koelüsyon grafiği	31
Şekil 3.17. Lizin pozitif kontrol	31
Şekil 3.18. Lizin pozitif kontrol koelüsyon grafiği	32
Şekil 3.19. Lizin referans kontrol-A	32
Şekil 3.20. Sistein için elde edilen r^2 grafiği	34
Şekil 3.21. Sistein standart-1	34
Şekil 3.22. Sistein standart-2	35
Şekil 3.23. Sistein standart-3	35
Şekil 3.24. Sistein standart-4	36
Şekil 3.25. Sistein standart-5	36
Şekil 3.26. Sistein standart-6	37
Şekil 3.27. Sistein standart-7	37

Şekil 3.28. Sistein ve Parafenilendiamin	38
Şekil 3.29. Sistein ve Parafenilendiamin (PPD) koelüsyon grafiği	38
Şekil 3.30. Sistein ve Greaniol	39
Şekil 3.31. Sistein ve Geraniol koelüsyon grafiği	39
Şekil 3.32. Sistein ve İzoojenol	40
Şekil 3.33. Sistein ve İzoojenol koelüsyon grafiği	40
Şekil 3.34. Sistein ve Sodyum dodesil sülfat	41
Şekil 3.35. Sistein ve Sodyum dodesil sülfat (SDS) koelüsyon grafiği	41
Şekil 3.36. Sistein pozitif kontrol	42
Şekil 3.37. Sistein pozitif kontrol koelüsyon grafiği	42
Şekil 3.38. Sistein referans kontrol-A	43

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Test kimyasallarının hazırlanması	15
Çizelge 2.2. Standart Peptit çözeltilerinin hazırlanması	16
Çizelge 2.3. HPLC koşulları	17
Çizelge 2.4. Kabul kriterleri	18
Çizelge 2.5. Sistein 1:10 / Lizin 1:50 tahmin modeli	20
Çizelge 2.6. Sistein 1:10 tahmin modeli	20
Çizelge 3.1. Lizin için standartlara ait sonuçlar	22
Çizelge 3.2. Lizin için kimyasallara ait sonuçlar	23
Çizelge 3.3. Sistein için standartlara ait sonuçlar	32
Çizelge 3.4. Sistein için kimyasallara ait sonuçlar	33
Çizelge 3.5. Sistein ve Lizin tükenme oranları	43

1. GİRİŞ

Alerjik temas dermatiti (alerjik kontakt dermatit), Tip IV (Gecikmiş tip hipersensitivite)'nin bir alt tipi olmakla beraber, büyük sosyoekonomik etkileri olan ve en sık görülen deri hastalıkları arasında yer almaktadır (Uter ve ark., 1998).

Alerjik temas dermatiti (alerjik kontakt dermatit), kimyasal maddelere maruziyette en sık görülen advers etki olması açısından büyük önem taşımaktadır. Bir kimyasal maddenin piyasaya sürülmesinden önce mutlaka biyoyumumluluk ve toksisite testlerinden biri olan alerjik kontakt dermatit (deri sensitizasyonu) testinin yapılması zorunludur. Özellikle kozmetik ürünlerin çeşitliliği ve insan maruziyeti düşünüldüğünde bu testlerin yapılması kaçınılmazdır.

Deri hassasiyetinin saptanması için uzun yıllar boyunca kobay testleri (guinea pig maksimizasyon test, Buehler test) kullanılmıştır. Günümüzde ise halen kimyasal güvenlik dosyalarında (kozmetik içeriğinde yer alan maddeler dışında) mutlaka belirtilmesi gereken ve sensitizasyon potansiyelini araştırmak için kullanılan toksisite testi LLNA (Local Lymph Node Assay-Lokal Lenf Dügümü Yöntemi)'dir (OECD, 2015a).

Radyoaktif lokal lenf düğümü yöntemi (LLNA), kimyasal maddelerin hassasiyet potansiyellerinin ölçümü için kullanılan önemli bir test yöntemidir. Alerjen kimyasallara maruziyet sonucunda lenf düğümlerinden salınan T hücre proliferasyonu in vivo [3H] metil timidin kullanılarak LLNA ile ölçülmektedir. Lenfosit proliferasyonunun test materyalinin sensitizasyon potansiyeline bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu yöntem ICCVAM (1998), ECVAM (2000) ve OECD (2002) tarafından kabul edilmiştir. Aynı zamanda bu yöntem geleneksel guinea pig maksimizasyon testi ve Buehler yöntemine göre birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar arasında; kullanılan hayvan sayısının azalması ve hayvan refahı, deney süresinin ve deney hızının artışı, kantitatif sonuç noktaları ve güçlü karşılaştırılabilir kriterleri sayılabilmektedir (Basketter ve ark., 2007). LLNA

yönteminin sayısız avantajları olmasına rağmen ICCVAM raporu, iki dezavantajına özellikle dikkat çekmektedir. Bunlardan ilki, LLNA'in, [3H] metil timidin kullanılarak yapılan radyoaktif bir yöntem olmasıdır. Bir diğeri ise antijen spesifik immün yanıtın veya non-spesifik enflamatuvar yanıtın hücre proliferasyonuna neden olmasından dolayı irritasyon ve alerjinin tam olarak ayırt edilememesidir. Ancak bu dezavantajlarına rağmen LLNA yönteminin OECD yönetmeliğine kabulden sonra, "UK Health and Safety Executive (HSE)" yeni kimyasal maddelerin deri hassasiyeti potansiyellerinin ölçülerek Avrupa Birliği onayını alabilmeleri için gerekli olan bir yöntem olarak göstermiştir. Birçok araştırmacı, LLNA protokolünü daha fazla geliştirebilmek amacıyla radyoaktif bir maddenin yöntem için gerekli olup olmadığı üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yaklaşımlar içerisinde en önemli olanı ise in vivo olarak uygulanan standart LLNA yönteminde kullanılan [3H] metil timidin (3HTdR)'in yerine I.P olarak nonradyoaktif bir analogu olan 5-bromo-2-deoksiuridin (BrdU) uygulanması olmuştur. BrdU, 3HTdR' ye çok benzerdir ve BrdU kullanılarak yapılan varyasyon yöntemleri sonuçları standart LLNA ile çok benzerlik göstermiştir ve uluslararası toplumlar (ICCVAM, OECD, ECVAM gibi) tarafından da onay almayı başarmıştır. (U.S. Public Health Service National Institutes of Health, 2010).

Deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesi, yeni ve mevcut maddelerin güvenlik değerlendirmesinin önemli bir bileşenini temsil etmektedir. Geleneksel yöntem olarak, Lokal Lenf Dügümü Testi (LLNA) ve kobay testleri (Buehler Testi ve Kobay Maksimizasyon Testi) gibi hayvan testleri ile elde edilir. Bugüne kadar, insan sağlığının ve çevrenin korunmasını amaçlayan bazı Avrupa yönetmeliklerinde savunulduğu üzere, bu son nokta için hayvan ihtiyacını azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak için alternatif hayvansal olmayan yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Deri hassasiyetinin değerlendirilmesi için mekanik temelli birkaç hayvansal olmayan test yöntemi şu anda geliştirme ve değerlendirme aşamasındadır. Doğrudan Peptit Reaktivite Yönteminin (DPRA) doğrulanması, ECVAM tarafından koordine edilen çalışmanın bir parçasıdır. Çalışma, deri hassasiyetinin değerlendirmesi için hayvansal olmayan test stratejisinin bir parçası olarak, gelecekteki kullanımı göz önüne alındığında, DPRA'nın aktarılabirliği ve tekrarlanabilirliği (laboratuvarlar içinde ve laboratuvarlar arasında) hakkında sağlam

sonuçların çıkarılmasına yönelik olarak tasarlanmıştır. VMG (Validation Management Group), çalışmada üretilen bilgilerin DPRA'nın sağlam ve güvenilir bir test yöntemi olduğunu gösterdiğine karar vermiştir. VMG (Doğrulama Yönetim Grubu) ayrıca, DPRA'nın, deri hassasiyetinin tanımlanması için in vivo tahlillerin tamamen değiştirilmesi ve deri hassasiyet potansiyelinin belirlenmesinde oynayabileceği rol için entegre bir test stratejisinin bir parçası olarak daha fazla değerlendirmeyi hak ettiğini düşünmektedir (Casati ve ark., 2013).

Deri hassasiyeti, insanlarda alerjik kontakt dermatit (ACD) olarak adlandırılan, deri alerjisine neden olma yeteneğine sahip maddelerle ilişkili toksikolojik son noktadır ve immünotoksisitenin en yaygın durumu olarak karşımıza çıkmaktadır. Deri hassasiyet potansiyelinin tanımlanması, kozmetik bileşenler dahil olmak üzere yeni ve mevcut maddelerin güvenlik değerlendirmesinin önemli bir kısmını kapsamaktadır. Deri hassasiyeti için mevcut tahmin testleri, hayvanların kullanımına dayanmaktadır. Bunlar arasında geleneksel kobay testleri (Buehler Testi ve Kobay Maksimizasyon Testi (OECD TG 406, TG B06 AB Regulation 440-2008) ve Yerel Lenf Düğümü Testi (LLNA, OECD TG 429, TG B42 AB Regulation 440-2008, radyo-izotopik olmayan varyantlar dahil (OECD TG 422A ve OECD TG 422B) bulunmaktadır. LLNA, geleneksel kobay testlerine göre bir iyileştirme yöntemi olarak kabul edilir ve insan maruziyetinde güvenli seviyeleri belirlemek için tam risk değerlendirmesinde gerekli olan deri hassasiyetinin anlaşılmasında daha büyük bir öneme sahiptir. Yeni Avrupa Kimyasallar Yönetmeliği REACH'e göre (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals-Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, Yetkilendirilmesi ve Sınırlandırılması), bu son nokta için alternatif, hayvansal olmayan yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasına daha fazla ihtiyaç vardır.

Deri hassasiyeti, düşük moleküler ağırlıklı reaktif kimyasalların neden olduğu gecikmiş tipte bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Deri hassasiyetinin indüksiyonunun altında yatan temel biyolojik mekanizmalar, tam olarak karakterize edilememesine rağmen, kısmen iyi anlaşılmıştır. Mekanizma şu şekildedir;

- 1) Kimyasalın cilde nüfuz etme ve haptenasyon bölgesine ulaşması,
- 2) Kimyasal duyarlılaştırıcının deri proteinine kovalent bağlanması (haptenasyon),
- 3) Epidermal keratinositler tarafından proinflamatuvar sinyallerin salınması (deri iltihabı),
- 4) Dendritik hücrelerin (DC) aktivasyonu ve olgunlaşması,
- 5) Dendritik hücrelerin deriden bölgesel lenf düğümlerine göçü,
- 6) Hafıza T hücrelerinin genişlemesi (haptenize kimyasal tarafından spesifik olarak uyarılabilen ve aktive edilebilen lenfositler).

Son yıllarda, bazıları potens karakterizasyonuna katkıda bulunabilecek olan risk tanımlaması için mekanik tabanlı alternatif yöntemlerin geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte, şu anda geliştirme ve değerlendirme aşamasında olan mekanik temelli hayvansal olmayan testlerin hiçbirinin, halihazırda kullanılan hayvan testlerini tamamen değiştirmek için bağımsız bir yöntem olarak işlev görme potansiyeline sahip olmadığı düşünülmektedir. Bunun yerine, bu amaca ulaşmak için deri hassasiyetinin temel biyolojik mekanizmalarını ele alan bu tür testlerin bir kombinasyonuna ihtiyaç duyulacağı önerilmektedir. 2009'un ilk çeyreğinde, deri hassasiyetinin belirlenmesi için kullanılacak üç farklı alternatif test yöntemi, değerlendirme için resmi olarak ECVAM'a sunulmuştur. Bu yöntemler, Doğrudan Peptit Reaktivite Yöntemi (DPRA), İnsan Hücre Hattı Aktivasyon Testi (h-CLAT) ve Myeloid U937 Deri Hassasiyet Testidir (MUSST). Bu üç test yöntemi, mevcut in vivo testlerin yanında alternatif kullanım için aday olarak önerilmektedir. Bu test yöntemleriyle elde edilen bilgilerin, hedefe ulaşmak için mevcut yöntemlere nasıl entegre edilebileceği belirlenmelidir (Aeby ve ark., 2010).

İnsan vücudunda, çevreden gelen kimyasal ve fiziksel faktörlerden en çok etkilenen yapı, en dış bariyer olan deridir. Patofizyolojik mekanizmasına göre, temas dermatiti, temel olarak iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. İrritan temas dermatiti, derinin doğal immünitesini aktive eden ksenobiyotiklerin, toksik ve pro-enflamatuvar etkilerine bağlıdır. Alerjik temas dermatiti ise deri enflamasyonuna aracılık eden efektör T hücrelerine bağlı olarak antijen spesifik kazanılmış immunité

aktivasyonunu gerektirir (Saint-Mezard ve ark., 2004). Alerjik temas dermatiti, haptten spesifik T hücre aracılı deri enflamasyonu olarak tanımlanmaktadır ve kontakt hipersensitivite veya kontakt sensitivite olarak da adlandırılmaktadır. Alerjik temas dermatiti oluşumunu başlatan bileşiklerin orjinleri ve yapıları farklı olmakla birlikte bazı ortak noktaları da bulunmaktadır. Temas alerjenler düşük molekül ağırlıklı kimyasallardır ve haptten olarak adlandırılırlar. Hapttenler immünojenik özellikte değildirler. Epidermal proteinlere kovalan bağlanarak immünolojik özellik kazanırlar. Bu olaydan sonra haptten-taşıyıcı protein kompleksi (hapttenizasyon) şeklinde rol oynarlar. En son olarak da antijen olarak karşımıza çıkarlar. Hapttenler deri bariyerini geçebilmeleri için, genellikle lipofilik özelliğe sahiptir. Ayrıca epidermal proteinlerin nükleofilik kısımlarına bağlanabilmeleri için de elektrofilik yapı taşımaktadırlar.

1900'lü yıllarda çoğunluğu doğal kaynaklardan elde edilen 1000 civarında kimyasal madde kullanılırken bu sayı 2000'lere gelindiğinde 100.000'e ulaşmıştır. Geçtiğimiz her yıl yaklaşık 1000 kadar yeni sentetik kimyasal madde bu sayıya eklenmektedir. Gün geçtikçe kullanılan kimyasal maddelerin sayısının artmasının yanı sıra kullanım miktarları da ciddi ölçüde artmaktadır. Modern yaşamın sürdürülmesinde kimyasalların artan miktarlarda kullanılma gerekliliği tartışılmaz. Fakat diğer yandan bu kullanıma bağlı olarak oluşan tehlikeler, kimyasalların üretim öncesi ve sonrası zararsızlık limitlerinin belirlenmesinde ve yaratabilecekleri sağlık riskinin saptanmasında gerekli olan toksisite testlerinin önemini arttırmıştır. Akut toksisite, deri hassasiyeti, deri irritasyonu, deri absorpsiyonu, tekrarlanan doz toksisitesi, mutajenite ve genotoksisite, tüm kimyasallar için zorunlu olarak yapılması gereken testlerdir. EINECS "European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances" envanterinde olan sayısı 100.000'i aşkın kimyasalın 30.000 kadarı günümüzde halen kullanımdadır. Söz konusu 30.000 kimyasalın yaklaşık %86'sının toksisiteleri, insan ve çevreye etkileri hakkındaki veriler ne yazık ki yetersizdir. Bu 30.000 kimyasal için, Avrupa Birliği'nde kimyasal güvenlik konusunda en son uygulama olan REACH sisteminde, yöntemin zararlı olduğunu kanıtlama zorunluluğundan, üreticinin ürününün güvenli olduğunu kanıtlama uygulamasına geçilmiştir. Bu doğrultuda üretici, ürünün başvuru dosyasında ürüne

ait toksisite verilerini sunmak zorundadır ve son ürünün insan sağlığı üzerindeki güvenliliğini üreticinin sorumluluğundadır.

Son yıllarda kozmetiklerde deney hayvanlarının kullanılmasının yasaklanması, in vitro yöntemlerin araştırılmasına hız kazandırmıştır. Deri sensitizasyon testi için de üç farklı in vitro yöntem geliştirilmiştir. Bu in vitro test yöntemlerinde biri olan Direkt Peptit Reaktivite Yöntemi (Direct Peptide Reactivity Assay-DPRA) in chemico bir yöntemdir. Yukarıda bahsedilen alerjik temas dermatiti mekanizmasında rol oynayan haptenezasyon 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-HPLC) elde edilen piklerin değerlendirildiği DPRA uluslararası olarak onaylanmıştır. ECVAM tarafından 2013 yılında validasyonu yapılmıştır. 2015 yılında test kılavuzuna (TG) (OECD 442C) girmiştir ve özellikle kozmetik firmaları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Maxwell ve ark., 2011).

Alerjik temas dermatiti ile sonuçlanan deri hassasiyeti, gecikmiş tip hipersensitizasyon reaksiyonudur ve insanlarda kimyasal alerjinin en sık ortaya çıkan durumudur (Kimber ve ark., 2002). Endüstrileşmeye bağlı olarak artan potansiyel sensitizasyon maddeleri nedeniyle alerjik temas dermatiti insidansı her geçen gün artmaktadır. Sayısı gün geçtikçe artan kimyasal maddeleri tespit edebilmek için birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu testleri; insan testleri, hayvan testleri ve in vitro testler olarak sınıflandırmak mümkündür. İnsan testleri arasında en sık kullanılan test, yama testidir. Araştırmamda insan yama testi sonuçlarına dayanılarak duyarlılık oranları yüksek olan maddeler arasında yer alan parafenilendiamin (PPD), fragrans karışımı ve peru balsamı seçilmiştir (Akyol ve ark., 2005; Bovyat ve ark., 2005; Jowsey ve ark., 2006). Araştırmamda oldukça yaygın kullanılan bu maddelerin alerji potansiyellerinin in vitro bir yöntem olan DPRA ile tespit edilmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Doğrudan Peptit Reaktivite Testi (DPRA), lizin veya sistein içeren sentetik heptapeptitlerin tükenmesini ölçerek test kimyasallarının peptit reaktivitesini ölçen bir in chemico yöntemidir. Haptenasyon, yani, düşük moleküler ağırlıklı maddelerin (haptenler) ciltteki proteinlere kovalent bağlanması, kimyasalların veya metabolitlerinin antijenik hale gelmesini sağlayan önemli bir mekanizma olarak kabul edilir. Bu nedenle, DPRA gibi peptit reaktivite deneylerinden elde edilen bilgiler, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesi için uygun kabul edilir.

Testin amacı, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesine katkıda bulunmaktır. Haptenasyon, yani; düşük moleküler ağırlıklı maddelerin (haptenler) ciltte bulunan proteinlere kovalent bağlanması, kimyasalların veya metabolitlerinin antijenik hale geldiği önemli bir mekanizma olarak kabul edilir (OECD, 2012). Bu nedenle, DPRA gibi peptit reaktivite deneylerinden çıkarılan bilgiler, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesi ile ilgili bilgi sağlamaktadır (Gerberick ve ark., 2004; 2007). Kullanım ve uygulanabilirliğe ilişkin daha fazla ayrıntı, DB-ALM'deki DPRA Yöntem Özeti'nde, EURL ECVAM Tavsiyesi (EURL ECVAM, 2013) ve OECD TG No. 442C'de bulunabilir: "In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)" (OECD, 2015b).

2.1. Deneysel Açıklama

DOĞRUDAN PEPTİT REAKTİVİTESİ: Lizin veya sistein içeren sentetik heptapeptitlerin tükenmesinin nicelleştirilmesiyle ölçülür.

2.2. Sonucun Değerlendirilmesi

% peptit tükenmesi hesaplanarak bulunur.

2.3. Prosedür

Sistein veya lizin içeren sentetik heptapeptitler, 24 saat boyunca test çözeltileriyle inkübe edilir. Reaksiyon karışımındaki peptidin tükenmesi, UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UV-HPLC) ile ölçülür. Daha sonra sistein ve lizin için ortalama peptit tükenmesi verileri hesaplanır.

2.4. Validasyon Çalışmaları

DPRA protokolü, aktarılabiliirliğinin ve laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için bir EURL - ECVAM doğrulama çalışmasına katılmıştır. EURL - ECVAM çalışması, DPRA'nın HPLC analizinde yetkin olan uygun şekilde donatılmış laboratuvarlara aktarılabiliir olduğunu ve elde edilen sonuçların sırasıyla %87 ve %75 laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik gösterdiğini göstermiştir.

2.5. Yasal Kabul

Test yöntemi OECD Test Yönergesi No 442C: "Chemico Deri Hassasiyetinde Doğrudan Peptid Reaktivite Testi (DPRA)" olarak benimsenmiştir (OECD, 2015). TG 442C, BM'ye göre deride hassasiyet oluşturanlar ve hassasiyet oluşturmayanlar arasındaki farkı desteklemek için önerilen bir in-chemico prosedürü olarak kabul edilmektedir.

2.6. Prosedür Detayları

Protokol, Doğrudan Peptit Reaktivite Testinde EURL - ECVAM doğrulama çalışmasında kullanılan Standart Çalışma Prosedürüne (SOP) dayanmaktadır.

2.7. Materyal ve Hazırlık

DPRA, kimya bazlı bir tahlildir. Nükleofilik kısım içeren sentetik peptitler (sistein peptit - Ac-RFAACAA-COOH; lizin peptidi - Ac-RFAAKAA-COOH), alerjenler ve alerjen olmayan test kimyasalları ile inkübasyonun ardından, peptit tükenmesini ölçerek deri hassasiyet potansiyelini taramak için kullanılır.

2.8. Ekipmanlar

- AGILENT ZORBAX SB-C18 2,1 mm x100mmx3,5 micron
- Lizin peptit
- Sistein peptit
- Trifloroasetik asit
- Sodyum fosfat monobazik monohidrat
- Sodyum fosfat dibazik heptahidrat
- Amonyum asetat
- Amonyum hidroksit (pH ayarlaması için kullanıldı)
- Asetonitril
- Sınnamik aldehit (pozitif kontrol olarak kullanıldı.)

2.9. Asetonitril Hakkında Not

- Bazı asetonitril kaynakları, peptit stabilitesi (özellikle sistein) üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bu deneye başlamadan önce aşağıdaki adımlar kontrol edilmiştir:
- Fosfat tamponu içerisinde küçük bir miktar 0,501 mg / mL sistein peptit solüsyonu hazırlanmıştır.
- 750 mikrolitre peptit solüsyonu ve 250 mikrolitre asetonitril içeren bir flakon hazırlanmıştır.
- 24 saat inkübe edilmiştir.
- Flakonda çökeltme olup olmadığı gözlemlenmiştir.
- Bu protokolde tanımlanan koşulları kullanarak bir HPLC çalışması kurulmuştur. Bu numune yaklaşık 48 saat boyunca her 2-3 saatte bir enjekte edilmiştir.
- Her enjeksiyon için pik alanları karşılaştırılmıştır. $CV < \% 15$ olarak ölçülmüştür.

2.10. Re-ajanların Hazırlanması

2.10.1. 100 mM Sodyum Fosfat Tampon Hazırlanması

Protokol doğrultusunda 200 mM sodyum fosfat dibazik çözeltisi hazırlamak için 1419,6 mg sodyum fosfat dibazik tartıldı ve 50 mL'ye distile su ile tamamlandı. 40,5 mL otomatik pipetle çekildi.

Protokol doğrultusunda 200 mM sodyum fosfat monobazik hazırlamak için 239,96 mg sodyum fosfat monobazik tartıldı 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. 9,5 mL otomatik pipetle çekildi.

40,5 mL sodyum fosfat dibazik çözeltisi ve 9,5 mL sodyum fosfat monobazik çözeltisi homojen olarak karıştırıldı ve 50 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak fosfat tamponun son hali hazırlanmış oldu. Son pH 7,5 olarak ölçüldü.

2.10.2. 100 mM Amonyum Asetat Tampon Hazırlanması

Protokol doğrultusunda 100 mM amonyum asetat tampon hazırlamak için; 85,4 mg amonyum asetat tartılarak 50 mL'ye distile su ile tamamlandı. Amonyum hidroksit ile pH 10,2 olarak ayarlandı.

2.11. HPLC Fazlarının Hazırlanması

HPLC Mobil Faz A: %0,1 h/h olacak şekilde; 1000 mL distile su içerisine 1 mL TFAA (trifloroasetik asit) eklenerek mobil Faz A hazırlandı.

HPLC Mobil Faz B: 1000 mL asetonitril içerisine 0,85 mL TFAA eklenerek mobil Faz B hazırlandı.

2.12. Test Kimyasallarının Hazırlanması

Test kimyasallarının uygun bir çözücü içindeki çözünürlüğü, deney gerçekleştirilmeden önce değerlendirilmelidir. Uygun bir çözücü, test kimyasalını tamamen çözecektir. Yani görsel inceleme ile çözelti bulanık olmamalı veya gözle görülür bir çökelti içermemelidir. Asetonitril, test kimyasalları için tercih edilen çözücüdür, ancak tüm kimyasallar asetonitril içinde çözünmez. Uygun çözücünün seçimi için aşağıdaki prosedür izlenmelidir:

- Asetonitril içinde yaklaşık 100 mM çözelti hazırlayarak çözünürlük değerlendirilir. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Test kimyasalı asetonitril içinde çözünür değilse, suda 100 mM'lik bir çözelti hazırlanır. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Test kimyasalı tek başına asetonitril veya suda çözünür değilse, 1:1 su: asetonitril karışımı içinde 100 mM'lik bir çözelti hazırlanır (birçok organik tuz için iyi bir çözücüdür). Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Test kimyasalı asetonitril veya suda çözünür değilse, izopropanol içinde 100 mM'lik bir çözelti hazırlanır. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Test kimyasalı asetonitril, su veya izopropanol içinde çözünür değilse, aseton veya 1:1 aseton: asetonitril karışımı içinde 100 mM'lik bir çözelti hazırlanır. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Son bir seçenek olarak, kimyasal bu çözücülerin hiçbirinde çözünmüyorsa, aynı miktarda test kimyasalını 300 mikrolitre dimetil sülfoksit içinde çözmek denenebilir ve elde edilen çözelti 2700 mikrolitre asetonitril ile seyreltilir. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.
- Test kimyasalı bu karışımda çözünmüyorsa, aynı miktarda test kimyasalı 1500 mikrolitre dimetil sülfoksit içinde çözülür ve elde edilen solüsyonu 1500 mikrolitre asetonitril ile seyreltilir. Vortex ile karıştırılır. Test kimyasalı tamamen çözünmezse, flakon bir ultrasonik su banyosuna (1 dakika veya daha az) yerleştirilebilir.

2.12.1. Test Kimyasallarının Tartımı

Test kimyasalları, temiz, kuru 4 mL cam flakonlara önceden tartılır. Test kimyasalları kullanımdan hemen önce 100 mM'lik bir çözelti hazırlamak için 3 mL uygun çözücü içinde çözülecektir.

2.13. Lizin ve Sistein Peptit Solüsyonlarının Hazırlanması

Bilinen kimyasal deri alerjenlerinin çoğu (veya metabolitleri veya oksidasyon ürünleri) elektrofilik özelliklere sahiptir ve kovalent bağlar oluşturmak için çeşitli nükleofillerle reaksiyona girebilirler. Proteinler de, birçok amino asidin yan zincirleri, elektrofilik alerjenlerle reaksiyona girebilen elektron açısından zengin gruplar yani nükleofiller içerir. Lizin ve sistein, nükleofiller olarak iyi karakterize edilir. Ancak; histidin, metiyonin ve tirozin gibi nükleofilik heteroatomlar içeren diğer amino asitlerin iyi karakterize edilemediği bildirilmiştir (Dupuis ve Benezra, 1982; Lepoittevin ve ark., 1998; Ahlfors ve ark., 2003).

- Sistein çözeltisi: 0,501 mg/mL konsantrasyonunda hazırlandı.
- Lizin çözeltisi: 0,518 mg/mL konsantrasyonunda hazırlandı.

Yani;

- 1 mg sistein tartıldı ve 2 mL'ye fosfat tampon çözeltisi ile tamamlandı.
- 1,036 mg lizin tartıldı ve 2 mL'ye amonyum asetat tampon çözeltisi ile tamamlandı.

2.14. HPLC Sisteminin Hazırlanması ve Kullanılması

HPLC mobil faz A ve HPLC mobil faz B hazırlanır. HPLC kolonu takılır ve kolon kullanılmadan önce en az 2 saat süreyle % 50 A, % 50 B fazları ile 30 °C'de dengelenir.

2.15. Pozitif Kontrol Çözeltilisinin Hazırlanması

Pozitif kontrol olarak sinnamik aldehit kullanılmıştır. Sinnamik aldehit, asetonitril içinde çözünür. Test için Pozitif Kontrol olarak kullanılır ve her test çalışmasına dahil edilir.

2.16. Referans Kontrol Hazırlanması

Referans Kontrol, test kimyasalının onu çözmek için kullanılan çözücü ile değiştirildiği bir peptit çözeltisidir. Referans Kontrol A, asetonitril ile hazırlanır ve peptit ölçümü için kalibrasyon eğrisinin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla kullanılır.

2.17. Numune Hazırlanması ve Co-Elüsyon Kontrolü

Örnekler her iki peptit için de üç kopya halinde hazırlanmıştır. Test kimyasalının 220 nm'de absorbe edip etmediğini ve bir peptit ile benzer bir tutma süresine sahip olup olmadığını ve veri analizine müdahale edip edemeyeceğini doğrulamak için peptit olmadan bir numune hazırlanmaktadır. Buna koelüsyon (Co-elution) kontrol denir.

2.18. Test Kimyasallarının Hazırlanması

Çalışmamızda test kimyasalı olarak PPD (parafenilendiamin), geraniol, izoöjenol ve SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak sinnamik aldehit kullanılmıştır.

Test kimyasalları ve pozitif kontrol çözeltileri her iki peptit için de (lizin ve sistein) protokol doğrultusunda tartılarak 3 mL asetonitril'de çözülmüştür. SDS'nin

asetonitril içerisindeki çözünmesi güç olduğu için 3 mL distile su içerisinde çözülerek test kimyasal çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. Test kimyasallarının hazırlanması.

1:10 oranı Sistein Peptit	1:50 oranı Lizin Peptit
750 mikrolitre sistein stok çözeltisi (Co-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 (Co-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 hazırlandıktan sonra karıştırmak için vortekslenir ve 24 saat 25°C'de HPLC'ye (karanlık olacak şekilde) yerleştirilir. Örnek serisinin HPLC analizi, test kimyasalının peptit çözeltisine eklenmesinden 24 saat sonra başlamalıdır.

2.19. Standart Peptit Çözeltilerinin Hazırlanması

Seri seyreltme yaparak 1 – 0,0167 mM aralığını kapsayan peptit stok çözeltisinin standartları hazırlanır.

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) hazırlanır. 1600 µL peptit stok solüsyonunu (0,667 mM'de) 400 µL asetonitril ile seyrelterek 0,534 mM'de başlangıç standardı "STD-1" hazırlanır.

Çizelge 2.2. Standart Peptit çözeltilerinin hazırlanması.

	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6	STD-7 (dilüsyon tampon çözeltisi)
mM peptit	0,534	0,267	0,1335	0,0667	0,0334	0,0167	0,000

2.20. Seri seyreltme prosedürü ve detayları

1. Cam flakonlar STD-1 – STD-7 olacak şekilde işaretlendi.
2. STD-1 yazan flakona 1600 mikrolitre stok çözelti ve 400 mikrolitre asetonitril eklendi.
3. STD-2'ye 1000 mikrolitre STD-1 ve 1000 mikrolitre dilüsyon tampon çözeltisi eklendi. Minimum hava girişi ile karıştırıldı.
4. STD-3'e 1000 mikrolitre STD-2 ve 1000 mikrolitre dilüsyon tampon çözeltisi eklendi. Minimum hava girişi ile karıştırıldı.
5. Bu işlemler sırasıyla STD-6 dahil olmak üzere tüm flakonlar için sırasıyla uygulandı.
6. STD-7 yazan flakona sadece dilüsyon tampon eklendi.
7. Hazırlanan standart çözeltiler 24 saat boyunca 25°C'de karanlıkta inkübe edildi.

2.21. Hedef Ölçümü

2.21.1. HPLC Analizi

1. Uygun kolon, HPLC sistemine kuruldu. Tüm sistem solventler ve 30°C kolon sıcaklığı ile dengelendi.
2. Her standart, numune ve kontrol numunelerinden eşit hacimlerde sisteme enjekte edildi. Enjeksiyon hacmi, kullanılan sisteme göre genel olarak 3-10 mikrolitre aralığında değişebilmektedir. Bazı sistemlerde, 10 µL

enjeksiyon hacimleri, kabul edilemeyecek kadar geniş piklere neden olmakta ve daha küçük enjeksiyon hacimlerinin kullanılması gerekmektedir. Absorbans 220 nm'de izlenir. Photodiode Array dedektörü kullanılıyorsa, 258 nm'deki absorbans da kaydedilmelidir.

3. Kolon başlangıç koşullarında en az 7 dakika boyunca kalibre edilmelidir.

2.21.2. HPLC Koşulları

Çizelge 2.3. HPLC koşulları.

Kolon	Zorbax SB-C18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 mikron			
Kolon sıcaklığı	30 °C			
Numune sıcaklığı	25 °C			
Dedektör	Miktar tayini için Photodiode Array dedektörü veya 220 nm sinyalli Sabit Dalgaboyu absorbans dedektörü			
Enjeksiyon hacmi	yaklaşık 7 mikrolitre			
Çalışma süresi	20 dakika			
Akış hızları	zaman	akış	%A	%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	bitiş		

HPLC analizinden önce hazırlanan numuneler görsel olarak incelendi. Büyük miktarlarda çökeltiler HPLC kolonlarını tıkayabileceğinden, numuneler santrifüjlenmeli ya da ultrasonik banyoda daha önceden çözünmeleri sağlanmalıdır. Çökeltiyi gidermek için numunelerin filtrelenmesi veya yüksek hızlı polipropilen santrifüj tüplerinin kullanılması değerlendirilmemiştir. Adsorpsiyon yoluyla peptit kaybına yol açabileceğinden bu yöntem önerilmemektedir.

2.21.3. Veri Analizi

Her numunede peptit konsantrasyonu, 220 nm'de absorbanstan belirlenir. Uygun piklerin pik alanı ölçülür ve standartlardan (STD-1 ile STD-7) türetilen

doğrusal kalibrasyon eğrileri kullanılarak peptit konsantrasyonu hesaplanır. Her numunede peptidin tükenme yüzdesi, pik alanının ölçülerek ve bunu referans kontrollerin ortalama pik alanına bölünmesiyle belirlenir.

$$\% \text{ Peptit Tükenmesi} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptik Pik Alanı}}{\text{Referans Kontrol Ortalama Pik Alanı}} \right) \right] \times 100 \quad (2.1)$$

Standartların konsantrasyonu ve elde edilen pik alanlarına dayalı olarak doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Uygun kalibrasyon eğrileri $r^2 > 0,990$ olarak bulunmalıdır. Referans Kontrol-A için, peptit konsantrasyonuna bağlı olarak standart sapma hesaplanır. Bulunan değer ortalama $0,50 \pm 0,05$ mM olmalıdır. Bu aralığın dışında bulunan değerler, enjeksiyon hatası veya numune hazırlama sırasında oluşan hatalardan kaynaklanıyor olabilir.

2.21.4. Kabul Kriterleri

Elde edilen ölçümler sonucunda kalibrasyon doğrusallığı $r^2 > 0,990$ olarak bulunmalıdır. Referans Kontrol-A'nın ortalama peptit konsantrasyonu $0,50 \pm 0,05$ mM olmalıdır.

Sinnamik aldehit (pozitif kontrol) için üç enjeksiyonun ortalama Peptit Tükenme Yüzdesi değeri, aşağıdaki tabloda bildirilen aralıklar içinde olmalıdır:

Çizelge 2.4. Kabul kriterleri.

	Yüzde peptit tükenmesi (Sistein için)		Yüzde peptit tükenmesi (Lizin için)	
	Alt sınır	Üst sınır	Alt sınır	Üst sınır
Pozitif kontrol (Sinnamik aldehit)	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.

Çalışmanın belirli bir test kimyasalı için geçerli olabilmesi adına tüm kriterlerin karşılanması gerekmektedir. Bu kriterler karşılanmazsa, çalışma test kimyasalı için tekrarlanmalıdır. Tekrarlanan örneklerin maksimum standart sapmaları;

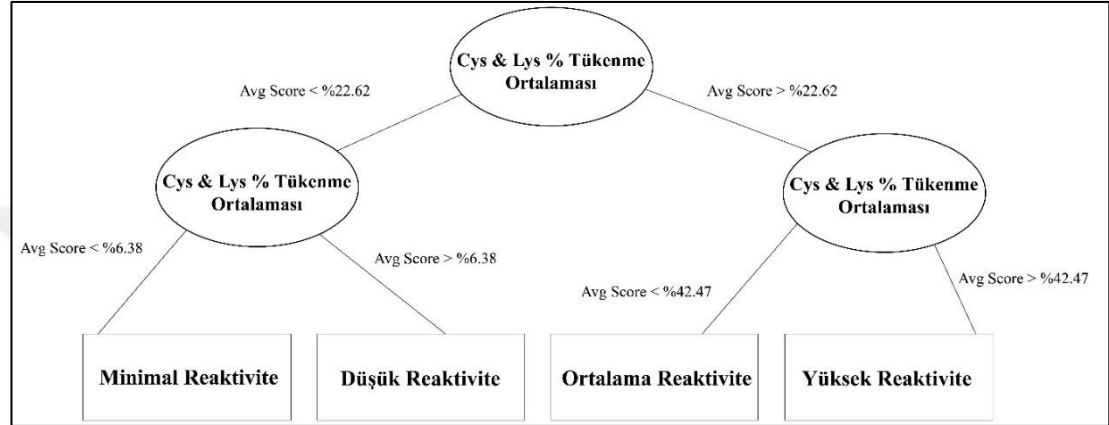
- Yüzde sistein tükenmesi için standart sapma $< \%14,9$
- Yüzde lizin tükenmesi için standart sapma $< \%11,6$ olmalıdır.

2.22. Tahmin Modeli

DPRA, kimya bazlı bir tahlildir. Nükleofil içeren sentetik peptitler, test malzemeleriyle (alerjenler ve alerjen olmayanlar) inkübasyonun ardından peptit tükenmesini ölçerek deri hassasiyet potansiyelinin belirlenmesi için kullanılır. Ya sistein ya da lizin içeren sentetik heptapeptitler için, kullanılan peptidin kimyasal oranı sırasıyla 1:10 ve 1:50'dir. İki sentetik peptit ile 24 saatlik bir reaksiyon döneminin ardından, numuneler, reaksiyonu takiben peptidin tükenmesinin gözlenebilmesi adına UV dedektörlü HPLC ile analiz edilir. Sistein ve lizin için ortalama peptit tükenmesi verileri daha sonra kimyasalların minimal, düşük, orta veya yüksek reaktiviteye sahip olarak sınıflandırıldığı bir sınıflandırma ağacı modelinde kullanılır. Genel olarak, orta ila yüksek reaktiviteye sahip kimyasallar, orta ila güçlü alerjenite ile ilişkilendirilirken; düşük ila minimum reaktiviteye sahip olarak kategorize edilenler, zayıf ve hassasiyet oluşturmamaları içerir. Bununla birlikte, bağımsız bir yöntem olarak DPRA'nın bir kimyasalın duyarlılık potansiyelini tahmin etme kapasitesine sahip olduğunu düşünmek uygunsuz olacaktır. Bununla birlikte, reaktivite bilgisinin, hem tehlikenin tanımlanması hem de potens tahmini için gelecekteki entegre bir yaklaşımda önemli bir rol oynayacağı öngörülmektedir.

Çizelge 2.5. Sistein 1:10 / Lizin 1:50 tahmin modeli.

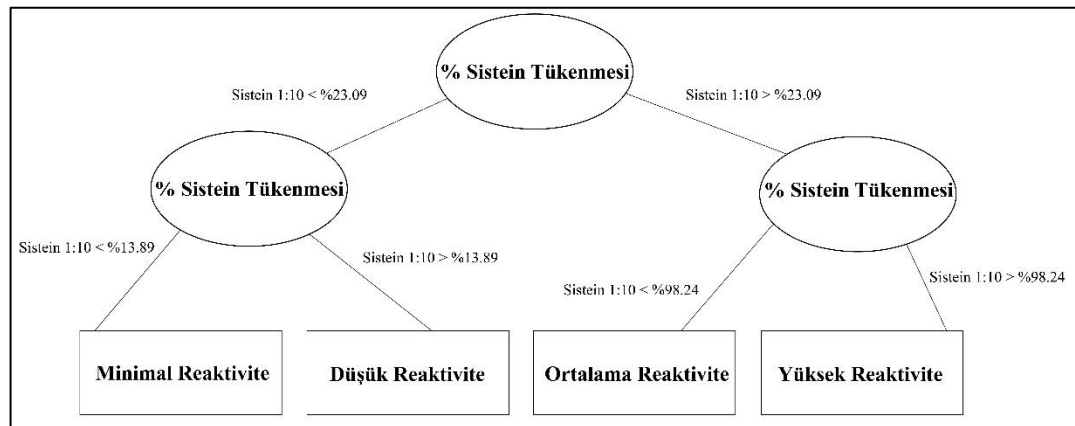
Sistein ve Lizin % Tükenme Ortalaması	Reaktivite Sınıfı	DPRA Tahmini
%0 < ortalama % tükenme < %6,38	Reaktivite yok veya minimum düzeyde	Negatif
%6,38 < ortalama % tükenme < %22,62	Düşük reaktivite	Pozitif
%22,62 < ortalama % tükenme < %42,47	Orta reaktivite	
%42,47 < ortalama % tükenme < %100	Yüksek reaktivite	



Şekil 2.1. Sistein 1:10 / Lizin 1:50 tahmin modeli.

Çizelge 2.6. Sistein 1:10 tahmin modeli.

Sistein (Cys) % Tükenmesi	Reaktivite Sınıfı	DPRA Tahmini
%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	



Şekil 2.2. Sistein 1:10 tahmin modeli.

Test kimyasalının lizin peptidiyle birlikte elüsyonu, doğru bir tükenme değerinin belirlenmesini engellediğinde, kimyasalı tek başına sistein peptidi için tükenme değerine dayalı olarak reaktivite sınıflarına sınıflandırmak için bir tahmin modeli mevcuttur. Tek başına lizin peptidin tükenme değerine dayalı bir tahmin modeli mevcut değildir. Test geliştiricisi, ECVAM'a başvurusunda bunun nedeninin; lizin reaktivitesinin yalnızca lizin tahmin modelini yürütmek için yeterli ağırlık taşımadığını ve reaktivite sınıflarını doğru bir şekilde tahmin etmek için sistein tükenme değerinin mutlaka gerekli olduğunu bildirmiştir.



3. BULGULAR

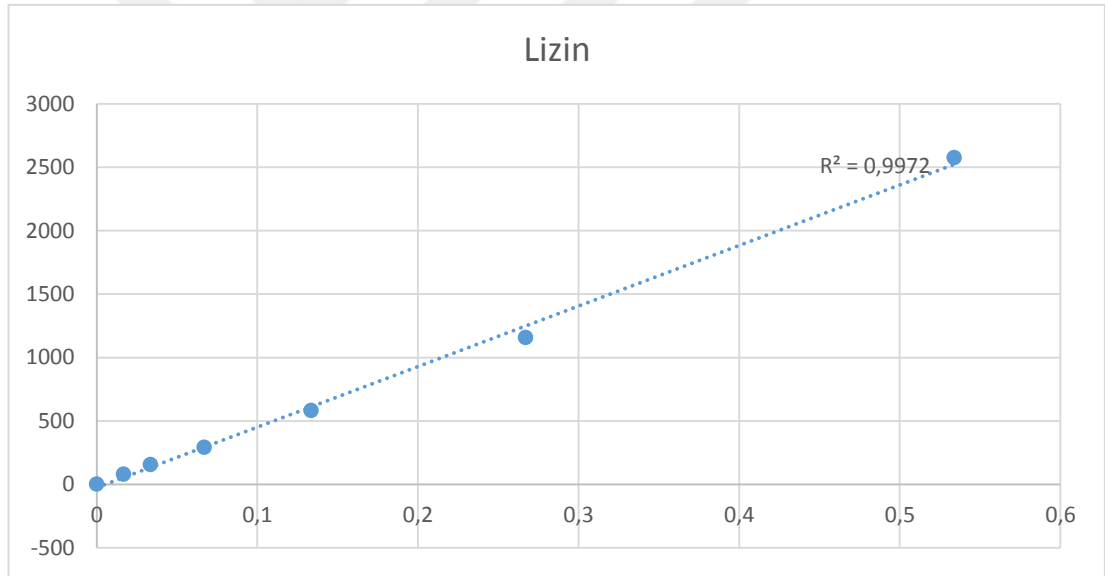
Protokol doğrultusunda hazırlanan lizin ve sistein çözeltileri 24 saat inkübe edildikten sonra her numunede peptit konsantrasyonu, 220 nm'de absorbanstan belirlenmiştir. Uygun piklerin pik alanı ölçülerek, standartlardan (STD-1 ile STD-7) türetilen doğrusal kalibrasyon eğrileri kullanılarak peptit konsantrasyonu hesaplanmıştır. Aşağıda absorbanlar ve absorbanlara ait standart eğri grafikleri sunulmaktadır. Standart eğri grafiklerinde x konsantrasyon; y ise pik alanını ifade etmektedir.

Çizelge 3.1. Lizin için standartlara ait sonuçlar.

Standart numarası	Konsantrasyon	Pik alanı	Ortalama $\pm$ standart sapma (SS)
STD-1	0,534 mg/mL	2950	2574,3 $\pm$ 375,5
		2199	
		2574	
STD-2	0,267 mg/mL	1173	1156 $\pm$ 17
		1139	
		1156	
STD-3	0,1335 mg/mL	588	583,3 $\pm$ 5,033
		578	
		584	
STD-4	0,067 mg/mL	297	290,3 $\pm$ 6,506
		284	
		290	
STD-5	0,0334 mg/mL	155	152 $\pm$ 3
		149	
		152	
STD-6	0,00167 mg/mL	80	80,3 $\pm$ 0,5773
		81	
		80	
STD-7	dilüsyon tamponu	-	-

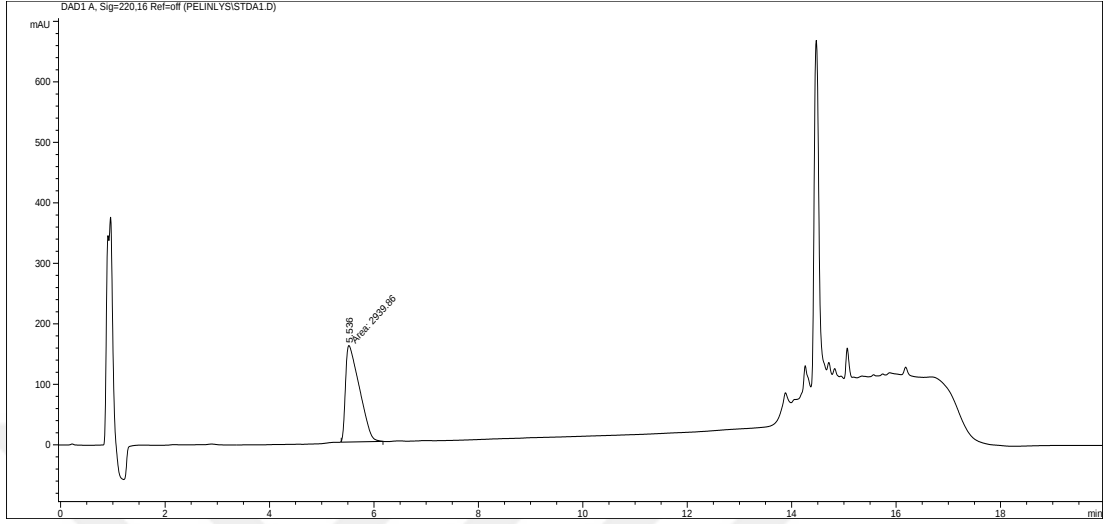
Çizelge 3.2. Lizin için kimyasallara ait sonuçlar.

Kimyasal numarası	Pik alanı	Ortalama $\pm$ standart sapma (SS)
Parafenilendiamin (PPD) (TC-1)	61	71 $\pm$ 10
	81	
	71	
Geraniol (TC-2)	1865	1853,3 $\pm$ 11,50
	1842	
	1853	
İzoöjenaol (TC-3)	1823	1820,3 $\pm$ 2,51
	1818	
	1820	
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (TC-4)	14,89	16,63 $\pm$ 1,74
	18,37	
	16,63	
Pozitif kontrol (sinnamik aldehit)	179	183,5 $\pm$ 4,5
	188	
	183,5	
Referans kontrol-A	1948	1973,3 $\pm$ 25,501
	1999	
	1973	

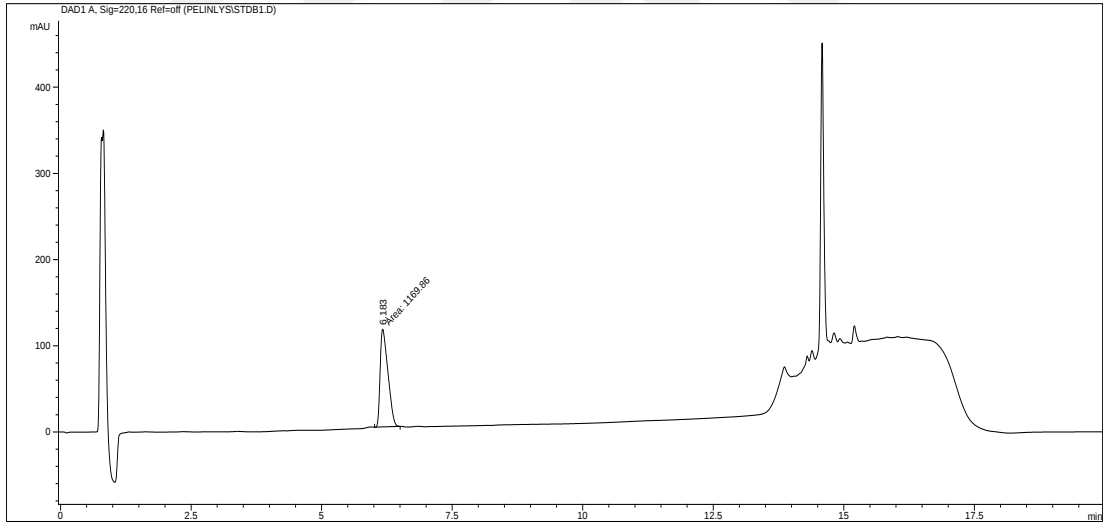


Şekil 3.1. Lizin için elde edilen r^2 grafiği.

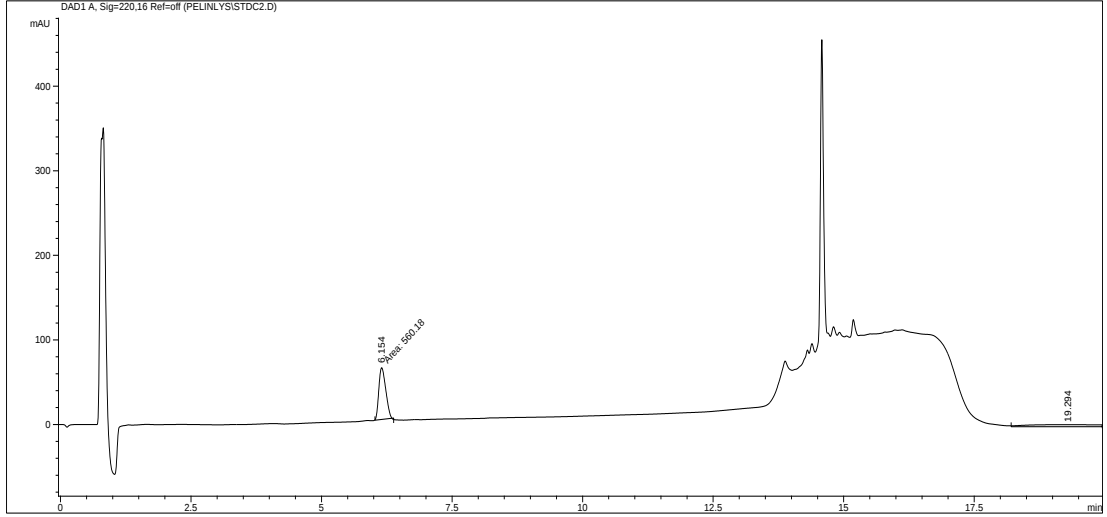
3.1. Lizin için Standartlara Ait Kromatogramlar



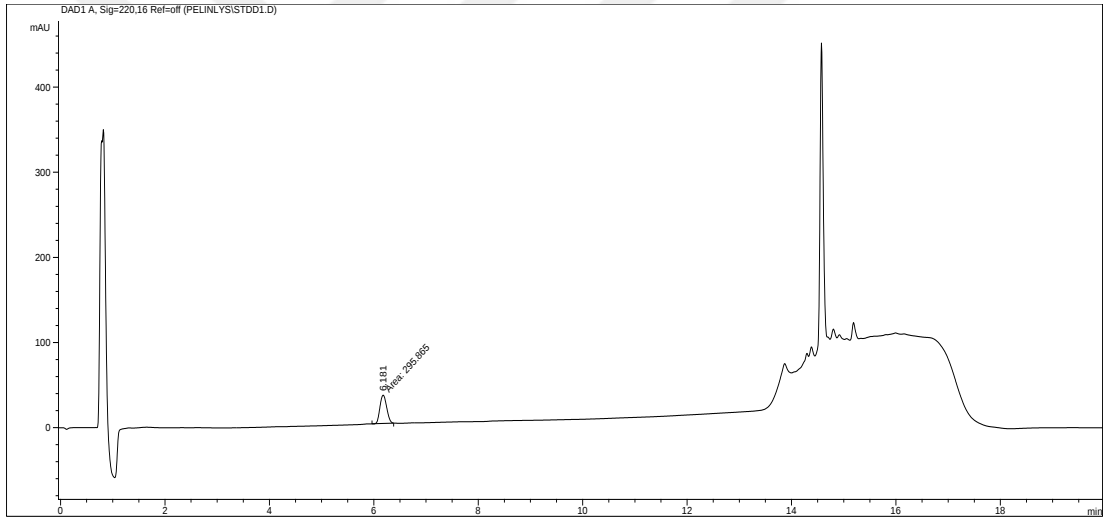
Şekil 3.2. Lizin standart-1 (Lys STD-1).



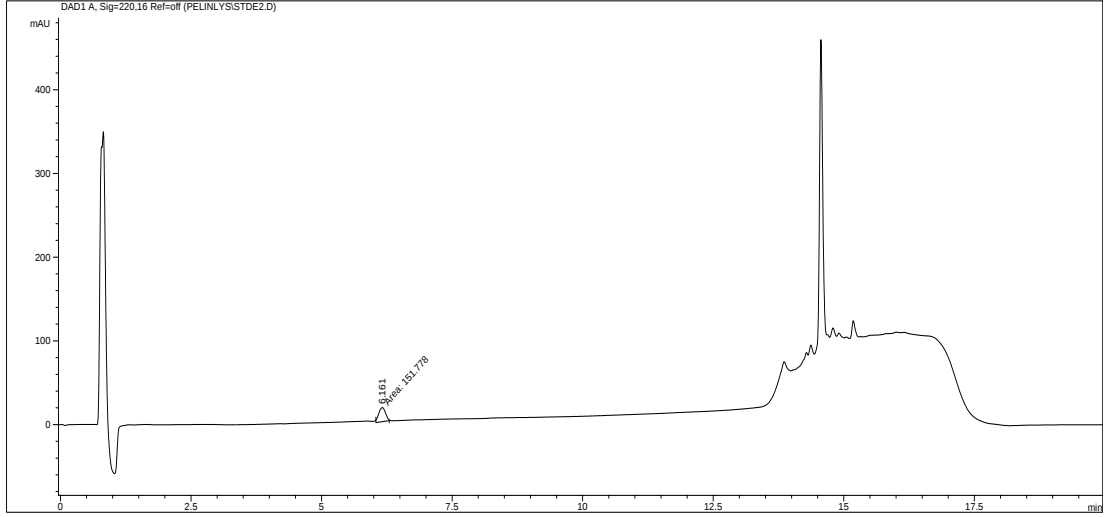
Şekil 3.3. Lizin standart-2 (Lys STD-2).



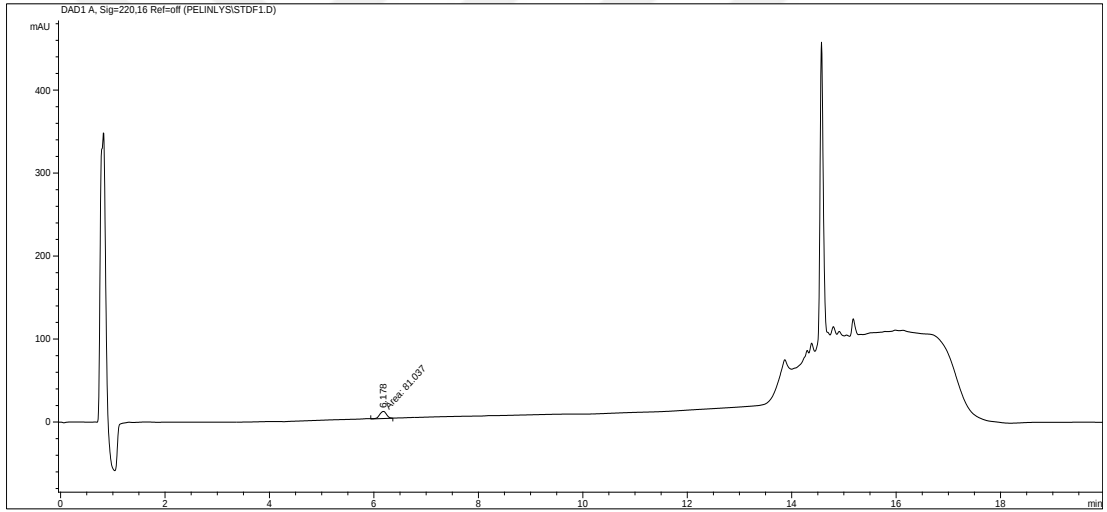
Şekil 3.4. Lizin standart-3 (Lys STD-3).



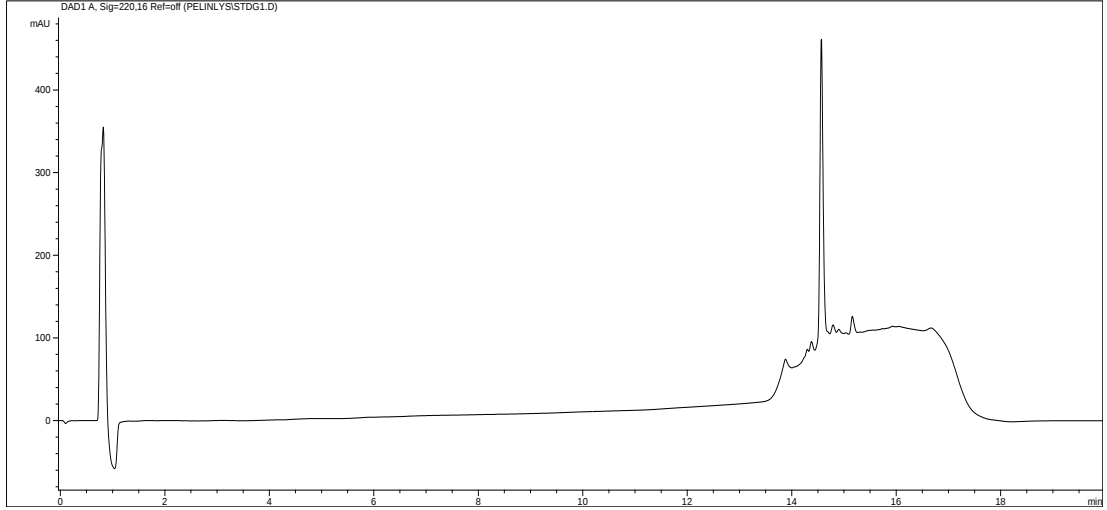
Şekil 3.5. Lizin standart-4 (Lys STD-4).



Şekil 3.6. Lizin standart-5 (Lys STD-5).

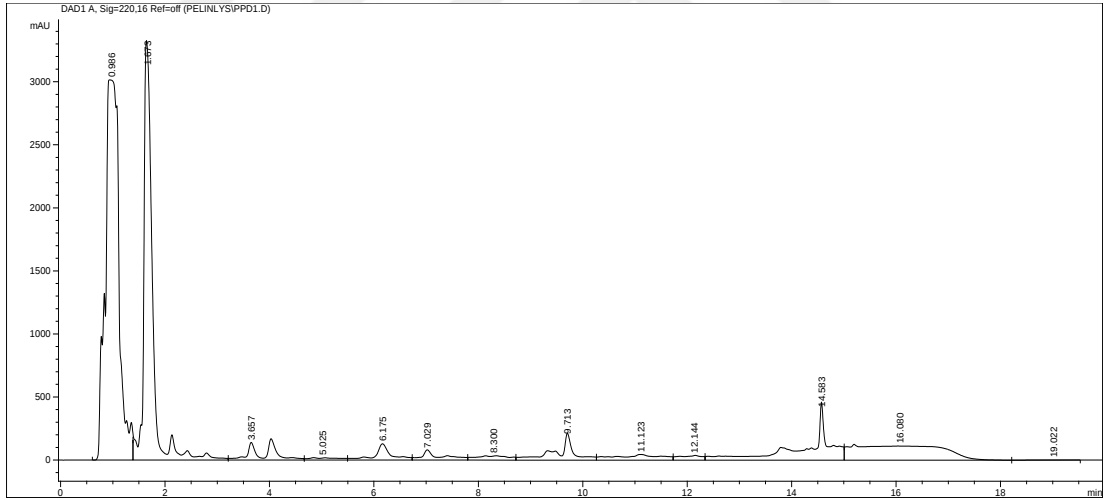


Şekil 3.7. Lizin standart-6 (Lys STD-6).

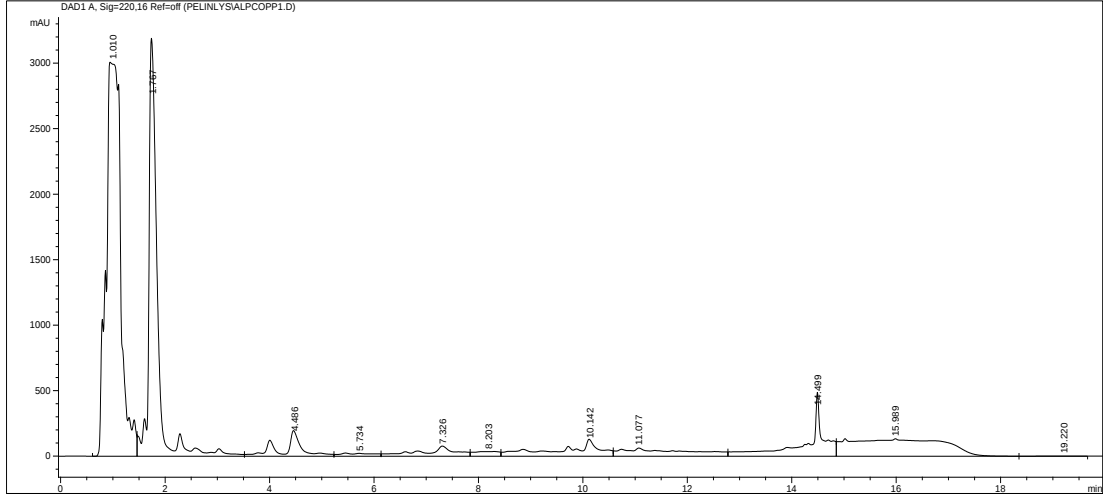


Şekil 3.8. Lizin standart-7 (Lys STD-7).

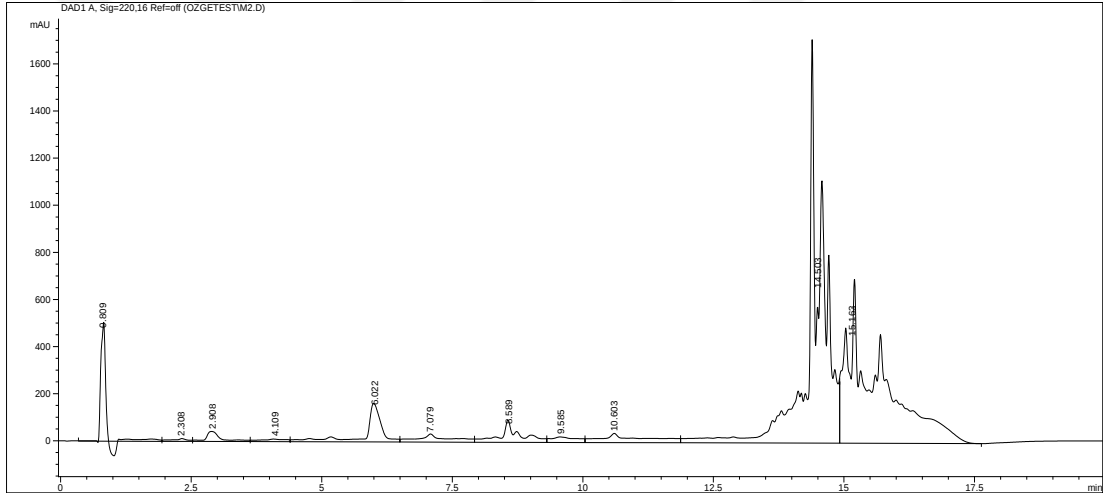
3.2. Lizin için Kimyasallara Ait Kromatogramlar



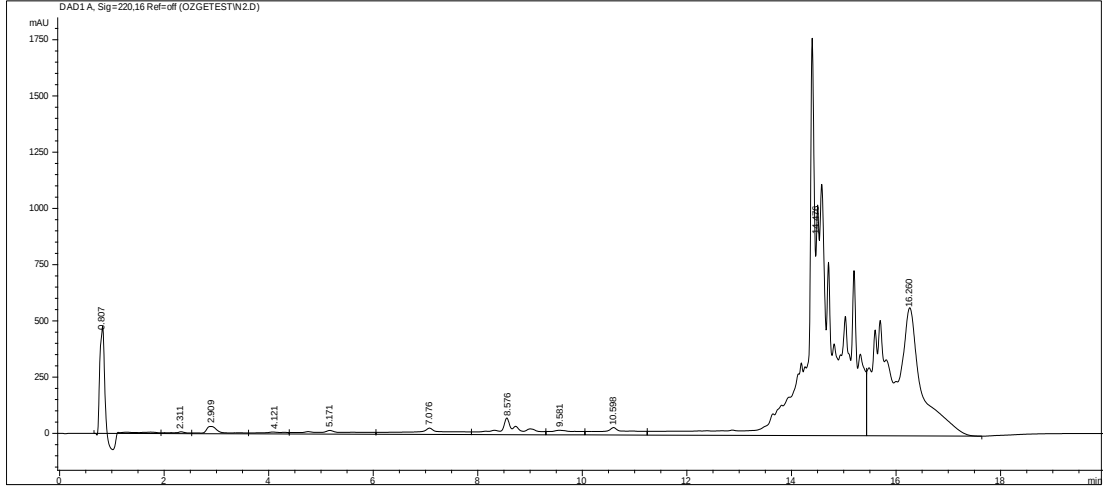
Şekil 3.9. Lizin ve PPD (parafenilendiamin) (TC-1).



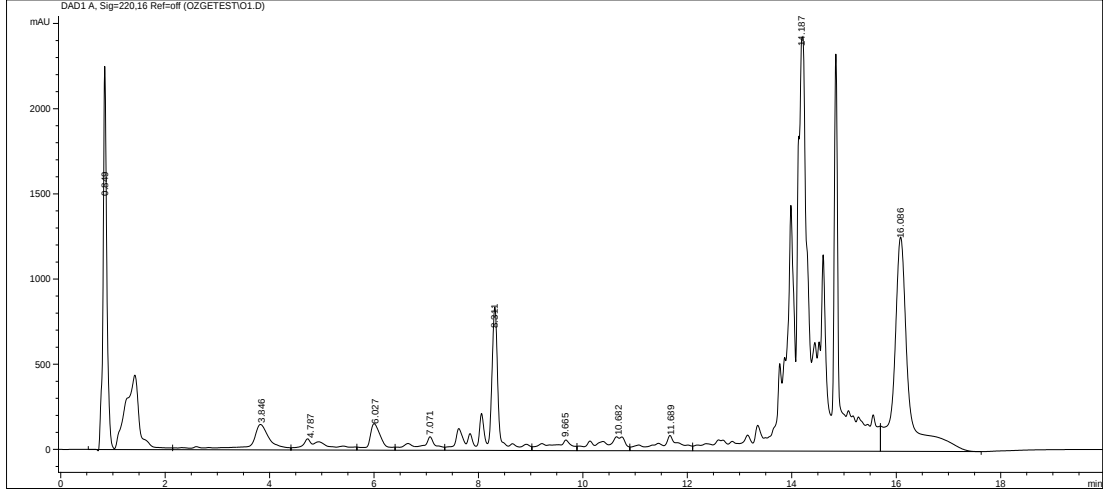
Şekil 3.10. Lizin ve PPD (parafenilendiamin) koelüsyon grafiği (TC-1 Co-el).



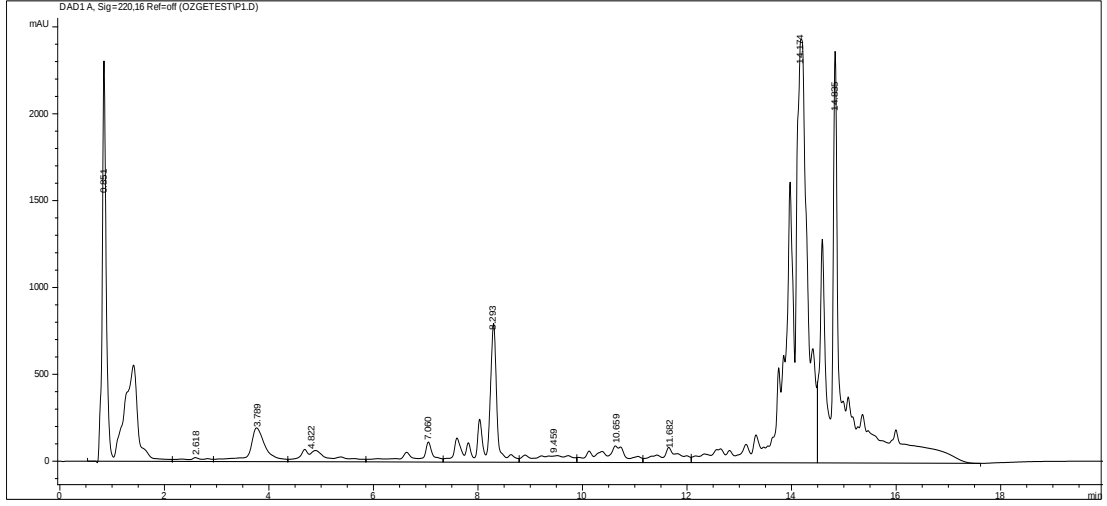
Şekil 3.11. Lizin ve Geraniol (TC-2).



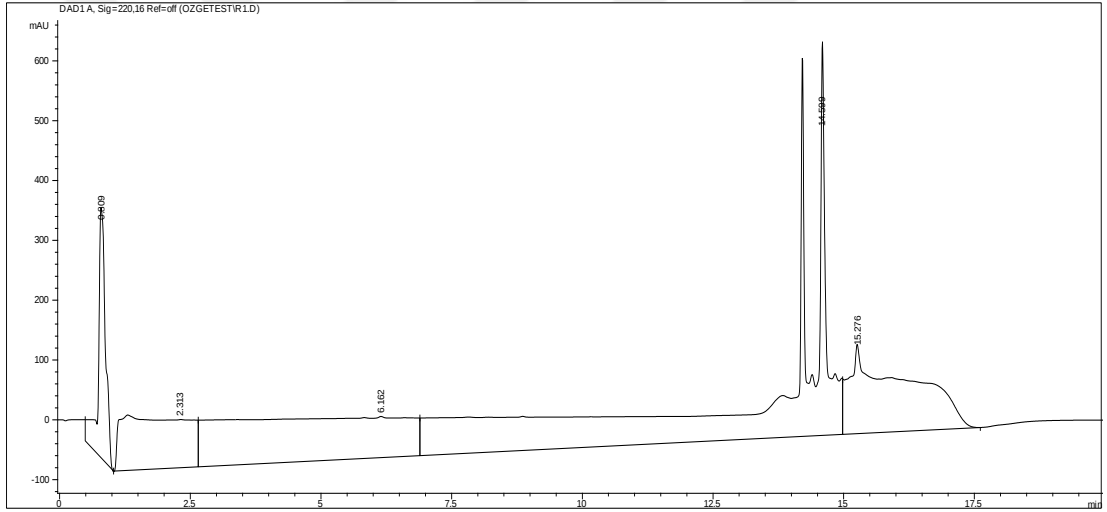
Şekil 3.12. Lizin ve Geraniol koelüsyon grafiği (TC-2 Co-el).



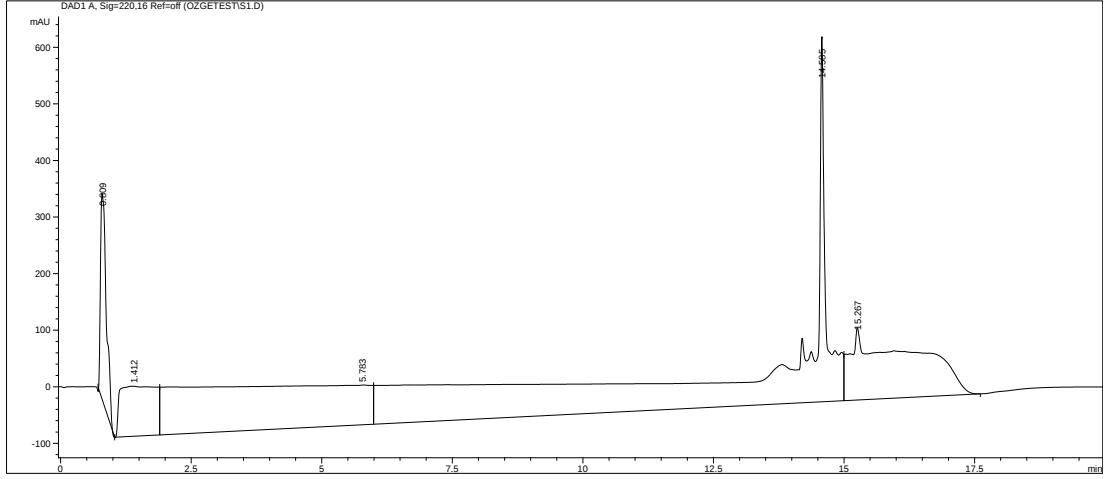
Şekil 3.13. Lizin ve İzöjenaol (TC-3).



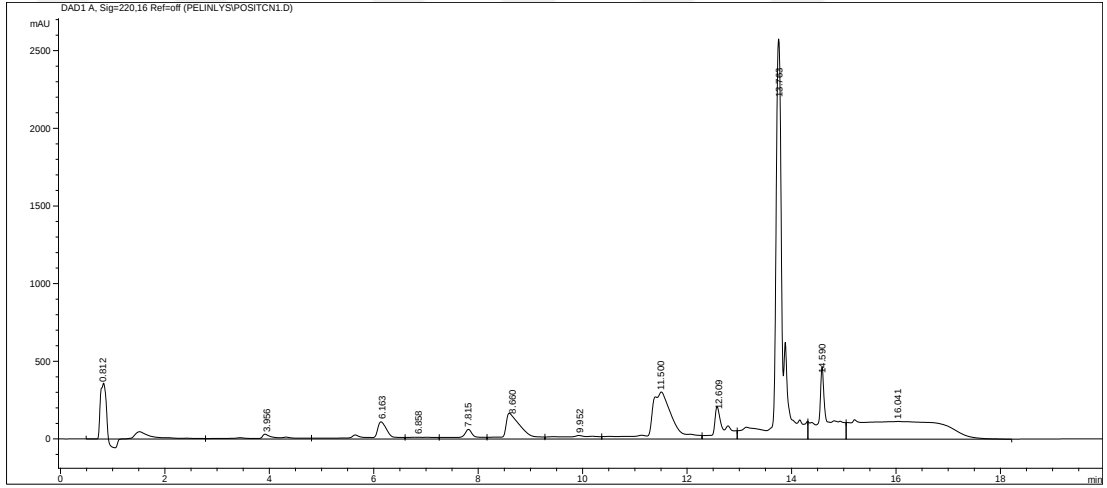
Şekil 3.14. Lizin ve İzöjenol koelüsyon grafiği (TC-3 Co-el).



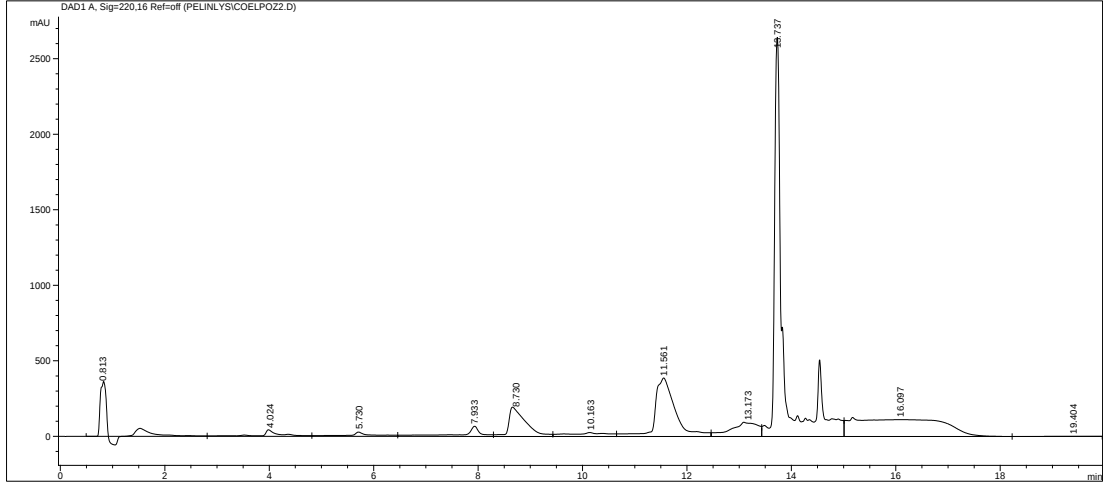
Şekil 3.15. Lizin ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (TC-4).



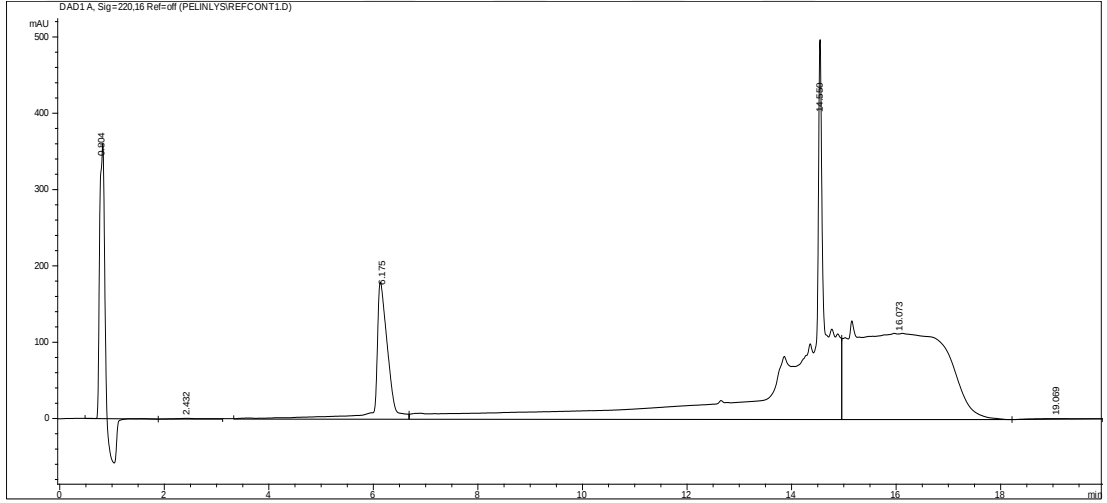
Şekil 3.16. Lizin ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) koelüsyon grafiği (TC-4 Co-el).



Şekil 3.17. Lizin pozitif kontrol.



Şekil 3.18. Lizin pozitif kontrol koelüsyon grafiği.



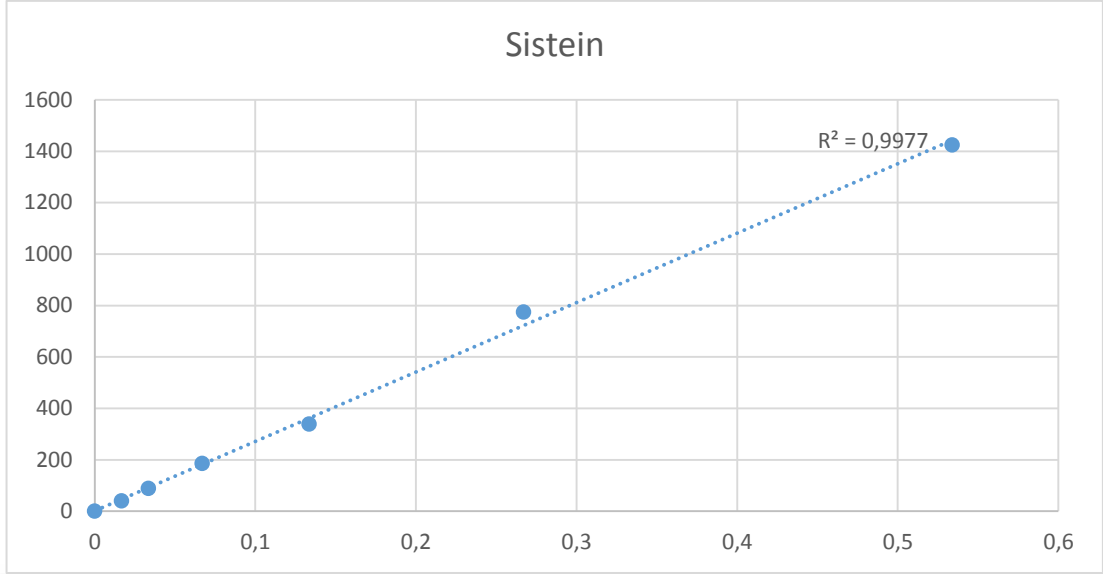
Şekil 3.19. Lizin referans kontrol-A.

Çizelge 3.3. Sistein için standartlara ait sonuçlar.

Standart numarası	Konsantrasyon	Pik alanı	Ortalama ± standart sapma (SS)
STD-1	0,534 mg/mL	1399	1409,6 ± 12,89
		1424	
		1406	
STD-2	0,267 mg/mL	789	787,6 ± 13,05
		800	
		774	
STD-3	0,1335 mg/mL	354	338,6 ± 15,01
		324	
		338	
STD-4	0,067 mg/mL	180	185 ± 4,35
		187	
		188	
STD-5	0,0334 mg/mL	88	87,6 ± 0,57
		88	
		87	
STD-6	0,00167 mg/mL	37	40,4 ± 3,53
		42	
		42,48	
STD-7	dilüsyon tamponu	-	-

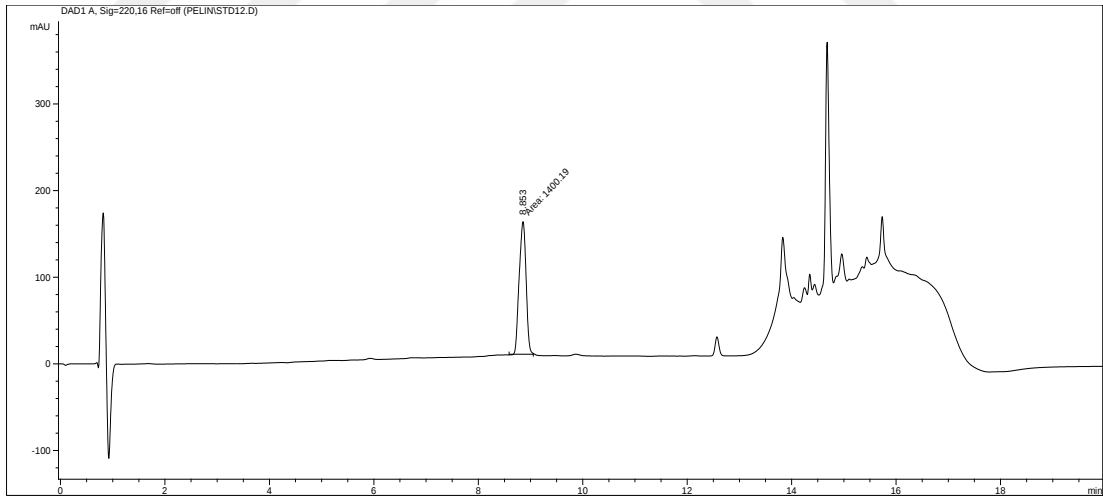
Çizelge 3.4. Sistein için kimyasallara ait sonuçlar.

Kimyasal numarası	Pik alanı	Ortalama ± standart sapma (SS)
Parafenilendiamin (PPD) (TC-1)	11	10,6 ± 0,57
	10	
	11	
Geraniol (TC-2)	848	850,3 ± 2,51
	853	
	850	
İzoöjenaol (TC-3)	83	80,4 ± 2,50
	78	
	80.2	
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (TC-4)	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	

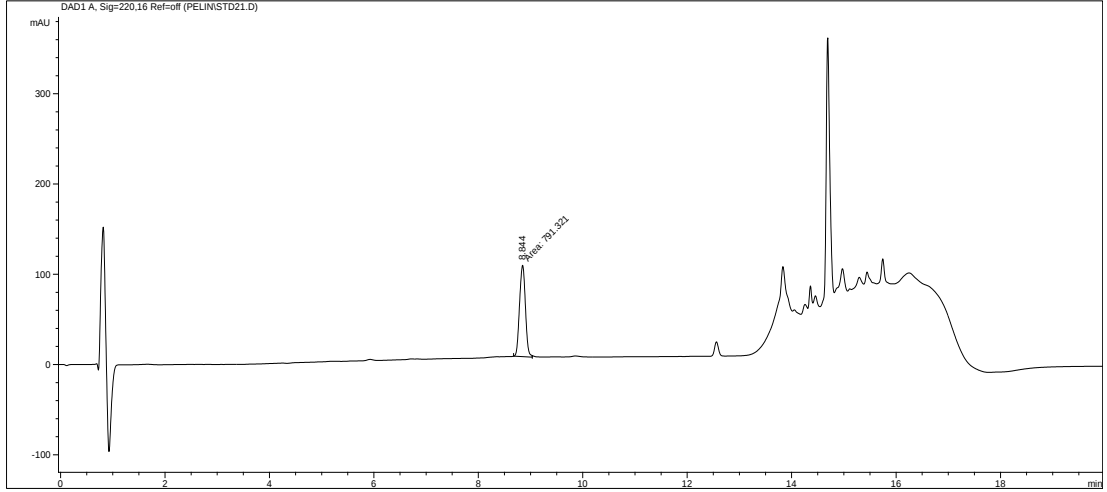


Şekil 3.20. Sistein için elde edilen r^2 grafiği.

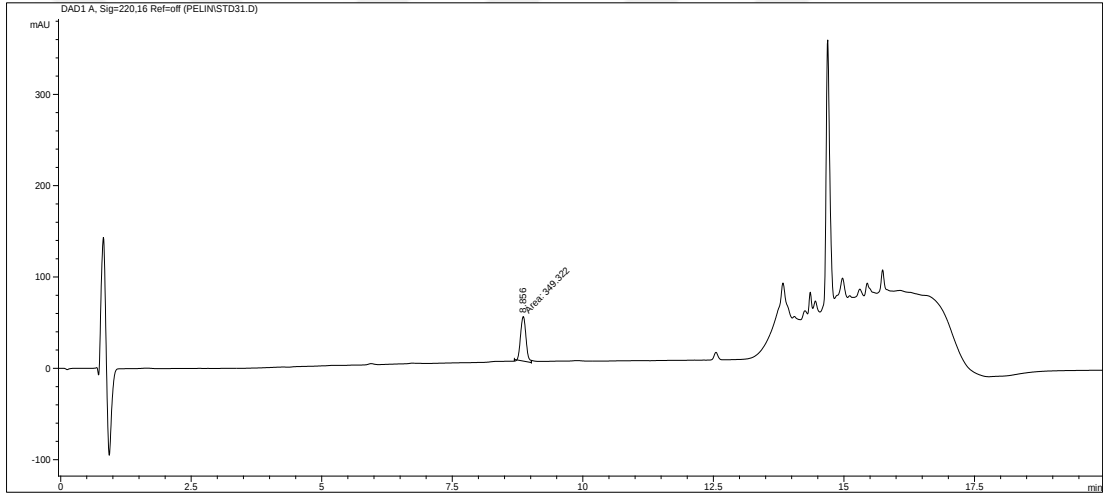
3.3. Sistein için Standartlara Ait Kromatogramlar



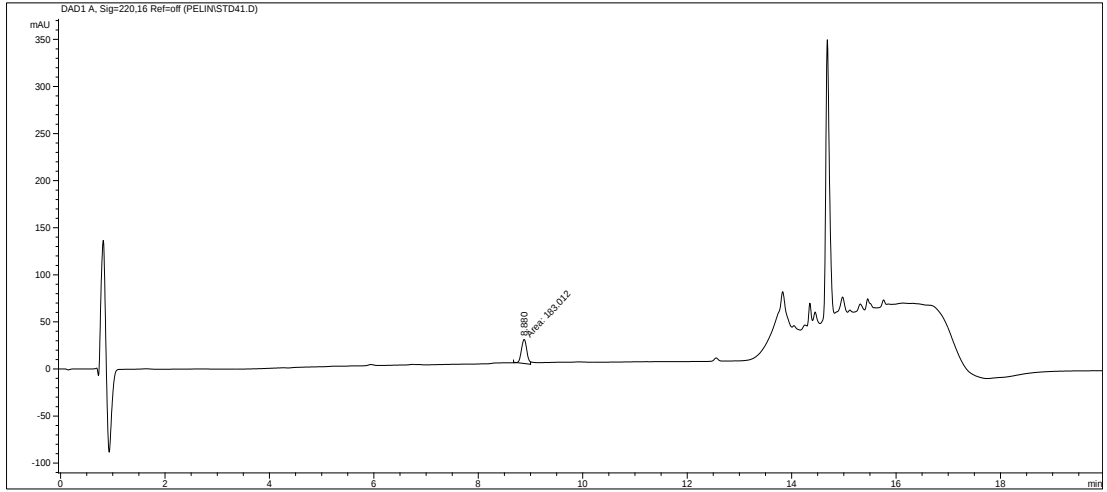
Şekil 3.21. Sistein standart-1 (Cys STD-1).



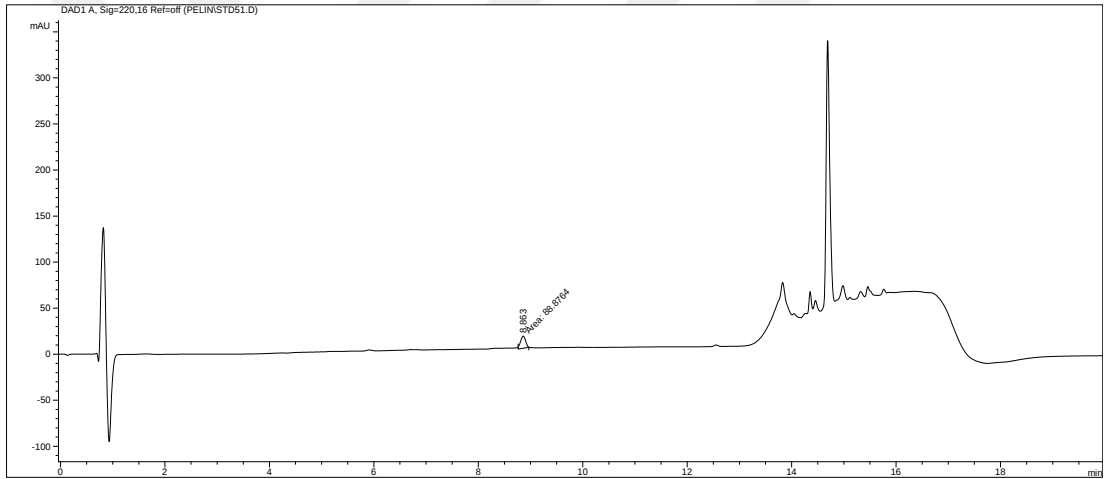
Şekil 3.22. Sistein standart-2 (Cys STD-2).



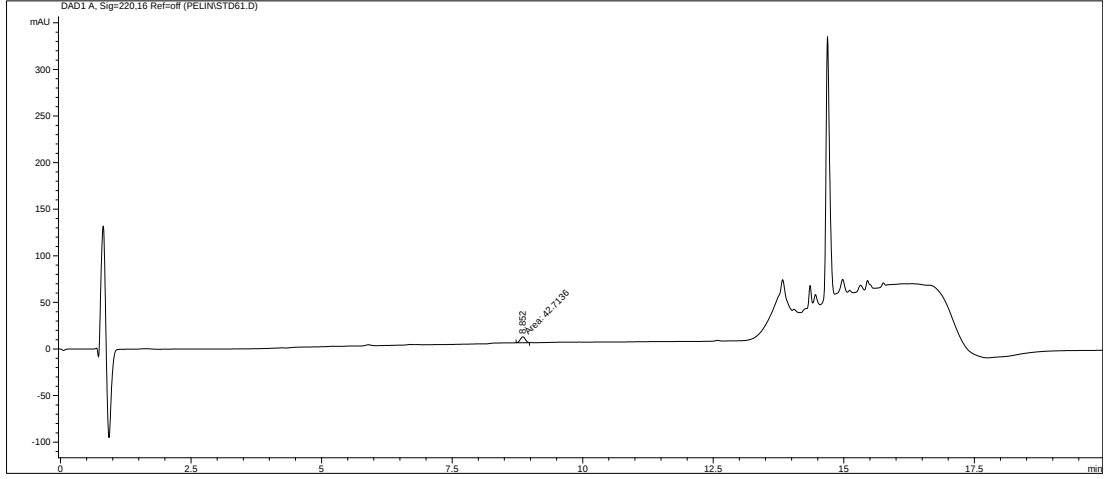
Şekil 3.23. Sistein standart-3 (Cys STD-3).



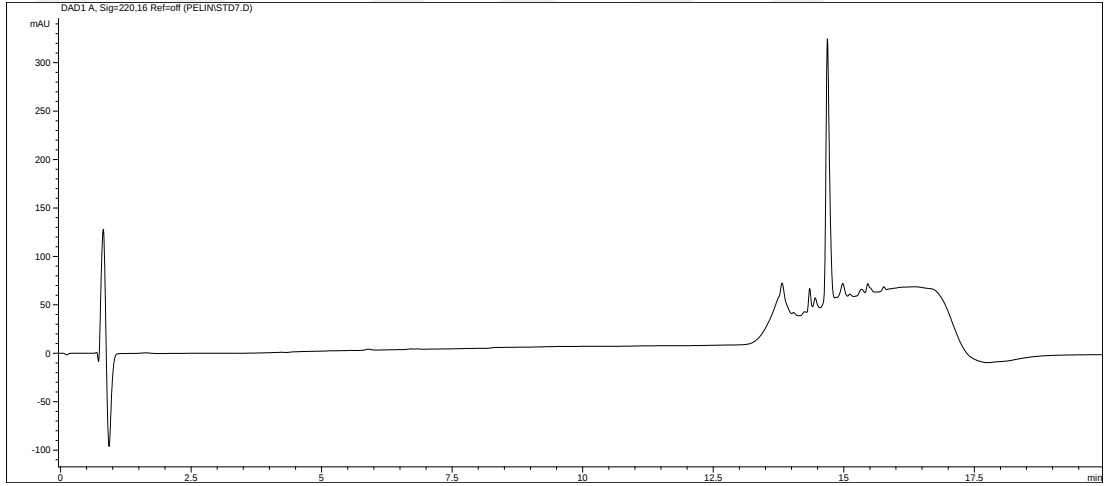
Şekil 3.24. Sistein standart-4 (Cys STD-4).



Şekil 3.25. Sistein standart-5 (Cys STD-5).

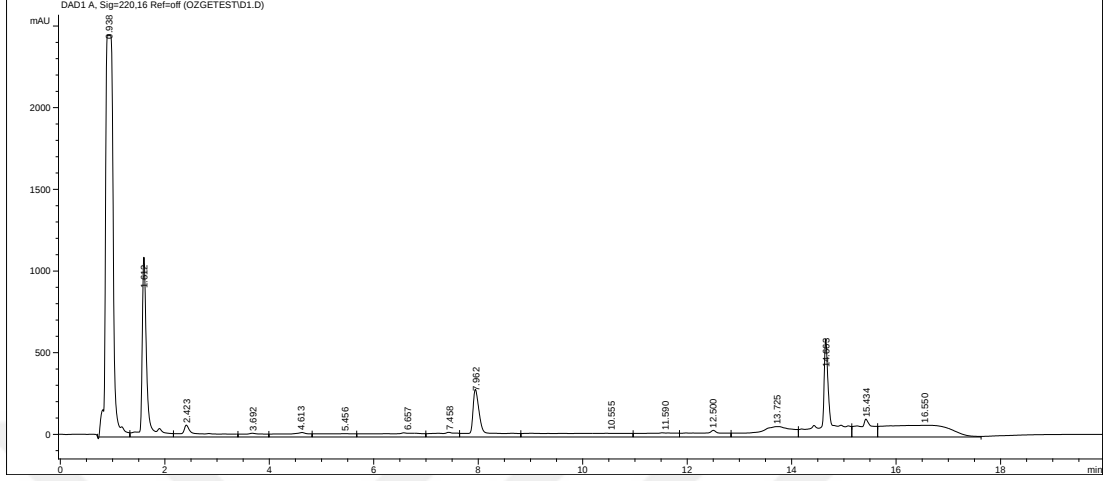


Şekil 3.26. Sistein standart-6 (Cys STD-6).

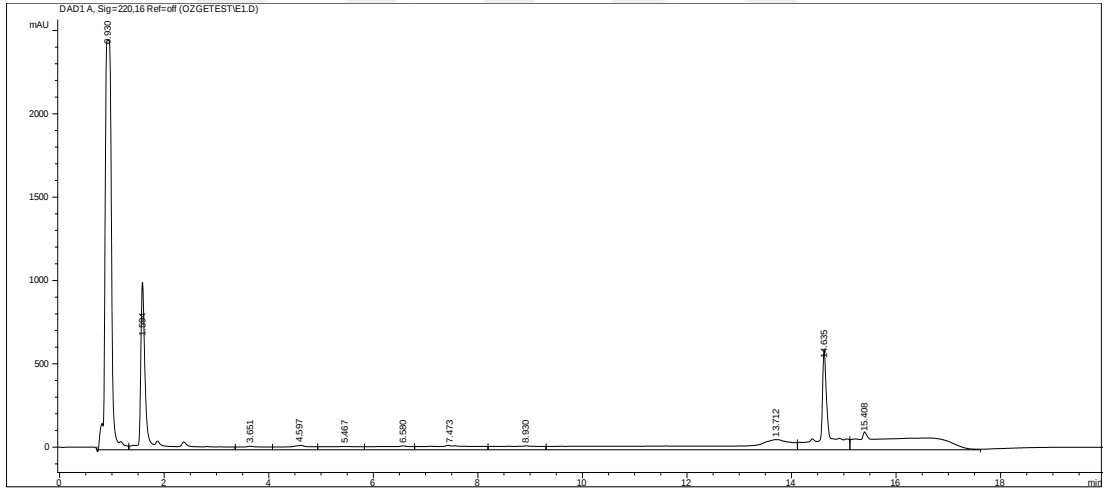


Şekil 3.27. Sistein standart-7 (Cys STD-7).

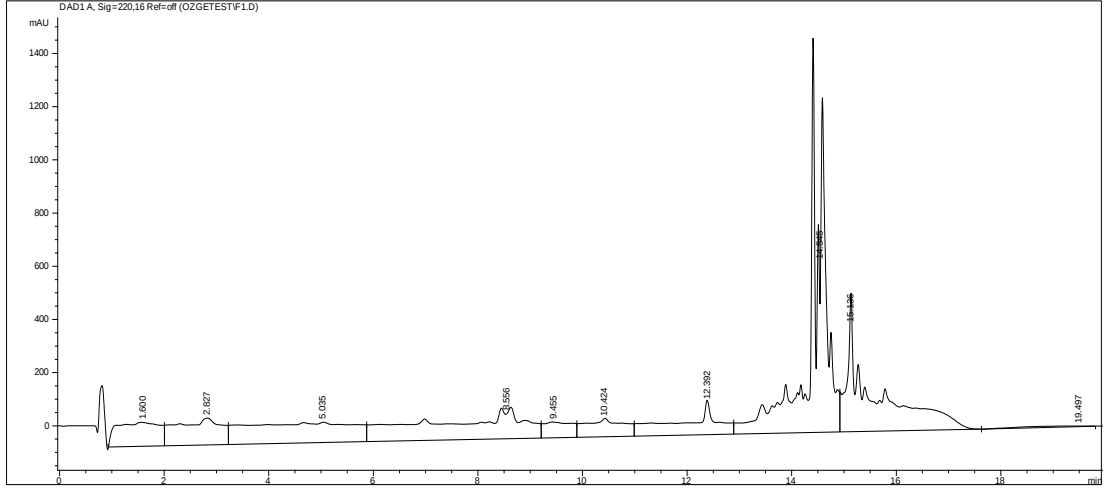
3.4. Sistein için Kimyasallara Ait Kromatogramlar



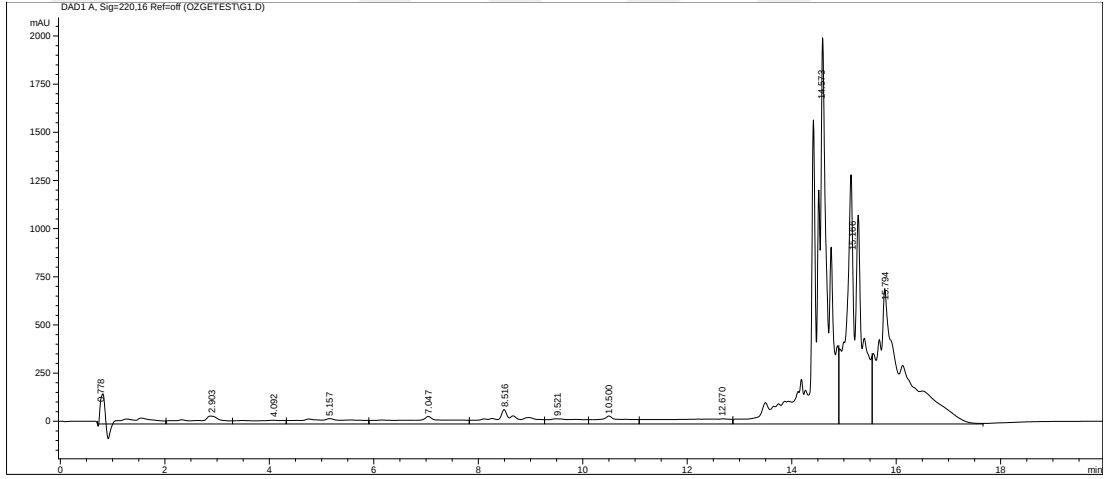
Şekil 3.28. Sistein ve Parafenilendiamin (PPD) (TC-1).



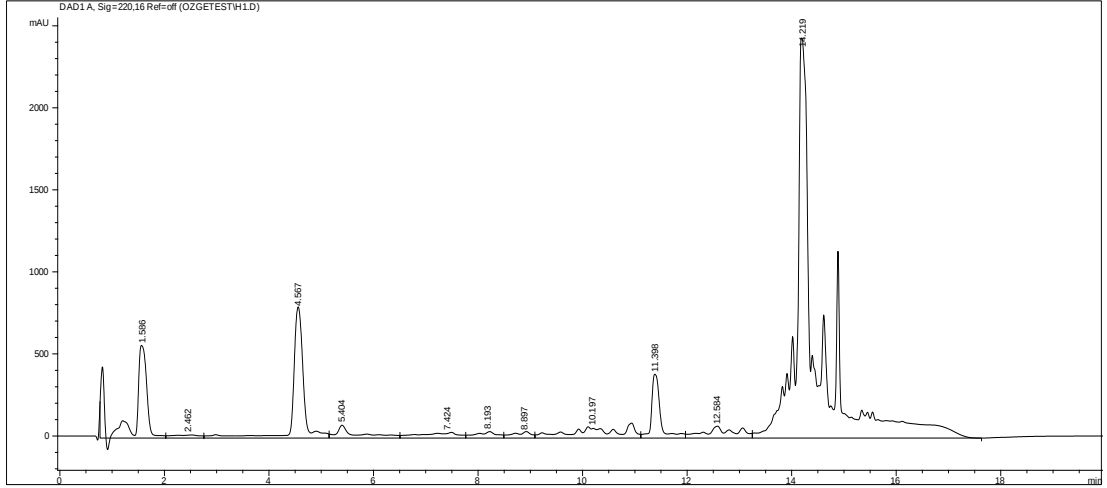
Şekil 3.29. Sistein ve Parafenilendiamin (PPD) koelüsyon grafiği (TC-1 Co-el).



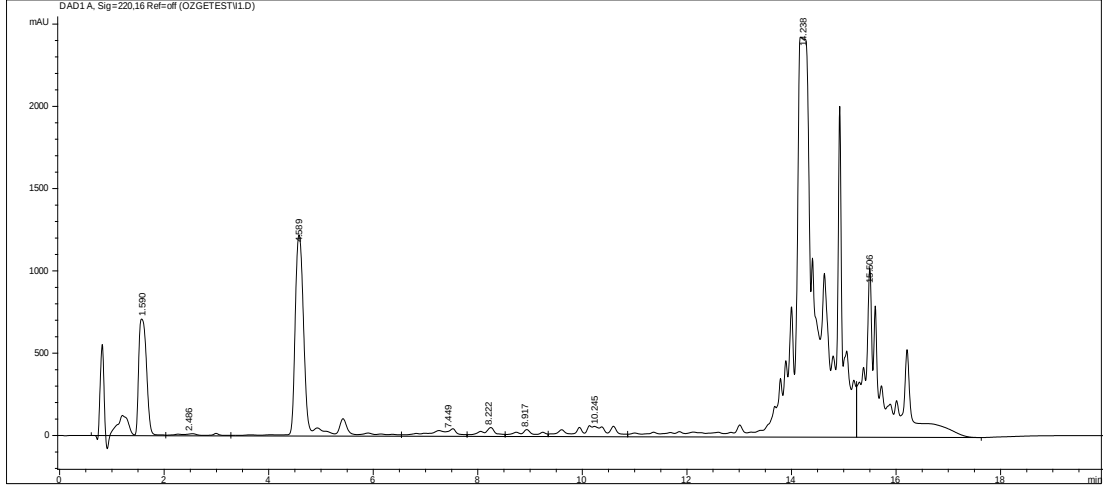
Şekil 3.30. Sistein ve Greaniol (TC-2).



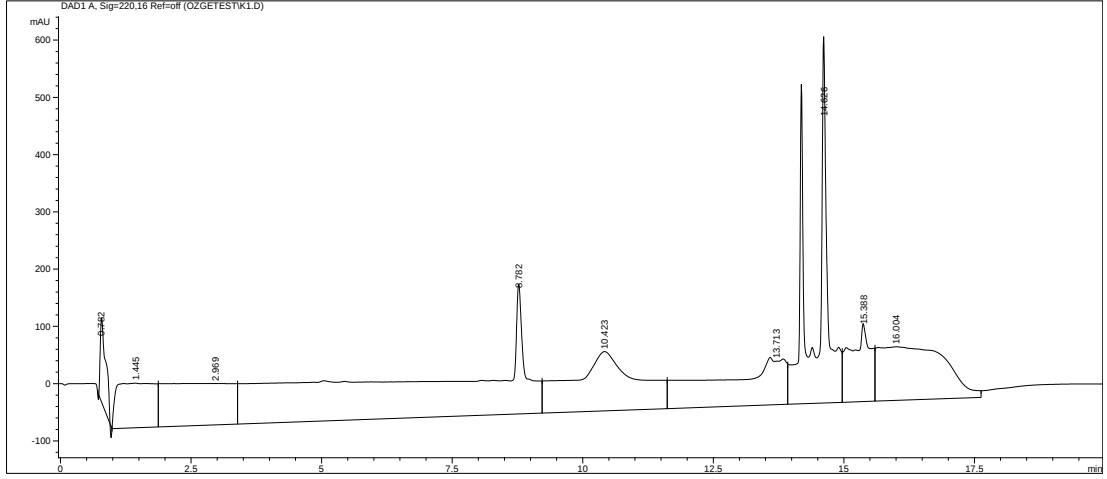
Şekil 3.31. Sistein ve Geraniol koelüsyon grafiği (TC-2 Co-el).



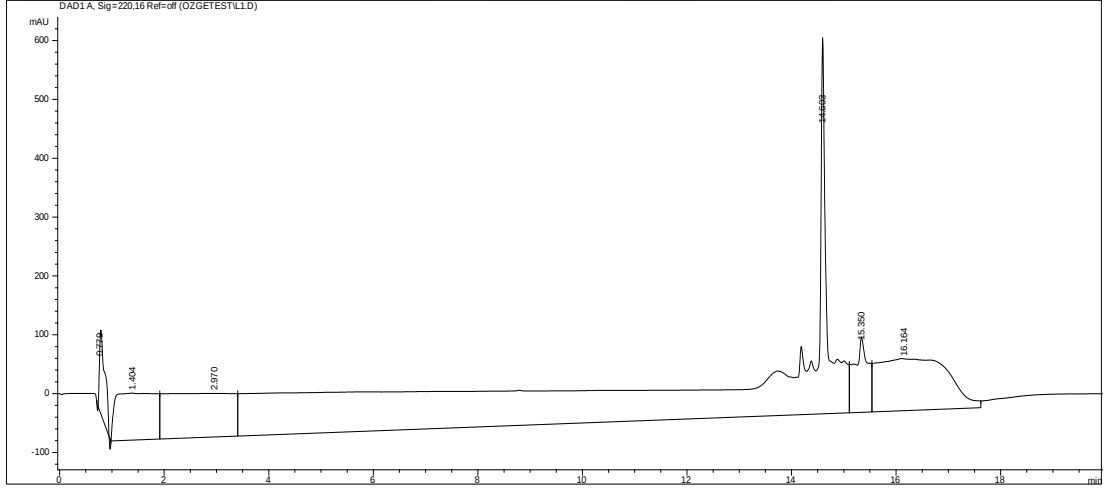
Şekil 3.32. Sistein ve İzöjenol (TC-3).



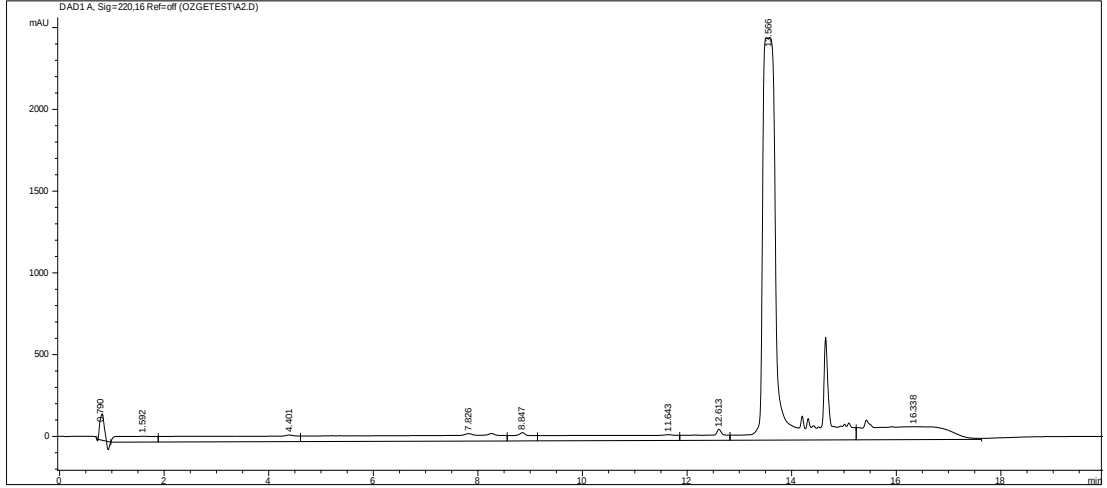
Şekil 3.33. Sistein ve İzöjenol koelüsyon grafiği (TC-3 Co-el).



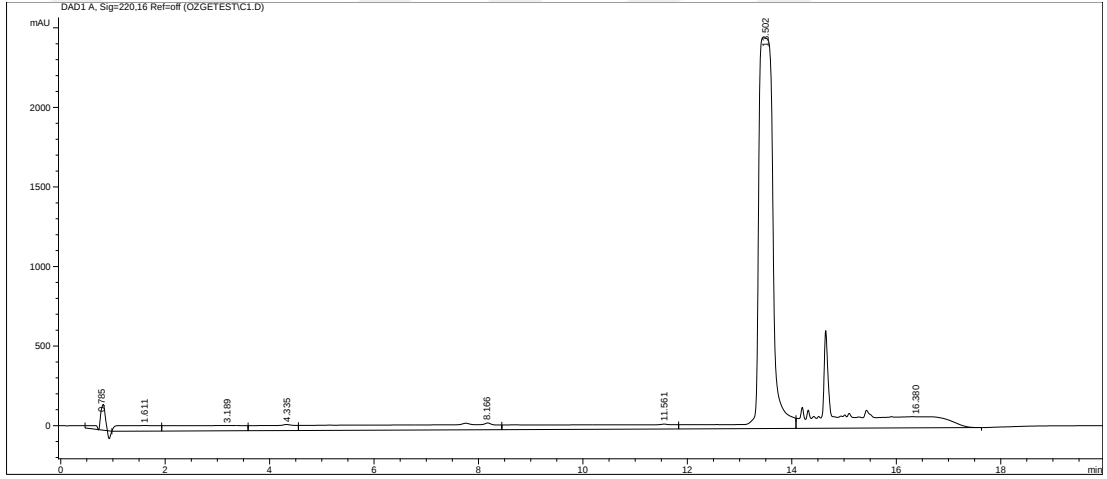
Şekil 3.34. Sistein ve Sodyum dodesil sülfat (SDS) (TC-4).



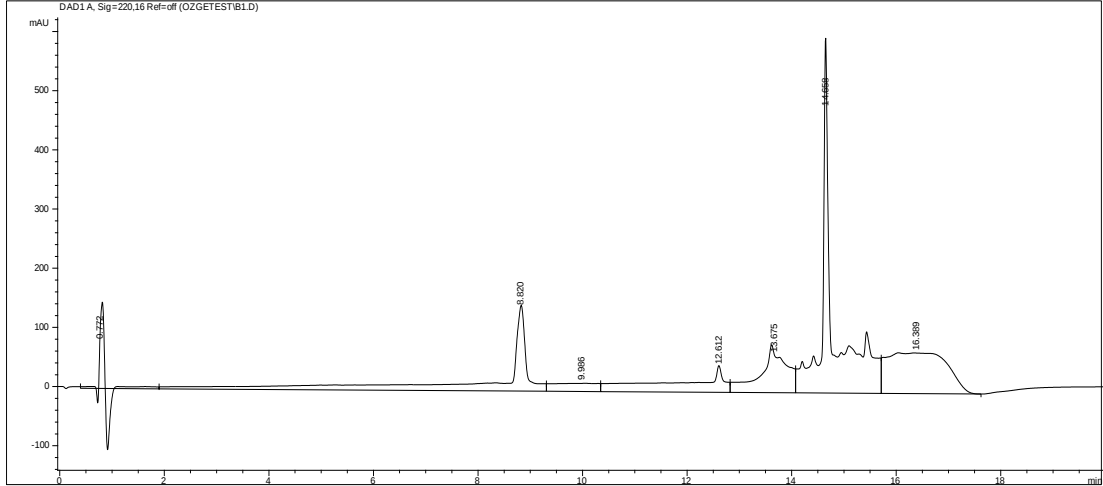
Şekil 3.35. Sistein ve Sodyum dodesil sülfat (SDS) koelüsyon grafiği (TC-4 Co-el).



Şekil 3.36. Sistein pozitif control.



Şekil 3.37. Sistein pozitif kontrol koelüsyon grafiği.



Şekil 3.38. Sistein referans kontrol-A.

Yukarıda belirtilen kalibrasyon eğrileri, yedi farklı sistein ve lizin konsantrasyonuna göre çizildi. Standart eğrinin r^2 değeri sistein ve lizin için sırasıyla 0,9972 ve 0,9977 olarak bulundu. Peptit tükenmesi yüzdesi, kimyasalların pik alanları kullanılarak hesaplandı. Pozitif kontrol, geraniol, PPD, izoöjenol ve SDS'nin lizin tükenme yüzdesi sırasıyla 90,58, 6,08, 96,2, 6,59, 99,15 olarak hesaplandı. Öte yandan, pozitif kontrol, geraniol, PPD, izoöjenol ve SDS'nin sistein tükenme yüzdesi 91,16, 32,71, 99,11, 93,63, 14,16 olarak hesaplanmış, kimyasallar ortalama tükenmeye göre sırasıyla yüksek, düşük, yüksek, yüksek ve yüksek reaktivite olarak bulunmuştur. Yukarıda belirtilen değerler aşağıdaki tabloda sunulmaktadır.

Çizelge 3.5. Sistein ve Lizin tükenme oranları.

	% Sistein Tükenmesi	% Lizin Tükenmesi	% Peptit Tükenmesi
Pozitif Kontrol (sinnamik aldehit)	91,16	90,58	yüksek
PPD (parafenilendiamin)	99,11	96,2	yüksek
Geraniol	32,71	6,08	düşük
İzoöjenol	93,63	6,59	yüksek
SDS (sodyum dodesil sülfat)	14,16	99,15	yüksek

4. TARTIŞMA

Alerjik kontakt dermatit, önemli bir mesleki ve çevresel sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hassasiyet potansiyelinin ölçümü, kişisel bakım ürünlerinde ve kozmetik ürünler içerisinde kullanılan bileşenlerin geliştirilmesi, risk değerlendirmesi için temel bir adımdır. Test sonucu, bir kimyasal maddenin alerjik kontakt dermatite neden olma potansiyelini göstermektedir (Almeida ve ark., 2017). Alternatif yöntemler; toksikolojik bir son noktayı belirlerken, test başına hayvan sayısını, acısını ve sıkıntısını azaltan yöntemlerin kullanımı veya yer değiştirme ile sonuçlanan yeni teknikleri içerir. Konu, amaç ve teknik açıdan uygunsa in vivo yöntemlere tercih edilebilir veya entegre biçimde kullanılabilir. Alternatif yöntemlerin entegrasyonu ile in vivo yöntemlere olan gereksinim azalır. Test edilecek kimyasal madde sayısının her geçen gün arttığı düşünülürse, alternatif yöntemlerin kullanılması duyarlılık ölçümünün optimizasyonuna katkı sağlar (Esen ve Cemiloglu-Ulker, 2021).

Potansiyel deri hassasiyeti oluşturan maddeler olarak endişe duyulan yirmi dört saf koku bileşeni daha önce bozunma çalışmalarına tabi tutulmuş ve dansyl sisteamin (HTS-DCYA) yöntemiyle yüksek verim kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneysel sonuçlar, 24 koku bileşeninin üçte ikisinin kimyasal bozunmaya uğradığını göstermiştir. Bazı durumlarda, bu tür bozunmaya tiyo-reaktivitede bir artış eşlik etmiştir. Bu sonuçlar, doğrudan peptit reaktivite tahlili (DPRA) kullanılarak aynı bileşenlerin reaktivitesinin araştırılmasına neden olmuştur. Mevcut çalışmada, 24 kimyasal 150 gün boyunca zorunlu bozunmaya tabi tutulmuş ve hem DPRA hem de HTS-DCYA yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda, sırasıyla DPRA ve DCYA testinde dört ve sekiz bileşik reaktif olarak saptanmamıştır. Kumarin, benzil salisilat, benzil sinamat ve heksil sinamal her iki deneyde de reaktif bulunmazken, sinamal, sinamil alkol, hidroksisitronelal ve lilial DCYA'da negatif, DPRA yönteminde ise pozitif bulunmuştur. Bu dört bileşiğin reaktivitesindeki uyumsuzluk, bozunma üzerine oluşan pro-oksitanların olası bir rolüne atfedilmiş olup, bu da test kimyasalı ile belirgin kovalent eklentiler oluşturmada peptidin

tükenmesine neden olmuştur. Bu hipotezi doğrulamak için, model pro-oksidan olarak hidrojen peroksitin DPRA yönteminde hem lizin hem de sistein-heptapeptit tükenmesi üzerindeki etkisi böylece araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, lizin tükenmesi üzerinde oksidatif koşulların çok az etkisi olduğunu gösterirken, sistein tükenmesi, 1,1 mg/L hidrojen peroksitin üzerindeki konsantrasyonlardan önemli ölçüde etkilenmiştir. Genel olarak, alternatif yöntemlerle bilinmeyen kimyasalların deri hassasiyet potansiyelleri değerlendirilirken, her iki kimyasal yöntemde de doğrulanmış kimyasal kararsızlık göz önünde bulundurulmalıdır (Avonto ve ark., 2018).

Sürekli kullanılan deodorantlar veya biyositler gibi ticari ürünlerde didesildimetilamonyum klorür (DDAC) genellikle bir antimikrobiyal madde olarak hizmet eder, sitral bir koku maddesi olarak işlev görür ve eksipiyen etilen glikol (EG) aktif bileşenleri çözmek için kullanılır. Bu maddelerin her birinin deri hassasiyet potansiyelleri hala tartışılmaktadır. Ayrıca, DDAC veya sitralin EG ile karışımları deri hassasiyet potansi için değerlendirilmemiştir. İnsan Hücre Hattı Aktivasyon Testi (h-CLAT) ve Doğrudan Peptit Reaktivite Testi (DPRA) olarak adlandırılan in vitro alternatif test, bu sorunları çözmeye hizmet etmiştir. Üç bağımsız h-CLAT çalışmasında, DDAC ve sitralin hassaslaştırıcı olduğu, EG'nin ise hassaslaştırıcı olmadığı tahmin edilmiştir. 7:3 ve 1:4 a/h oranlarında DDAC veya sitral ile EG karışımlarının tümü, h-CLAT tarafından SS potansiyeli açısından pozitif bulunurken, EG oranı arttıkça SS potensinin azaldığı kaydedilmiştir. Sitral ve EG karışımlarının tümü pozitif iken, DDAC ve EG karışımlarının tümü DPRA tarafından negatif bulunmuştur. Bu da DPRA yönteminin pro-hapten özellikli kimyasallar için uygun olmadığını göstermektedir. İnsanlar, aktif içerikli eksipiyen karışımlarına mesleki veya çevresel olarak maruz kalabildiklerinden, bu çalışma, çeşitli kimyasal karışımların deri hassasiyet potansiyellerinin daha ileri araştırmaları hakkında fikir verebilir (Lee ve ark., 2019).

Uçucu ve/veya yarı uçucu organik bileşikler olarak sınıflandırılan 82 bileşiğin, doğrudan peptit reaktivite yöntemi (DPRA) kullanarak, bu kimyasal bileşiklerin sık sık ve yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında hassasiyet potansiyellerini tespit

etmek için çalışma yapılmıştır. Bu bileşiklerden 81'i çalışmada değerlendirilmiştir. Değerlendirilen bileşiklerden 25'i pozitif olarak sınıflandırılmıştır. Klinik kontakt dermatite neden olan monoetanolin ve 1,3-bütandiol ve hayvan çalışmalarında zayıf hassasiyet potansiyeline sahip olduğu bildirilen birkaç bileşik negatif olarak sınıflandırılmıştır. Bu nedenle, zayıf hassasiyet potansiyeline sahip bileşiklerin DPRA'da negatif olarak değerlendirildiği düşünülmüştür. Formaldehit salan koruyucu bronopolün hassasiyet potansiyeli, bozunma ürünleri (bromonitrometan ve 2-bromoetanolin) pozitif olarak sınıflandırılmıştır. Bu da bu bozunmaların olduğunu gösterir. Ürünler ayrıca hassasiyet potansiyelini de gösterir. Kawakami ve ark. (2020), yaptıkları bu çalışmada pozitif olarak test edilen bileşiklerin, çoklu toksisite ve epidemiyolojik çalışmalar yoluyla kapsamlı bir şekilde değerlendirmişlerdir.

Duyarlılaştırma potansiyelinin daha güvenilir değerlendirilmesini sağlamak için 2 veya daha fazla yaklaşımdan en iyi sonuçların, nasıl entegre edilebileceği değerlendirilir. Alternatif yöntemlerden elde edilen bilgiler, bağımsız bir yöntem olarak değil, kanıt ağırlığı yaklaşımı içindeki diğer bilgilerle birlikte kullanılmalıdır. Böylece duyarlılaştırıcı olan ve olmayan maddeler arasında ayırım yapılabilir. Şu anda, test yöntemleri tek başına duyarlılaştırıcı maddelerin sınıflandırılması için uygun değildir (Kimber, 2019).

DPRA yöntemi; metal bileşikler, bilinmeyen veya değişken kompozisyondaki maddeler ve karışımlar, kompleks reaksiyon ürünleri ve biyolojik materyaller için kullanılamaz (Barentsen ve ark., 2019). Prohaptenler bu analizde tespit edilemez. Prehaptenler ise yanlış negatif sonuçlar verebilir. Sistein veya lizin dışındaki aminoasitlere karşı tercihli reaktifliğe sahip kimyasalları test etmek, yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Bir peptide kovalent olarak bağlanmayan, ancak oksidasyonunu (sistein dimerizasyonu) teşvik eden kimyasallar potansiyel yanlış pozitif tahminlere yol açabilir. Ayrıca DPRA yönteminde; düşük çözünür konsantrasyonlarda test edilen kimyasalı duyarlılaştırıcı olarak tanımlamak için pozitif sonuçlar kullanılabilir. Ancak negatif tahmin durumunda kesin bir sonuç çıkarılmamalıdır.

Hayvan deneylerine alternatif yöntemler, dünya çapında artan bir değere sahiptir. Alternatif yöntemlerin entegrasyonu ile in vivo yöntemlere olan gereksinim azalır. Böylece birçok test için canlı hayvan kullanımına gerek kalmaz. Ancak Avrupa Birliği Tüketici Güvenliği Bilim Komitesi, kozmetik bileşenlerin ve ürünlerin güvenlik değerlendirmesine ilişkin risk değerlendirme kılavuzunda deri duyarlılığı için kullanılan in vivo hayvan testlerinin tamamen değiştirilmesinin 10 yıl kadar süreceğini öngörmektedir.

Kabul edilen alternatif yöntemler, test maddelerinin duyarlılaştırıcı potansiyelini belirlemede hayvan modellerine kıyasla yeterli değildir. Bu nedenle ECVAM'a göre kullanılan düzenleyici hayvan testlerinin yerine birden çok hayvan dışı test yöntemi uygulanmalıdır, tamamen yer değiştirme için AOP (Advers Outcome Pathway)'nin temel mekanizmalarını ele alan yöntemlerin kombinasyonuna ihtiyaç duyulur (OECD, 2020).

Özetle, in vitro yöntemlerin uygulanabilirlik alanlarının genişletilmesi ve gelişiminin tamamlanması için düzenleyici kurumlar, akademi ve sanayi arasındaki işbirliğinin devam etmesi ve yeni veri tabanlarının oluşturulması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *in chemico* bir test yöntemi olan DPRA incelenmiştir. Lizin ve sistein içeren bir peptidin indirgenmesine dayanan DPRA, düşük molekül ağırlıklı maddelerin (haptelerin) cilt proteinlerine kovalent bağlanmasıyla temsil edilen, deri duyarlılığının başlangıcı (kilit olay 1) kabul edilen haptenasyon sürecini inceler. Test maddeleri reaktivitelerine göre minimal, düşük, orta veya yüksek olarak sınıflandırılır. Minimal reaktifite sınıfındaki kimyasalların DPRA tahmini negatiftir. Düşük, orta veya yüksek reaktivite sınıfındaki kimyasalların ise DPRA tahmini pozitifdir. Ortalama %6,38 sistein ve lizin peptit tükenme değeri, negatif ve pozitif tahminler arasında ayırım için eşik olarak kullanılır. Eğer test kimyasalı lizin peptidi ile aynı alıkonma süresine sahipse, tahmin sistein tükenme değerlerine göre yapılır. Ortalama %13,89 sistein tükenme değeri, negatif ve pozitif tahminler arasında ayırım için eşik olarak kullanılır.

Kozmetik bileşenlerin duyarlılık sınıflandırmasına yönelik DPRA çalışmamızın sonuçları, tahriş edici kimyasal SDS (5-7) dışında önceki *in vivo* ve *ex vivo* çalışmaların sonuçlarıyla uyumluydu. Lizin tükenme yüzdesi yanlış pozitif sonuç verdi. Sistein tükenmesi daha güvenilir sonuçlar verdi. Sonuçlarımıza göre, lizin kombinasyonunun kılavuzlara göre önerildiği bu yöntemde sistein tükenmesi sonuçlarının kullanılabileceği önerilebilir. DPRA'yı çalışma kapsamımıza göre gerçekleştirdik ve kimyasalların duyarlılık potansiyelini araştırmak için doğrulanmış bir yöntem oluşturduk. Yöntemin özellikle irritasyon ve alerji ayırımını yapabilme yeteneğinin tespiti için SDS'nin (sodyum dodesil sülfat) de test kimyasalı olarak araştırılması yöntem kurma çalışmasında önemli bir katkı sağlamıştır.

Sonuç olarak bu test yöntemi; test edilen kimyasal maddelerin alerji potansiyellerinin belirlenmesine ve sonuçlar arasında karşılaştırma yapmamıza imkan sağlamaktadır. Elde edilen sayısal veriler, kimyasal maddeleri alerjen veya irritant madde olarak sınıflandırmamıza, potansiyel riskleri yorumlamamıza yardımcı olacaktır.

ÖZET

Deri Duyarlandırması Testi Olan Direkt Peptit Reaktivite Yöntemi (Direct Peptide Reactivity Assay-DPRA) İle Bazı Kimyasal Maddelerin Duyarlandırma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Kozmetik, farklı kimyasal bileşiklerin bir kombinasyonudur ve 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. Deri hassasiyet testi için ECVAM tarafından üç farklı in-vitro ve bir kimyasal yöntem geliştirilmiştir ve onaylanmıştır. Doğrudan Peptit Reaktivite Deneyi (DPRA) bir in chemico yöntemidir. Testin amacı, kimyasalların deri hassasiyet potansiyelinin değerlendirilmesine katkıda bulunmaktır. Düşük moleküler ağırlıklı maddelerin (haptenler) 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 duyarlılık potansiyeli bilinen kimyasalları uygulayarak DPRA'yı kılavuza göre kurmayı amaçladık.

Anahtar Sözcükler: ECVAM, DPRA, Hassasiyet, Hapten, in-Chemico

SUMMARY

Evaluation of Sensitization Potential of Some Chemical Substances by Direct Peptide Reactivity Method (Direct Peptide Reactivity Assay-DPRA)

Cosmetics are a combination of different chemical compounds and generally used for cleaning and improving skin conditions or odor of the human body, enhancing beauty. A testing ban of using animal tests on finished cosmetic products has been in force in the EU since 2004, while in 2013 a marketing ban came into force for all kinds of animal toxicity tests including skin sensitization test (1). Three different *in vitro* and one *in chemico* methods have been developed and validated by ECVAM for skin sensitization test. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) is an *in chemico* method. The purpose of the test is to contribute to the assessment of the skin sensitization potential of chemicals. Haptenization that is the covalent binding of low molecular weight substances (haptens) to proteins in the skin is considered an important mechanism in allergy. Therefore, information derived from peptide reactivity experiments such as DPRA provides information on the assessment of the skin sensitization potential of chemicals. In our study we aimed to set up the DPRA according to the guideline by applying the sensitization potency known chemicals.

Keywords: ECVAM, DPRA, Hapten, in-Chemico, Sensitization

KAYNAKLAR

- AEBY P, ASHIKAGA T, BESSOU-THOUYA S, SCHEPKY A, GERBERICK F, KERN P, MARREC-FAIRLEY M, MAXWELL G, OVIGNE J M, SAKAGUCHI H (2010). Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicology In Vitro*, **24**: 1465–1473.
- AHLFORS S R, STERNER O, HANSSON C (2003). Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **16**, 59-68.
- AKYOL A, BOVYAT A, PEKSARD Y, GURGEY E (2005). Contact sensitivity to standard series allergens in 1038 patients with contact dermatitis in Turkey. *Contact Derm.*, **52**: 333-337.
- ALMEIDA A, SARMENTO B, RODRIGUES F (2017). Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int Journal Pharm*, **519**(1-2): 178-85.
- AVONTO C, WANG Y, CHITTIBOYINA A G, VUKMANOVIC S, KHAN I A (2018). In chemico assessment of potential sensitizers: Stability and direct peptide reactivity of 24 fragrance ingredients. *Journal Appl Toxicol*, **39**(2): 398-408.
- BARENTSEN HM, 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? *Regul Toxicol Pharmacol*, **106**: 292-302.
- BASKETTER DA, GERBERICK F, KIMBER I (2007). The local lymph node assay and the assessment of relative potency: status of validation. *Contact Derm*, **57**: 70-75.
- BOVYAT A, AKYOL A, GURGEY E (2005). Contact sensitivity to preservatives in Turkey. *Contact Derm.*, **52**: 329-332.
- 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.
- DUPUIS G, BENEZRA C (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. *New York & Basel: Marcel Dekker Inc.*
- ESEN B, CEMIOGLU-ULKER O (2021). 3R kuramına göre güncel deri duyarlılığı testleri. *Journal Lit Pharm Sci*, **10**(1): 76-88.
- EURL ECVAM (2013). EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing. JRC Scientific and Policy reports. Link to document (last access 20.01.2014) European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing.

European Chemicals Agency (ECHA). (2018). How to use new or revised in vitro test methods to address skin sensitisation., 1-11.

GERBERICK G F, VASSALLO J D, BAILEY R E, CHANEY J G, MORRALL S W, LEPOITTEVIN J P (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences*, **81**: 332–343.

GERBERICK G F, VASSALLO J D, FOERTSCH L M, PRICE B B, CHANEY J G, LEPOITTEVIN J P (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicological Sciences*, **97**: 417-427.

Institute for Health and Consumer Protection EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM). EURL ECVAM RECOMMENDATION on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing (2013).

Institute for Health and Consumer Protection EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (ECVAM). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) ECVAM Validation Study Report (2012).

JOWSEY I R, BASKETTER D A, MCFADDEN J P, KULLAVANIJAYA P, DUANGDEEDEN I (2006). Elicitation response characteristics to permanent hair dye in paraphenylenediamine-allergic volunteers. *Contact Derm.*, **55**: 330-334.

KAWAKAMI T, ISAMA K, IKARASHI Y, JINNO H (2020). Evaluation of the sensitization potential of volatile and semi-volatile organic compounds using the direct peptide reactivity assay. *Journal Toxicol Sci.*, **45**(11): 725-735.

KIMBER I, BASKETTER D A, GERBERICK G F, DEARMAN R J (2002). Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.*, **2**: 201-211.

KIMBER I (2019). The activity of methacrylate esters in skin sensitisation test methods: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **104**:14-20.

LEE J, CHO A, GAUTAM R, KIM Y, SHIN S, SONG E, KIM H, YANG S, ACHARYA M, JO J, MAHARJAN A, SHIM I, KIM H, KIM P, KIM T, LEE J, KANG M, JEONG T, KIM C, KIM H, HEO Y (2019). Prediction of the skin sensitization potential of didecyldimethylammonium 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. *Toxicol Ind Health*, **35**(8): 507-519.

LEPOITTEVIN J P, BASKETTER D A, GOOSSENS A, KARLBERG A T (1998) Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

MAXWELL G, AEBY P, ASHIKAGA T, BESSOU-TOUYA S, DIEMBECK W, GERBERICK F, KERN P, MARREC-FAIRLEY M, OVIGNE J M, SAKAGUCHI H (2011). Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *Alternatives to Animal Experimentation*, **28**: 50-55.

National Institute of Environmental Health Sciences

OECD (2012). *OECD Series on Testing and Assessment No. 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*. OECD Environmental Health and Safety Publications.

OECD (2015a). *OECD Test Guideline No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects.

OECD (2015b). *OECD Guideline For Testing Of Chemicals. In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*. No. 442C.

OECD (2020). *OECD Test Guideline No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation. Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects.

SAINT-MEZARD P, ROSIERES A, KRASTEVA M, BERARD F, DUBOIS B, KAISERLIAN D, NICOLAS J F (2004). Allergic contact dermatitis, *Eur. J. Dermatol.*, **14**: 284-295.

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Kozmetik ürünler üzerinde Yapılan Hayvan Deneilerine Alternatif Test Metotlarına İlişkin Kılavuz Sürüm 1.0. Erişim Tarihi: 1.05.2020.

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.

United Nations (2013). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS); New York and Geneva. Fifth revised edition. Link to document.

UTER W, SCHNUCH A, GEIER J, FROSCH P J (1998). Epidemiology of contact dermatitis. The information network of departments of dermatology (IVDK) in Germany. *Eur. Journal Dermatol*, **8**: 36-40.