

3R Kuramına Göre Güncel Deri Duyarlılığı Testleri Current Skin Sensitisation Tests According to 3R Approach

^{ID} Büşra ESEN^a, ^{ID} Özge CEMİLOĞLU ÜLKER^a

^aAnkara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET Deri duyarlılığı, çeşitli hücreler ve moleküller arasında yüksek koordineli etkileşim gerektiren son derece karmaşık ve sıkı düzenlenmiş biyolojik bir süreçtir. Alerjik kontakt dermatit ile sonuçlanan deri duyarlılığı, önemli bir mesleki ve çevresel sağlık sorunudur. Duyarlılaştırma potansiyelinin ölçümü, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan bileşenlerin geliştirilmesi ve risk değerlendirmesi için temel bir adımdır ve test sonucu, bir kimyasalın alerjik kontakt dermatite neden olma potansiyelini gösterir. Son yıllarda, ürün güvenliğini sağlamak için laboratuvar hayvanlarının kullanılmadığı alternatif yöntemlere öncelik verilir. Bu yolda, 3R kuramı ile bilimsel çalışmanın kalitesinden ödün vermeden rasyonel bir strateji izlenir. 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. Avrupa Birliği ve Güney Kore, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri için sadece alternatif hayvan dışı testleri kabul eder. Yasal sınırlamaların ve dünya çapında artan değere sahip olmalarının bir sonucu olarak alternatif yöntemler için çeşitli ülkelerde validasyon merkezleri kurulmuştur. Bu derlemede, deri duyarlılığı testlerinde gelinen son nokta ve entegre yaklaşımlar hakkında bilgi verilmiştir.

ABSTRACT Skin sensitisation is an extremely complex and tightly regulated biological process that requires highly coordinated interaction between various cells and molecules. Skin sensitisation resulting in allergic contact dermatitis is an important occupational and environmental health problem. Measurement of sensitisation potential is a basic step in the development and risk assessment of ingredients used in cosmetics and personal care products, and the test result shows the potential of chemical to cause allergic contact dermatitis. In recent years, alternative methods, that do not use laboratory animals to ensure product safety, have been prioritized. In this way, with the 3R theory a rational strategy without compromising the quality of scientific work is followed. While alternative methods determine a toxicological endpoint, they include new techniques that result in the use of methods that reduce the number of animals, pain and distress per test, or replacement. If subject, purpose and technically appropriate, it can be preferred to in vivo methods or used in an integrated manner. With the integration of alternative methods, the need for in vivo methods is reduced. Considering that the number of chemicals to be tested increases day by day, the use of alternative methods contributes to the optimization of sensitisation measurement. The European Union and South Korea accept only alternative non-animal tests for cosmetics and personal care products. Validation centers have been established in various countries for alternative methods as a result of legal restrictions and increasing value worldwide. In this review, information is given about the endpoint and integrated approaches in skin sensitisation tests.

Anahtar Kelimeler: Hayvan testi alternatifleri; deri duyarlılığı; 3R; in vitro testler; in silico yöntemler

Keywords: Animal testing alternatives; skin sensitisation; 3Rs; in vitro tests; in silico methods

Deri duyarlılaştırıcı, Küresel Uyumlaştırılmış Sistem tarafından cilt ile temas sonrası alerjik cevabı indükleyecek bir madde veya karışım olarak tanımlanır.¹ Sekonder maruziyet cilt üzerinde advers etkilere yol açar ve bu durum alerjik kontakt dermatit [allergic contact dermatitis (ACD)] olarak adlandırılır.² ACD ile sonuçlanan deri duyarlılığı, önemli bir mesleki ve

çevresel sağlık sorunudur ve binden fazla kimyasalın duyarlılığa neden olma potansiyeli vardır.³ Duyarlılaştırma potansiyelinin ölçümü, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan bileşenlerin geliştirilmesi ve risk değerlendirmesi için temel bir adımdır.^{4,5}

Deri duyarlılığı, indüksiyon ve elikasyon (ortaya çıkma) fazına ayrılır.

Correspondence: Özge CEMİLOĞLU ÜLKER

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: oulker@pharmacy.ankara.edu.tr



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 09 Jun 2020

Received in revised form: 07 Sep 2020

Accepted: 12 Oct 2020

Available online: 03 Feb 2021

2630-5569 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

İndüksiyon fazında, birey alerjene özgü bellek T hücrelerinin oluşumuna yol açan maddeye karşı duyarlı hâle gelir. Bu spesifik bellek hücreleri, spesifik alerjenle tekrarlanabilecek karşılaşmalar için dermise ve epidermise göç eder.

Elikasyon fazında bellek T hücreleri, alerjene özgü T hücrelerinin (Th1, Th2, Th17 ve T regülötör hücreler) hızlı bir şekilde çoğalmasına ve aktive edilmesine yol açan spesifik alerjenle yeniden karşılaşır. Aktive olan hücreler, diğer inflamatuvar hücreleri harekete geçiren spesifik sitokinleri salgılamaya başlar. Süreç, ACD ile sonuçlanır.² Kimyasalların neden olduğu bu durum, gecikmiş Tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak tanımlanır.⁶

Önemli noktalardan bir diğeri, bazı proteinlerin de duyarlılık oluşturma eğilimidir. Alerjenik proteinler hem immünglobulin (Ig) G hem de IgE antikor üretimini indükler ve böylece ani Tip I aşırı duyarlılık gelişir.⁷

Mevcut Avrupa mevzuatına göre bir kozmetik formülasyonun her bir bileşeninin güvenlik değerlendirmesi, kozmetik ürünün güvenlik değerlendirmesinde temel teşkil eder. 1223/2009 sayılı Avrupa Kozmetik Yönetmeliği'ne göre bir kozmetik ürün normal veya öngörülebilir kullanım koşullarında insan sağlığı için güvenli olmalıdır. Güvenlik, yeterliliği kanıtlanmış bağımsız bir güvenlik değerlendiricisi tarafından garanti edilmelidir.⁴ Avrupa Kozmetik ve Kişisel Bakım Endüstrisi Ticaret Birliği de (Cosmetics Europe) kozmetik endüstrisi güvenlik değerlendirmelerinde kullanılmak üzere, düzenleyici kabul görmüş hayvan dışı test stratejileri geliştirilmesi amacıyla çok aşamalı programlar yürütür.^{5,8}

BİLİMSEL ARAŞTIRMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER

IN VIVO: Araştırmada yaşayan bir organizma kullanılan yöntemdir.⁹

IN VITRO: Araştırmada izole edilmiş organların, dokuların, hücrelerin veya biyokimyasal sistemlerin kullanıldığı yöntemdir. Benzer hücrelerden oluşan monokültür sistemler veya farklı hücre tiplerini birleştiren ko-kültür sistem kullanımını yaygındır.⁹

IN CHEMICO: Test edilen maddenin kimyasal reaktivitesi veya diğer fizikokimyasal özelliklerinin ölçüldüğü abiyotik analizdir.⁹

IN SILICO: Mevcut bilgilerin kullanıldığı kalitatif ve kantitatif yapı aktivite ilişkileri [quantitative structure activity relationship (QSAR)], uzman sistemler ve fizyolojik temelli toksikokinetik modellemeye dayanan hesaplama yöntemidir.⁹

IN VIRTUO: *In silico* yöntem sonuçlarının bilgisayar teknolojileri aracılığıyla görsel ve fonksiyonel olarak kullanıldığı yöntemdir.¹⁰

ALTERNATİF YÖNTEMLERİN DOĞUŞU

Sağlık ve biyoloji alanında doğruya en yakın sonuca ulaşabilmek için *in vivo* yöntemlerin avantajlı olduğu kanısı yaygındır. *In vivo* yöntemler sağladığı faydaların yanı sıra günümüzde araştırma sonucuna olan etkileri, bilimsel uygunluk ve etik değerler çerçevesinde sorgulanır. Tür farklılıklarına bağlı olarak doz tespitiindeki belirsizlikler özellikle toksikoloji alanındaki çalışmalarda dikkati çeker ve insan-hayvan model uyumu konusunda soru işaretlerine neden olur.¹⁰

1959 yılında Russel ve Burch tarafından sunulan 3R kuramı, bilimsel amaçlı deneylerde hayvanların daha etik kullanımına ilişkin rehber niteliği taşır.¹¹

Replacement (yerine koyma), yöntemlerde hayvan yerine filogenetik olarak daha düşük türlerin ya da hayvan dışı sistemlerin kullanımınıdır.

Reduction (azaltma), geçerli sonuçlar almak için gerekli bilimsel uygulamalardan uzaklaşmadan, bir yöntemde istenen hayvan sayısının azaltılmasıdır.

Refinement (hayvan refahı), hayvanlarda daha az acı ve baskıya neden olabilecek işlemlerin yapılmasıdır.

Ayrıca “sorumluluk” (responsibility) olan 4. R, günümüzde hayvanların etik kullanımı için yol gösterici ilkelerin temel bir parçası olarak kabul edilir. Bu 4. R bazen literatürde “rehabilitasyon” (rehabilitation) olarak da isimlendirilir.¹²

Alternatif yöntemler konu, amaç ve teknik açıdan uygunsuzsa *in vivo* yöntemlere tercih edilebilir veya entegre biçimde kullanılabilir.¹⁰

Avrupa Birliği'nde hayvan testleri, 2004 ve 2009 yılından beri sırasıyla kozmetik ürünler ve içerikler

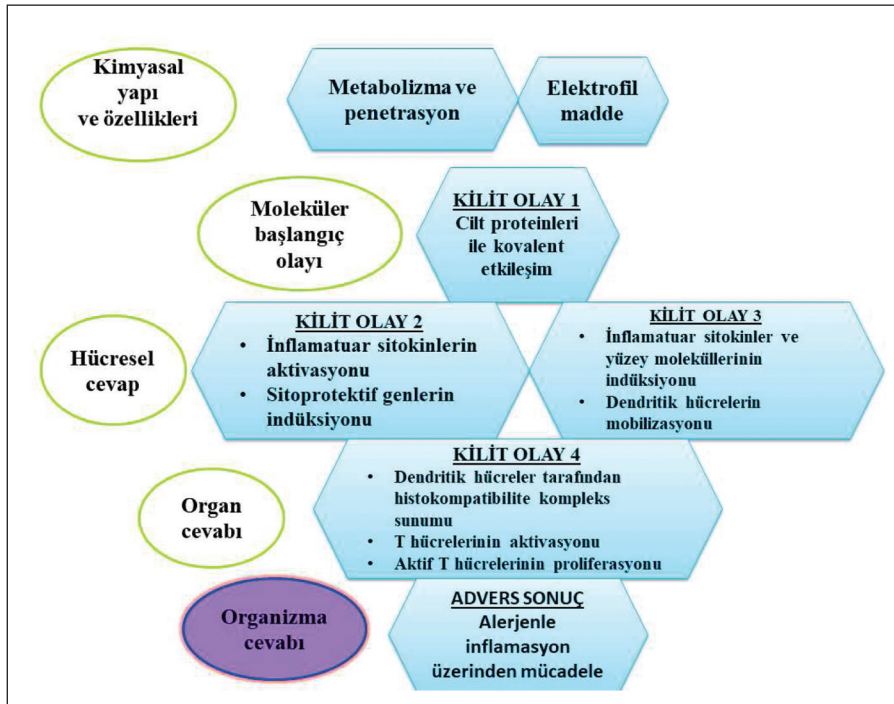
için yasaklanmıştır. Ek olarak, 2009 yılında Avrupa pazarında hayvanlar üzerinde test edilmiş bileşenler içeren kozmetik ürünlerin ticarileştirilmesi de yasaklanmış, pazarlama yasağı için Mart 2013 yılına kadar uzatma kararı alınmıştır.⁴ Çin, herhangi bir kimya sektörü için alternatif kabul etmeyen tek ülkedir. Avrupa Birliği ve Güney Kore ise kozmetik ve kişisel bakım ürünleri için sadece alternatif hayvan dışı testleri kabul eder.¹³

Bu sınırların bir sonucu olarak, Avrupa Alternatif Yöntemlerin Validasyon Merkezi [European Center on Validation of Alternative Methods (ECVAM)], kozmetik bileşenlerin güvenliğini ve toksisitesini tahmin etmek için *in vitro* modeller önerir. ECVAM tarafından onaylanan bu modellerin, *in vivo* çalışmalarındaki hayvan sınırlamalarının üstesinden gelmek için kullanışlı ve etkili araçlar olduğu da gösterilmiştir.⁴ Alternatif Yöntemlerin Validasyonu İçin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi, Japonya Alternatif Yöntemler Validasyon Merkezi, Güney Kore Alternatif Yöntemler Validasyon Merkezi ve Brezilya Alternatif Yöntemler Validasyon Merkezi, validasyon için diğer anahtar kuruluşlardır.¹¹

ALTERNATİF DERİ DUYARLILIĞI TESTLERİ

Deri duyarlılığı testi, bir kimyasalın ACD'ye neden olma potansiyelini tanımlar. Kimyasal düzenleyici otoriteler, çalışanları ve tüketicileri potansiyel tehlikelere karşı korumak için maruziyet limitleri belirlerken, deri duyarlılığı test verilerine ihtiyaç duyar.¹³ 2012 yılında Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü [Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)], maddelerin cilt proteinlerine kovalent bağlanmasıyla başlayan deri duyarlılığının biyolojik mekanizmasını açıklayan Advers Sonuç Yolağını [Advers Outcome Pathway (AOP)] yayımlamıştır ve AOP'nin kilit olayları şunlardır:

1. Elektrofilik maddenin cilt proteinlerine kovalent bağlanması,
2. Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve keratinositlerde sitoprotektif yolların indüklenmesi,
3. Dendritik hücrelerin aktivasyonu, olgunlaşması ve bunların lokal lenf düğümlerine göçü,
4. Kimyasal alerjenin, dendritik hücreler tarafından saf T hücrelerine sunulması, alerjen spesifik bellek T hücrelerinde farklılaşma ve proliferasyon (Şekil 1).²



ŞEKİL 1: Advers sonuç yolağı.¹⁴

Dermal biyoyararlanım (penetrasyon ve varsa metabolizma), bir maddenin duyarlılığına neden olması için ön koşuldur. Yani madde, reaktif formda canlı epidermise ulaşmalıdır.² Ayrıca düşük molekül ağırlıklı kimyasalların adaptif bağışıklık sistem tarafından tanınması için cilt proteinlerine kararlı bir şekilde bağlanıp kompleks oluşturması gerekir.³

IN CHEMICO VE IN VITRO YÖNTEMLER

Avrupa’da artan politik ve etik talep üzerine, endüstriyel kimyasalların ve kozmetik bileşenlerin güvenliğini hayvan testleri yapılmadan değerlendirme zorunluluğu ortaya çıkmıştır.⁵ AOP kilit olaylarına dayalı test yöntemleri ve validasyon durumları Tablo 1’de incelenmiştir.¹⁵

Ülkemizde 23/5/2005 tarihli ve 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliği’nin Ek 2. maddesi uyarınca kozmetik ürünler ve ürün bileşenleri için valide edilmiş alternatif bir yöntem varsa hayvan testlerinin yapılması yasaktır. Hayvan deneylerine alternatif olarak kullanılacak test metodlarının OECD ve ECVAM

tarafından onaylanmış, valide edilmiş güncel test metodları olması gerekir. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından yayımlanan kılavuzda alternatif deri duyarlılığı testleri; Doğrudan Peptid Reaktivite Ölçümü [Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)], KeratinoSens™ ve İnsan Hücre Dizisi Aktivasyon Testi [Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)] olarak belirtilir.¹⁸

DOĞRUDAN PEPTİD REAKTİVİTE ÖLÇÜMÜ, EKONOMİK KALKINMA VE İŞBİRLİĞİ ÖRGÜTÜ 442C

Lizin ve sistein içeren bir peptidin indirgenmesine dayanan *in chemico*, bir test yöntemidir. DPRA, düşük molekül ağırlıklı maddelerin (haptelerin) cilt proteinlerine kovalent bağlanmasıyla temsil edilen, deri duyarlılığının başlangıcı (kilit olay 1) kabul edilen haptensasyon sürecini inceler.

Test kimyasalı, 100 mM (milimolar)’lık bir final konsantrasyonda, uygun bir çözücü içinde çözünmelidir. Bu konsantrasyonda çözünmeyen test kimyasalları, düşük çözünür konsantrasyonlarda test

TABLO 1: Deri duyarlılığı için in chemico/in vitro yöntemlerin validasyon ve kabul durumu.¹⁵⁻¹⁷

Son güncelleme	AOP kilit olay	Test yöntemi	Validasyon durumu/ Mevzuata ilişkin kabulü	Test yöntemine/ kılavuza göre sonuç
2019	Kilit olay 1 Peptid/protein bağı	DPRA	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi* ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		ADRA	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
2018	Kilit olay 2 Keratinosit yanıtı	KeratinoSens™	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		LuSens	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		SENS-IS	Validasyon değerlendirmesinde	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
2018	Kilit olay 3 Monositik/ dendritik hücre yanıtı	h-CLAT	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		U-SENSTM	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		IL-8 Luc Analizi	Onaylanmış	Tamamlayıcı bilgi ile "duyarılaştırıcı" veya "duyarılaştırıcı değil"
		GARDTM	Validasyon değerlendirmesinde	"Duyarılaştırıcı (1A-1B)" veya "duyarılaştırıcı değil"
	Kilit olay 4 T hücre yanıtı	-	-	-

AOP: Advers Sonuç Yolağı; DPRA: Doğrudan Peptid Reaktivite Ölçümü; ADRA: Aminoasit Türevli Reaktivite Ölçümü; h-CLAT: İnsan Hücre Dizisi Aktivasyon Testi. Tamamlayıcı bilgi* in silico cilt metabolizması değerlendirme yaklaşımlarından türetilebilir.¹⁵

edilebilir. Pozitif kontrol sinnamik aldehit ve negatif kontrol olarak peptid çözeltileri kullanılır. Sistein ve lizin peptid çözeltileri, test kimyasalı için sırasıyla 1:10 ve 1:50 oranında oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilir. Reaktivite; gradyan elüsyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi [high performance liquid chromatography (HPLC)] ve 220 nm’de UV saptamasıyla ile sentetik hepta peptidlerin yüzde tükenme değeri üzerinden hesaplanır. Test maddeleri reaktivitelerine göre minimal, düşük, orta veya yüksek olarak sınıflandırılır. Minimal reaktive sınıfındaki kimyasalların DPRA tahmini negatiftir. Düşük, orta veya yüksek reaktivite sınıfındaki kimyasalların ise DPRA tahmini pozitifdir. Ortalama %6,38 sistein ve lizin peptid 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.¹⁹

AMİNOASİT TÜREVLİ REAKTİVİTE ÖLÇÜMÜ, EKONOMİK KALKINMA VE İŞBİRLİĞİ ÖRGÜTÜ 442C

Aminoasit Türevli Reaktivite Ölçümü, test kimyasalı ile 25±1°C 24±1 saatlik inkübasyondan sonra N-[2-(1-naftil)asetil]-L-sistein] (NAC) ve α-N-[2-(1-naftil)asetil]-L-lizin] (NAL) rezidüel konsantrasyonlarının ölçüldüğü *in chemico* bir test yöntemidir. Reaktivite; gradyan elüsyonlu HPLC ve 281 nm’de UV saptaması ile NAC ve NAL ortalama yüzde tükenme değeri üzerinden hesaplanır. Kullanılan sistein ve lizin türevi yapısında naftalin halkasının varlığı UV saptamayı kolaylaştırır. Negatif tükenme 0 olarak kabul edilir. Ortalama %4,9 NAC ve NAL tükenme değeri negatif ve pozitif tahminler arasında ayırım için eşik olarak kullanılır. Eğer test kimyasalı NAL ile birlikte elüsyona uğrarsa, tahmin NAC tükenme değerine göre yapılır. Ortalama %5,6 NAC tükenme değeri, negatif ve pozitif tahminler arasında ayırım için eşik kabul edilir.¹⁶

Protein reaktivitesinin, deri duyarlılığı indüksiyonunda temel bir adım olduğu düşünülürse, reaktivite, kimyasalların duyarlılık potansiyelini taramak için önemlidir.⁴

ANTİOKSİDAN/ELEKTROFİL CEVAP ELEMANI-NRF2 LUSİFERAZ TEST YÖNTEMİ (KERATİNOSENSTM), OECD 442D

Deri duyarlılaştırıcı küçük elektrofilik maddeler, Kelch benzeri ECH-ilişkili protein 1 (Keap1) sensör proteini üzerinde sistein kalıntısına kovalent modifikasyon yapar ve ardından transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) ayrılır. Ayrılan Nrf2 faz II detoksifiye enzimleri kodlayan genler gibi antioksidan/elektrofil cevap elemanına [antioxidant/electrophile response element (ARE)] bağımlı genleri aktive eder. Bu basamaklar göz önüne alındığında KeratinoSens™ deneyi deri duyarlılığına bağlı sitoprotektif gen yollarının keratinosit aktivasyonunu yani, AOP’nin 2. kilit olayını ele alan *in vitro* bir test yöntemidir. Maddelerin sitokinleri aktive etme ve sitoprotektif genleri indüklemeye kabiliyeti değerlendirilir. İnsan geni AKR1C2’nin indüklenen gen olduğu gösterilmiştir.

Yöntemde kullanılan insan keratinosit hücre hattı [Human Keratinocyte cell line (HaCaT cell line)] ARE’nin kontrolü altında stabil bir lusiferaz raportör geni barındıran insan keratinositlerinden türetilmiştir. HaCaT, hücre hattı için orijinal stoktan alınan hücreler maksimum 25 geçişe (pasaja) kadar çoğaltılabilir. Test için hücreler %80-90 konfluent (sıkışık) olmalı ve hücrelerin hiçbir zaman tam birleşmeyecek şekilde büyütülmesine özen gösterilmelidir.

Pozitif kontrol sinnamik aldehit ve negatif kontrol olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılır. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler, test kimyasalının 12 farklı konsantrasyonuna 48 saat boyunca maruz bırakılarak değerlendirilir. Ölçülen son nokta, lusiferaz gen indüksiyonu ve sitotoksitesidir. ARE’ye bağlı yolların gen ekspresyonunu ölçmek için luminesans analizi yapılır. İki tekrardan 2’sinde veya 3 tekrardan 2’sinde lusiferaz ekspresyonu gözlemlendiğinde, tahmin pozitif kabul edilir. Lusiferaz aktivitesi 1,5 kat daha yüksekse ve 3 bağımsız tekrarın en az 2’sinde >%70 hücre canlılığı olan bir konsantrasyonda, solvent kontrolüne kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ise test kimyasalı pozitif olarak derecelendirilir. KeratinoSens™ metodu ile aynı prensibe dayanan LuSens test metodu, lusiferaz yardımıyla ARE bağımlı genlerin Nrf2 aracılı aktivasyonunu değerlendirir.²⁰ Hem KeratinoSens™ hem de LuSens

suda veya DMSO'da çözünür olan veya stabil bir dispersiyon oluşturan kimyasalları test etmek için uygulanabilir. Gereken yüksek konsantrasyon 2000 μM 'dir. Bununla birlikte, test kimyasalının sınırlı çözünürlüğü veya sitotoksik özellikleri nedeniyle, en yüksek 2000 μM konsantrasyon elde edilemediğinde daha düşük konsantrasyonlar kullanılabilir.¹⁵

EKONOMİK KALKINMA VE İŞBİRLİĞİ ÖRGÜTÜ TEST KILAVUZU 442E'DE YER ALAN TEST YÖNTEMLERİ

h-CLAT, U937 Cilt Sensitizasyon Testi (U-SENSTM) ve İnterlökin-8 Raportör Gen Analizi (IL-8 Luc Analizi); test maddesinin ciltteki dendritik hücreleri aktive ve mobilize etme yeteneğini değerlendirir.¹⁴

İNSAN HÜCRE HATTI AKTİVASYON TESTİ

Kimyasalın, insan monositik lösemi hücre hattı THP-1'de yüksek aktivasyon markörleri CD86 ve/veya CD54 ekspresyonunu indüklemeye yeteneğini ele alan kantitatif bir testtir.³

Uygun bir çözücü içinde çözünen veya stabil bir dispersiyon oluşturan test kimyasalları için uygulanabilir. Log Kow değeri 3,5'e kadar olan maddeler test edilebilir. Kontroller; pozitif 2,4 dinitroklorobenzen ve negatif (tuz/DMSO) oluşturulur.

Test yönteminde aşağıdaki prosedür takip edilir:

- 48-72 saat ön kültür (0,1-0,2x10⁶ hücre/mL yoğunlukta),

- 24 kuyucuklu (1x10⁶ hücre/kuyu) plakada 24 saat boyunca 8 farklı konsantrasyondaki test kimyasalı ile muamele,

- Hücre yıkama, 15 dk FcR blokasyonu,

- Hücreleri 3 bölüme ayırıp 30 dk boyunca floresin izotiyosiyanat [Floresin isothiocyanate (FITC)]-konjuge antikorları ile boyama,

- Akış sitometrisi ile CD86 ve CD54'ün rölatif floresans yoğunluğunun [relative fluorescence intensity (RFI)] analizi.

En az 2 bağımsız tekrarda test edilen herhangi bir dozda (hücre canlılığı $\geq\%50$) CD86'nın RFI'sı $\geq\%150$ ise ve/veya CD54'ün RFI'sı $\geq\%200$ ise tahmin pozitif olarak kabul edilir. Üç bağımsız çalışmanın 2'sinde veya 2 bağımsız çalışmanın 2'sinde

markör ekspresyonu olursa tahmin pozitif olarak kabul edilir.²¹

MİYELOİD U937 HÜCRE HATTI AKTİVASYON TESTİ (U-SENSTM)

Spesifik hücre yüzey markörü CD86 ekspresyon değişikliğini ölçen *in vitro* bir test yöntemidir. İnsan histiyositik lenfoma hücre hattı U937 kullanılır. U937 test kimyasalına 45±3 saat maruziyet ve FITC etiketli antikorlarla hücre boyamasını takiben akış sitometrisi ile ölçüm yapılır. Uygun bir çözücü içinde çözünen veya stabil bir dispersiyon oluşturan test kimyasalları için uygulanabilir.²¹

İNTERLÖKİN-8 RAPORTÖR GEN ANALİZİ (IL-8 LUC ANALİZİ)

Dendritik hücrelerin aktivasyonu ile ilişkili sitokin (IL-8) indüksiyonunu ölçen *in vitro* bir test yöntemidir. Uygun bir çözücü içinde çözünen veya stabil bir dispersiyon oluşturan test kimyasalları için uygulanabilir. IL-8 ve gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenazlar promotörlerinin kontrolü altında stabil lusiferaz orange ve stabil lusiferaz red genlerini barındıran, THP-1 türevli IL-8 raportör hücre hattı THP-G8 kullanılır. IL-8 promotörü tarafından düzenlenen lusiferaz ekspresyonu, protokolde 4 bağımsız çalışmadan en az 2 tanesinde belirtilen belirli bir eşğin üstünde olduğunda tahmin pozitif olarak kabul edilir.²¹

Ek olarak, OECD test kılavuzları için değerlendirilen yöntemlerden SEN-IS; 62 genlik biyobelirteç paneline sahip 3 boyutlu yeniden yapılandırılmış epidermis tabanlı bir modeldir. Genomik alerjen GARDTM ise olgun insan dendritik hücre hattında yaklaşık 200 genden oluşan biyobelirteç imzanın rölatif ekspresyonuna ve bilgisayarlı öğrenme tekniklerine dayalı multi-mekanistik bir yöntemdir.¹⁷

IN VIVO YÖNTEMLER

Deri duyarlılığı için yeni testlere ihtiyaç duyulduğunda, her zaman *in chemico/in vitro* test yöntemleriyle başlanır. Ancak bu yöntemler genellikle sınırlıdır ve her madde için kullanılamaz. *In chemico/in vitro* yöntemlerin madde için geçerli olmadığı veya sonuçların sınıflandırma ve risk değerlendirmesi için uygun olmadığı durumlarda, *in vivo* cilt duyarlılık çalışması yapılabilir. Murin Lokal

Lenf Dügümü Testi [local lymph node assay (LLNA)], *in vivo* test için ilk tercih edilen yöntemdir. Sadece istisnai durumlarda başka bir test kullanılır.¹⁵

LOKAL LENF DÜĞÜMÜ TESTİ

Local Lenf Dügümü Testi [Local Lymph Node Assay (LLNA)] uygulama yerinde bulunan lenf düğümlerinde, artan indüklenmiş proliferatif cevabın ölçüldüğü ve bu şekilde maddelerin duyarlılaştırıcı etkisinin sınıflandırıldığı bir test yöntemidir. Sadece indüksiyon fazını özetler.

8-12 haftalık dişi fareler kullanılır. Deney protokolü; her grupta 4 hayvan olmak üzere en az 3 farklı konsantrasyonun uygulandığı test grubu, sadece çözücü uygulanan negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol grubundan oluşur. 3 gün boyunca deney hayvanlarının kulak arkalarına topik uygulama yapılır. 4 ve 5. günde uygulama olmaz. Altıncı gün kuyruk veninden (3H)-metil timidin enjeksiyonu yapılır ve 5 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanır. Kulak arkası lenf düğümleri çıkarılıp lenfosit süspansiyonu edilir ve lenfosit proliferasyonları β ışını sayacı ile ölçülür. Stimülasyon indeksi (SI) değeri elde edilir. Lenf düğümleri proliferasyonunda 3 kat artışa ($SI > 3$) neden olan konsantrasyon hesaplanarak, test kimyasalının ACD oluşturma potansiyeli sınıflandırılır. 3R yönünden katkısı hayvan sayısının azaltılması ve daha az ağrı ve sıkıntıyla hayvan refahının iyileştirilmesi şeklindedir. Duyarlılaştırıcı maddeler; çok güçlü, güçlü, orta derece ve zayıf olarak sınıflandırılır.²²

AZALTILMIŞ LOKAL LENF DÜĞÜMÜ TESTİ

Sadece negatif kontrol grubu ve yüksek doz grubu kullanılır ve bu nedenle Azaltılmış Lokal Lenf Dügümü Testi doz-yanıt bilgisi sağlamaz. İndüksiyon fazını ele alan radyoaktif bir yöntemdir. Kaynak farelerdir. 3R yönünden katkısı %40 kadar hayvan sayısının azaltılması şeklindedir.²²

LOKAL LENF DÜĞÜMÜ TESTİ-BRDU

Radyoaktif olmayan bir yöntemdir. $SI \geq 1,6$ sonucunda kimyasalların pozitif cevap verdiği kabul edilir. 3R yönünden katkısı hayvan sayısının azaltılması ve hayvan refahının iyileştirilmesi şeklindedir.²³

LOKAL LENF DÜĞÜMÜ TESTİ-DA

Uygulama yerinde bulunan lenf düğümlerindeki proliferatif hücre ölçümünün ATP içeriği tespit edilerek yapılan bir yöntemdir. Dişi fareler kullanılır. Test 8 gün sürer; 1, 2, 3 ve 7. günlerde uygulama yapılır. Radyoaktif olmayan bir yöntemdir. $SI \geq 1,8$ sonucunda kimyasalların pozitif cevap verdiği kabul edilir. 3R yönünden katkısı hayvan sayısının azaltılması ve hayvan refahının iyileştirilmesi şeklindedir.²⁴

IN SILICO YÖNTEMLER

In silico modelleme yeni hayvan çalışmalarının yapılmadığı mevcut bilgileri değerlendiren bir sistemdir. Yöntemde kullanılacak verilerin doğruluğu bu modelleme sisteminin başarısında rol oynar.¹⁰ Cilt sensitizasyon tahmininde kullanılan *in silico* araçlar Tablo 2’de verilmiştir.

TABLO 2: Cilt sensitizasyon tahmininde *in silico* araçlar.²

Yazılımın adı	Son nokta ve/veya eğitim seti veri türü
QSAR Toolbox (OECD)	Proteine bağlanma LLNA* ve GMPT** LLNA ve GMPT
ToxTree (IdeaConsult Ltd., Bulgaristan)	Reaktivite etki şekli
VEGA(Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, İtalya)	LLNA
CASE (Ultra MultiCASE Inc, ABD)	GMPT ve LLNA
Derek Nexus (Lhasa Limited, Birleşik Krallık)	GMPT ve LLNA
TIMES (Laboratory of Mathematical Chemistry (LMC), Bulgaristan)	GMPT ve LLNA
TOPKAT (Dassault Systèmes S A, Fransa)	GMPT
Danish (Q)SAR database: Technical University of Denmark, National Food Institute, Danimarka)	GMPT ve insanlarda alerjik kontakt dermatit

*LLNA: Lokal Lenf Dügümü Testi, **GMPT: Kobay Maksimizasyon Testi.

QSAR modelleri bir maddenin fizikokimyasal özellikleri ile özel bir etki yaratabilme becerileri arasındaki ilişkidir. İncelemeler matematik modelleme temeline dayalı bir dizi bilgisayar yazılımıyla gerçekleşir. Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması [Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)] kapsamında omurgalı hayvanlar üzerindeki deneylerin sayıca azaltılması ve maliyetlerin düşürülmesi için başvurulacak bir yöntemler dizisidir. Toksikolojide QSAR, yapısı ve özellikleri bilinen maddelere yapısal olarak benzeyen ancak toksikolojik özelliği bilinmeyen bir maddenin kimyasal yapısından, o maddenin toksisitesini belirler.²⁵

Yaklaşımlar oldukça çeşitlidir ve her biri farklı *in vivo* veri kümelerine dayanarak geliştirilmiştir. QSAR modelleri kullanımı ve raporlama formatları, Bilgi Gereksinimleri ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesi Rehberinin R.6. bölümünün R.6.1 kısmında yer alan bilgiler izlenerek yapılır.²

Mekanizmanın anlaşılmadığı veya bilinmediği durumlarda, TOPKAT, Derek Nexus gibi uzman sistemlerden biri veya birkaçı, bir tahmin verebilecek en iyi aday olacaktır.²

In silico yöntemlerin güvenilir olması için Avrupa Kimyasallar Ajansı tarafından belirlenen işlem basamakları aşağıda yer alır (Tablo 3).²⁵

SINIFLANDIRMA, ETİKETLEME VE AMBALAJLAMA YÖNETMELİĞİ UYARINCA SINIFLANDIRMA VE ETİKETLEME

Deri duyarlılığına neden olan maddeler ve karışımlar, Sınıflandırma, Etiketleme ve Ambalajlama [Classification, Labelling and Packaging (CLP)] Tüzüğü uyarınca sınıflandırmalar ile karakterize edilebilir. Bir maddenin duyarlılaştırma potansiyeli hakkında bilgi, karışımların sınıflandırılması ve etiketlenmesi için önemlidir. Çünkü karışımlarda sınıflandırma için farklı spesifik konsantrasyon limitlerinin kullanılması gerekir. Deri duyarlılaştırıcılar Kategori 1'de "uyarı" sözcüğüyle sınıflandırılır ve tehlike ifadesi H317 "Alerjik cilt reaksiyonlarına neden olabilir" şeklindedir.²

TABLO 3: Güvenilirlik için işlem basamakları.²⁵

In silico değerlendirme adımları	
Adım 0	Bilgilerin toplanması
Adım 1	Ön analiz
Adım 2	Sınıflandırma şemalarının kullanımı
Adım 3	Yapısal uyarıcıların (spesifik noktaların) taranması
Adım 4	Ön değerlendirme
Adım 5	Benzer bileşiklerin taranması
Adım 6	(Q)SAR tahminleri
Adım 7	Son değerlendirme

QSAR: Kantitatif yapı aktivite ilişkileri.

1A alt kategorisi: İnsanlarda yüksek sıklıkta ve/veya hayvanlarda yüksek potansiyel gösteren maddelerin, insanlarda anlamlı bir duyarlılık üretme potansiyeline sahip olduğu varsayılabilir.

1B alt kategorisi: İnsanlarda düşük ve orta derece sıklıkta ortaya çıkan ve/veya hayvanlarda düşük ve orta derece potansiyel gösteren maddelerin, insanlarda duyarlılık üretme potansiyeline sahip olduğu varsayılabilir.²

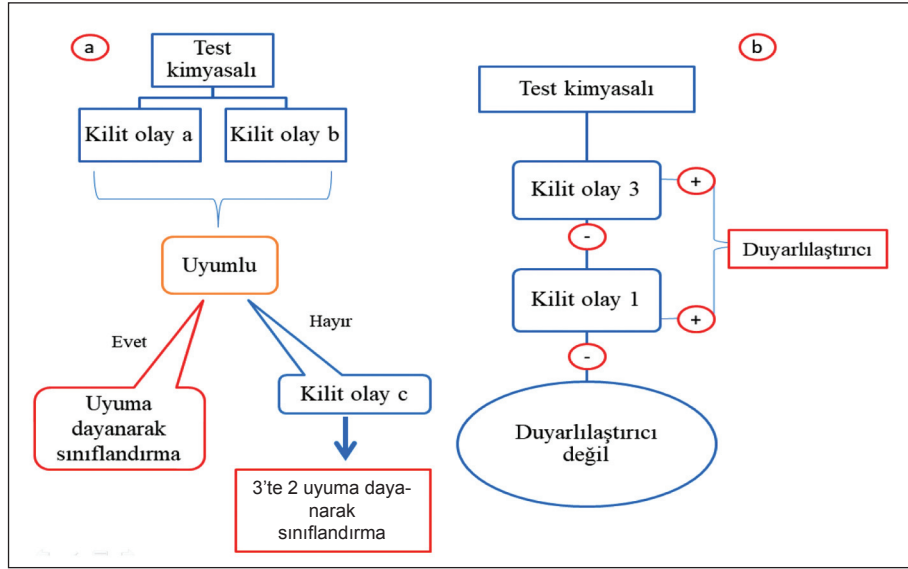
ALTERNATİF TEST YÖNTEMLERİ NASIL KULLANILIR?

Herhangi bir test yapılmadan önce mevcut tüm bilgilerin değerlendirilmesi gerekir. Araştırılacak madde; kategori 1 cilt korozif, güçlü asidik ($\text{pH} \leq 2$) veya bazik ($\text{pH} \geq 11,5$) veya havada kendiliğinden, oda sıcaklığında su ya da nem ile temas hâlinde alev alma özelliklerini taşıyorsa test yapılması gerekmez.¹⁵

In chemico/in vitro yöntemlerin sadece bir mekanik olay (AOP kilit olay) hakkında bilgi vermesi nedeniyle yöntem kombinasyonlarına ihtiyaç vardır. Duyarlılaştırma potansiyelinin daha güvenilir değerlendirilmesini sağlamak için 2 veya daha fazla yaklaşımdan en iyi sonuçların, nasıl entegre edilebileceği değerlendirilir.^{3,15}

Ancak sonuçların birleştirilmesi ile her zaman daha iyi tahminler elde edilemeyeceği de belirtilir.³

OECD tarafından önerilen yöntem kombinasyonları; Ölçme ve Değerlendirmede Bütünleşik Yaklaşım [Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)] ve Tanımlanmış Yaklaşımdır [Defined Approaches (DAs)].²⁶



ŞEKİL 2: a: AOP 2/3 tanımlı yaklaşım şeması. Kilit Olaylar 1-3 için Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü test kılavuz yöntemleri, 3 yöntemden en az 2'sinde fikir birliği gösterene kadar tanımsız bir düzende gerçekleştirilir. b: Kilit Olay 3/1 Sıralı Test Stratejisi tanımlı yaklaşım şeması.¹⁴

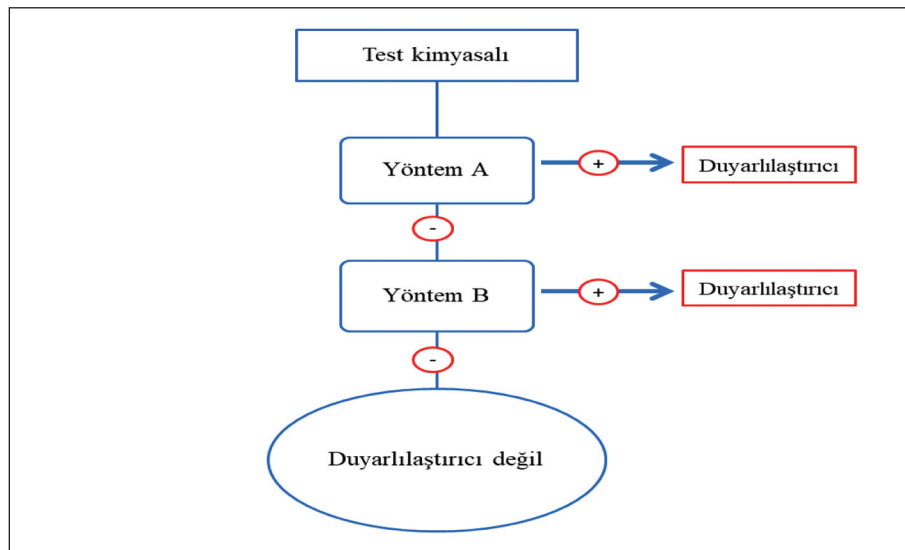
TANIMLANMIŞ YAKLAŞIMLAR

Sabit bir bilgi kaynağı kümesi ve sabit veri yorumlama prosedürüne dayanan deri duyarlılığı alanında geliştirilen hayvan dışı yaklaşımlar “test etme ve değerlendirmeye yönelik tanımlanmış yaklaşımlar” olarak belirtilir. Oluşturulan tahminlerin kurala dayalı olduğu ve uzman kararından etkilenmediği vurgulanır ve birden fazla test kullanım avantajı, testler ara-

sında teknik sınırların nasıl karşılandığına bağlıdır.^{26,27}

Tanımlanmış yaklaşım AOP 2/3: Analizler 2 kilit olay için gerçekleştirilir. DPRA, Keratino Sens (LuSens) ve h-CLAT (U-SENS) yöntemleri kullanılır. Karar şeması Şekil 2a’da gösterilmiştir.¹⁴

Kilit olay 3/1 sıralı test stratejisi: Girdi olarak kilit olay 1 (DPRA) ve 3 (h-CLAT, IL8-Luc, U-



ŞEKİL 3: Entegre yaklaşım ikili kombinasyon.²⁷

SENS) verilerine ihtiyaç vardır. Karar şeması Şekil 2b'de gösterilmiştir.¹⁴

Bir diğer entegre yaklaşım ikili kombinasyondur. Tahmin, 2 testten hangisinin önce gerçekleştirildiğinden bağımsızdır. Ancak ilk testin DPRA 2. testin h-CLAT olması durumunda daha iyi sonuçlar elde edilir. Karar şeması Şekil 3'te gösterilmiştir.²⁷

ÇAPRAZ OKUMA

Çapraz okuma (read-across) yaklaşımı ise sorgulanmakta olan bir maddenin fizikokimyasal, toksikolojik ve ekotoksikolojik özelliklerini belirleyebilmek için yapısal olarak ona benzer bir maddenin özelliklerinden yararlanılması prensibine dayanır. Hedef maddenin tehlikeli özelliklerini değerlendirmek için 1 veya daha fazla kaynak maddeden verilerin kullanımını gerektirir. Test maddesinin seçilen madde ile uygunluğunu değerlendirmek için bazı sorulara yanıt aranmalıdır:

-Aynı son nokta dikkate alınıyor mu?

-Reaktivite ve sensitizasyon davranışını etkileyecek ilave fonksiyonel gruplar veya ilave sübstitüentler var mı?

-Fizikokimyasal parametreler benzer mi? (örneğin LogP, uygulanabilirlik etki alanı değerlendirmeleri)

-Duyarlılık profilini etkileyen safsızlıklar var mı?

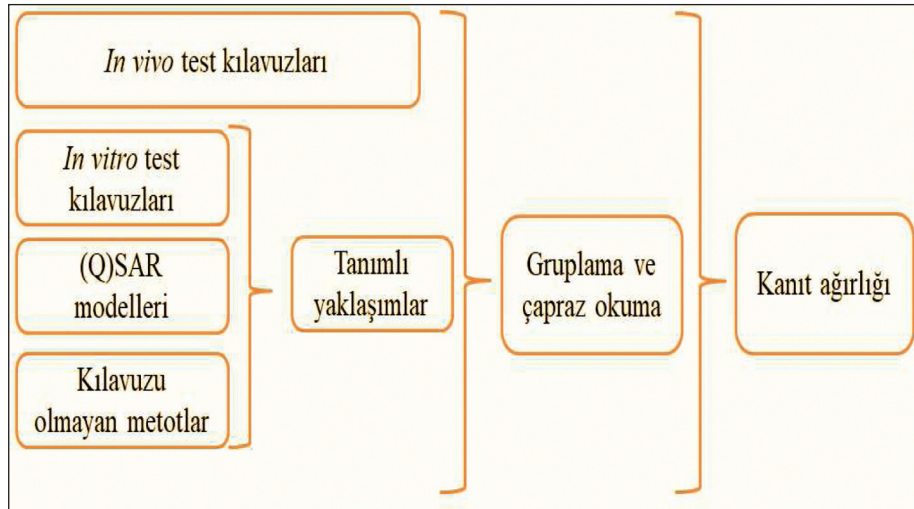
-Muhtemel kimyasal mekanizma aynı mıdır?

Çapraz okuma (read-across) kullanımı ve raporlama formatları, Bilgi Gereksinimleri ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesi Rehberinin R.6. bölümünün R.6.2 kısmında yer alan bilgiler izlenerek yapılır.²

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRMEDE BÜTÜNLEŞİK YAKLAŞIM

IATA, kimyasal tehlike veya risk değerlendirmesi için test stratejileri kullanılarak yeni bilgilerin üretilmesiyle birlikte mevcut bilgilerin entegre analizine dayanan, bilimsel yaklaşımlar olarak tanımlanır. Karar durumu ile ilgili; kabul edilebilir belirsizlik seviyesi dikkate alınarak, belirli bir düzenleyici bağlamda tanımlanmış bir soruyu cevaplamak için tekrarlı yaklaşım izlenir.²⁶ Belirli bölgesel gerekliliklere veya yasal düzenlemelere esnek ve uyarlanabilir şeklindedir.⁹

IATA'daki genel değerlendirme süreci, farklı bilgi parçalarının tartılmasında mutlaka bir uzman görüşü gerektiren kanıt ağırlığına dayanır. Tanımlanmış yaklaşımlar, IATA'nın karar bağlamı içinde aynı düzeyde bilgi sağladığında ise *in vivo* verilere eşdeğer alternatifler olarak kabul edilir. Tanımlanmış yaklaşımlardan bazıları, insanlarda deri duyarlılığı yanıtlarının tahmininde iyidir; bu nedenle değerlendirme için LLNA verilerine alternatif veya zaten mevcutsa bu verilerle birlikte IATA'nın geçerli bileşeni olarak kullanılır (Şekil 4).²⁶



ŞEKİL 4: Ölçme ve değerlendirilmede bütünlük yaklaşım elemanları ve tanımlanmış yaklaşımların ölçme ve değerlendirilmede bütünlük yaklaşım içindeki rolü.²⁶

Tüm toksisite testleri güçlü yönleri ve sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle hayvan dışı metotların ve tanımlanmış yaklaşımların performansını değerlendirmek için referans hayvan verileri kullanırken, hayvansal test sonuçlarının sınırlarını da göz önünde bulundurmak önemlidir. Spesifik olarak, hayvan dışı yöntemlerin ve tanımlanmış yaklaşımların, referans yöntemden daha doğru tahminler vermesi beklenmemelidir.¹⁴

Duyarlılık tehlike potansiyeli üzerinde sonuca varmak için kanıt ağırlığı yaklaşımının kullanılması gerekir. Kanıt ağırlığını tamamlayabilecek bilgiler, read-across (çapraz okuma) ya da *in silico* yaklaşımlar gibi test dışı yöntemlerden veya deri duyarlılığına dayalı diğer biyolojik mekanizmaları ele alan test yöntemlerinden elde edilebilir. Bir veya 2 kilit olaydan elde edilen bilgiler kullanılarak sınıflandırma ve risk değerlendirmesi konusunda bir sonuca varılmazsa, 3 kilit olay hakkında bilgi sağlanması gerekir.

Tutarlı veriler, *in vitro* testlerden ve potansiyel olarak ilgili OECD QSAR Toolbox gibi kaynaklardan elde edilmesi durumunda, duyarlılık tehlikesi üzerine bir sonuç mümkün olmalıdır. Veriler tutarsız ise duyarlılık potansiyelinin doğru şekilde tahmin edilmesini sağlamak için ek bilgi toplanmalıdır.

Duyarlılaştırıcı maddeler için insanlarda dikkate değer duyarlılık potansiyeline sahip olup olmadığı konusunda bir değerlendirme yapılması gerekir (CLP Kategori 1A). Kategori 1A hariç tutulabilirse, maddenin Kategori 1B (orta deri duyarlılaştırıcı) sınıfında olduğu varsayılır.¹⁵

Dikkate değer duyarlılık (Kategori 1A) göz ardı edilemediğinde, ek bilgiye (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) ihtiyaç vardır. Benzer maddelerden elde edilen bilgiler; LLNA verileri gibi potansiyel değerlendirmede yardımcı olabilir. OECD QSAR Toolbox ve Derek Nexus ise benzer maddelerin tanımlanmasında ve potansiyel tahmin için kullanılan EC3 değerini öngörmede kullanılabilir.^{15,28} EC3, kimyasal maddenin proliferatif cevapta 3 kat artışa neden olduğu konsantrasyondur.⁵

Hayvan dışı test yöntem(ler)inin yeterli bilgi elde etmede madde için uygun olduğu garanti edilmelidir. Örneğin test maddesinin log Kow değeri

veya düşük çözünürlüğü belirli bir *in vitro* yöntemin kullanımını engelleyecek sınırlamalardan olabilir.¹⁵

ALTERNATİF TEST YÖNTEMLERİNDEKİ SINIRLAMALAR

DPRA, KeratinoSens™, LuSens, h-CLAT, U-SENS™ ve IL8-Luc Raportör Gen Analizi yöntemlerinden elde edilen bilgiler, bağımsız bir yöntem olarak değil, kanıt ağırlığı yaklaşımı içindeki diğer bilgilerle birlikte kullanılmalıdır. Böylece duyarlılaştırıcı olan ve olmayan maddeler arasındaki ayırım yapılabilir. Şu anda, test yöntemleri tek başına duyarlılaştırıcı maddelerin 1A ve 1B alt kategorilere sınıflandırılması için uygun değildir.¹⁵

DPRA yöntemi; metal bileşikler, bilinmeyen veya değişken kompozisyondaki maddeler ve karışımlar, kompleks reaksiyon ürünleri ve biyolojik materyaller için kullanılamaz.²⁸ Prohaptentler bu analizde tespit edilemez. Pre-haptentler ise yanlış negatif sonuçlar verebilir. Sistein veya lizin dışındaki aminoasitlere karşı tercihlili reaktiviteye 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 çözünürlük konsantrasyonlarda test edilen kimyasal duyarlılaştırıcı olarak tanımlamak için pozitif sonuçlar kullanılabilir. Ancak negatif tahmin durumunda kesin bir sonuç çıkarılmamalıdır.

KeratinoSens™ yönteminde <1000 µM konsantrasyonlarda elde edilen negatif sonuçlar yetersiz veya sonuçsuz olarak kabul edilmelidir.

KeratinoSens™ ve LuSens yöntemlerinde, prohaptentler yanlış negatif sonuçlar verebilir. Pre-haptentler, özellikle yavaş oksidasyon oranı olanlar, yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Sistein ve lizin kalıntıları dışındaki nükleofillere karşı özel reaktiviteye sahip maddeler, bu analizlerde yanlış negatif olarak algılanabilir. Duyarlılaştırıcı olarak hareket etmeyen ancak kimyasal etkileyici (stres uygulayıcı) olan test kimyasalları yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Bu test sistemleri içinde hücrelerin yaşayabilirliği $\geq 70\%$ olması gerektiği için yüksek sitotoksik kimyasallar her zaman güvenilir bir şekilde değerlendirilemez.

Ayrıca KeratinoSens™ ve LuSens analizlerinde lusiferaz enzimi ile etkileşime giren maddeler, lüminesansı artırarak (fitoöstrojenler) veya inhibe ederek lusiferaz aktivitesini etkileyebilir.

LuSens yönteminde <2000 µM konsantrasyonlarda elde edilen negatif sonuçlar yetersiz veya sonuçsuz olarak kabul edilmelidir. Yöntemde log Kow 7'nin üzerinde olan maddeler, uygulanabilirlik alanı dışındadır, log Kow 5 ile 7 arasındaki maddelere ilişkin sınırlı bilgi mevcuttur.

h-CLAT, U-SENS™ ve IL8-Luc Raportör Gen Analizinde prohaptenler ve pre-haptenler yanlış negatif sonuçlar verebilir.

h-CLAT yöntemi, log Kow değeri 3,5'ten daha yüksek olan maddeler için negatif sonuç verme eğilimindedir. Bu sonuçlar dikkate alınmamalıdır. Hücrelerin canlılığı $\geq 70\%$ olması gerektiği için yüksek sitotoksik kimyasallar her zaman güvenilir bir şekilde değerlendirilemez.

h-CLAT ve U-SENS™ yöntemlerinde, FITC veya propidyum iyodür ile aynı dalga boyunu yayan güçlü floresans maddeler akış sitometrik saptamayı engelleyecektir, bu nedenle FITC etiketli antikolar kullanılarak doğru bir şekilde değerlendirilemezler.

U-SENS™ yönteminde membran bozucu maddeler, örneğin sürfaktanlar CD86'nın non-spesifik bir şekilde artması nedeniyle yanlış pozitif tahminlere neden olabilir. Testte, hücrelerin canlılığı $\geq 50\%$ olması gerektiği için yüksek sitotoksik kimyasallar her zaman güvenilir bir şekilde değerlendirilemez.

IL8-Luc Raportör Gen Analizinde uygun bir çözücü içinde 20 mg/mL'de çözünmeyen maddelerle elde edilen negatif sonuçlar dikkate alınmamalıdır. Yüzey aktif maddeler (yanlış pozitif), anhidritler (yanlış negatif) ve lusiferaz aktivitesine müdahale eden maddeler testin uygulanabilirlik alanı dışındadır.¹⁵

Deri duyarlılığı gelişimi farklı hücreler arasında etkileşim gerektiren karmaşık bir süreçtir. Valide edilmiş *in vitro* yöntemler, 2 boyutlu monokültür içerdiklerinden, gerçek *in vivo* durum zayıf bir şekilde temsil edilir. Çünkü monokültür temelli testlerde, keratinosit ve dendritik hücreler arası iletişim ve çapraz etkileşim yapay olarak ayrılır.²⁹ Son olarak; *in chemico* ve *in vitro* yöntemlerde yaygın şekilde hay-

vansal ürünlerin (özellikle fetal buzağı/sığır serumu) aminoasit, hormon ve büyüme faktörü kaynağı olarak hücre kültürü ortamına eklenmesi, yöntemleri hayvan testi alternatifi olmaktan uzaklaştırabilir.³⁰

SONUÇ

Hayvan dışı yöntemler, dünya çapında hayvan deneylerine alternatif olma yolunda artan bir değere sahiptir. Alternatif yöntemlerin entegrasyonu ile *in vivo* yöntemlere olan gereksinim azalır.

In silico yöntemler bulguların iyi değerlendirilmesini, doğru hesaplanmasını ve çok yönlü parametrelerin hesaba katılmasını sağlar. 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 öngörür.

Kabul edilen alternatif yöntemler, test maddelerinin duyarlılaştırıcı potansiyelini belirlemede hayvan modellerine kıyasla yeterli değildir. Bu nedenle EC-VAM'a göre kullanılan düzenleyici hayvan testlerinin yerine birden çok hayvan dışı test yöntemi uygulanmalıdır, tamamen yer değiştirme için AOP'nin temel mekanizmalarını ele alan yöntemlerin kombinasyonuna ihtiyaç duyulur. Bununla birlikte, SENS-IS ve GARD yöntemleri gelecekte, validasyon sonrası, tek başına güvenli sonuçlar verecektir. Ayrıca, yeni yöntem protokollerinde hayvansal kaynaklı ürün kullanımından kaçınılması teknik ve etik açıdan daha iyi *in vitro* yöntemler sağlayacak, kontaminasyon riskini ve bilinmeyen birçok değişkenin deney ortamına girişini engelleyecektir. Yöntemlerde farklı hücre tipleri içeren ko-kültür modellerinin kullanılması da tek bir test ile birkaç kilit olay analizi sağlayacaktır.

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

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi

alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya

üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Özge Cemiloğlu Ülker; **Tasarım:** Özge Cemiloğlu Ülker; Büşra Esen; **Denetleme/Danışmanlık:** Özge Cemiloğlu Ülker; **Kaynak Taraması:** Büşra Esen; **Makalenin Yazımı:** Özge Cemiloğlu Ülker; Büşra Esen; **Eleştirel İnceleme:** Özge Cemiloğlu Ülker.

KAYNAKLAR

- United Nations (UN). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. UN New York and Geneva: United Nations; 2015. p.149. [\[Link\]](#)
- ECHA. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.7a: Endpoint Specific Guidance, Version 6.0. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency; 2017. p.1-610. [\[Link\]](#)
- Kimber, I. The activity of methacrylate esters in skin sensitisation test methods: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019;104:14-20. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Almeida A, Sarmento B, Rodrigues F. Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int J Pharm*. 2017;519(1-2):178-85. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, Allen D, Api AM, Ashikaga T, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(5):344-358. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nassau S, Fonacier L. Allergic contact dermatitis. *Med Clin North Am*. 2020;104(1):61-76. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Basketter DA, Kimber I. Are skin sensitisation test methods relevant for proteins? *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;99:244-8. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kleinstreuer NC, Hoffmann S, Alépée N, Allen D, Ashikaga T, Casey W, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches*. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(5):359-74. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
- European Chemicals Agency (ECHA). Non-animal approaches Current status of regulatory applicability under the REACH, CLP and Biocidal Products regulations. 2017. p.1-163. [\[Link\]](#)
- Genc B, Salman M. İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikoloji Çalışmalarında Kullanılan Alternatif Yöntemler. Guvenc D, editör. Neden Alternatif Yöntemler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.43-7. [\[Link\]](#)
- Stephens ML, Mak NS. History of the 3Rs in Toxicity Testing: From Russell and Burch to 21st Century Toxicology. Allen, DG, Waters MD, eds. Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing. 1st ed. London;UK: Royal Society of Chemistry; 2013. p.1-43. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mushtaq S, Daş YK, Aksoy A. Alternative methods to animal experiments. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2018;38(2):161-70. [\[Crossref\]](#)
- Daniel AB, Strickland J, Allen D, Casati S, Zuang V, Barroso J, et al. International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;95:52-65. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
- Environmental Protection Agency (EPA). Interim Science Policy: Use of Alternative Approaches for Skin Sensitization as a Replacement for Laboratory Animal Testing. EPA's Office of Chemical Safety and Pollution Prevention: Office of Pesticide Programs Office of Pollution Prevention and Toxics. 2018. p.1-13. [\[Link\]](#)
- European Chemicals Agency (ECHA). How to use new or revised in vitro test methods to address skin sensitisation. 2018. p.1-11. [\[Link\]](#)
- OECD. APPENDIX II: In Chemico Skin Sensitization: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA). Test No. 442C. 2019. p.24-39. [\[Link\]](#)
- Grundström G, Borrebaeck CAK. Skin sensitization testing-what's next? *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):666. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Kozmetik Ürünler Üzerinde Yapılan Hayvan Deneylerine Alternatif Test Metodlarına İlişkin Kılavuz Sürüm 1.0. Erişim Tarihi: 1.05.2020. Erişim linki: [\[Link\]](#)
- OECD. OECD Guideline For Testing Of Chemicals. In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). No. 442C. 2015. [\[Link\]](#)
- OECD. Key Event Based Test Guideline 442D In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event on Keratinocyte Activation. 2018. [\[Link\]](#)
- OECD. Key Event Based Test Guideline. In vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. 442E. 2018. [\[Link\]](#)
- OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay No. 429. 2010. [\[Link\]](#)
- OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Local Lymph Node Assay: BRDU-ELISA or-FCM. No. 442B. 2010. [\[Link\]](#)
- OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. No. 442A. 2010. [\[Link\]](#)
- Yavuz O, Marangoz Ö. Farmakoloji ve toksikolojide in silico yöntemlerin kullanımı [Use of in silico methods in pharmacology and toxicology]. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*. 2018;4(3):35-42. [\[Link\]](#)
- Casati S, Aschberger K, Barroso J, Casey W, Delgado I, Kim TS, et al. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Arch Toxicol*. 2018;92(2):611-7. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
- Roberts DW, Patlewicz G. Non-animal assessment of skin sensitization hazard: Is an integrated testing strategy needed, and if so what should be integrated? *J Appl Toxicol*. 2018;38(1):41-50. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barentsen HM, Jonis SU, Pelgrom SMGJ, Rijk JCW, Westerink WMA, Paulussen JJC. REACH alternative testing strategy for skin sensitization in practice: Fact or fiction? *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019;106:292-302. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thélu A, Catoire S, Kerdine-Römer S. Immune-competent in vitro co-culture models as an approach for skin sensitisation assessment. *Toxicol In Vitro*. 2020;62:104691. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marigliani B, Sehn FP, Silva JVMA, Balottin LBL, Augusto EFP, Buehler AM. The overt and hidden use of animal-derived products in alternative methods for skin sensitisation: a systematic review. *Altern Lab Anim*. 2019;47(5-6):174-95. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)