

Dört Kimyasal'ın Cilt Hassaslaştırıcı Güçleri Üzerindeki Vehikül Etkiler: Lokal Lenf Nodu Denemesi Kullanılarak Değerlendirme

VEHICLE EFFECTS OF SKIN SENSITIZING POTENCY OF FOUR CHEMICALS: ASSESSMENT USING THE LOCAL LYMPH NODE ASSAY

Z. M. WRIGHT*, D.A. BASKETTER*, L. BLAIKIE*, K.J. COOPER*, E.V. WARBRICK**, R.J. DEARMAN** and I. KIMBER**

*SEAC Toxicology Unit, Unilever Research, Colworth House, Sharnbrook, Bedfordshire MK44 1LQ, U.K., and **Zeneca Central Toxicology Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TJ. U.K.

©Wright ZM, Basketter DA, Blaikie L, Cooper KJ, Warbrck EV, Dearman RJ and Kimber I. Vehicle Effects of Skin Sensitizing Potency of four Chemicals: Assessment Using the Local Lymph Node Assay. *International Journal of Cosmetic Science*, 2001; 23(2):75-83.

Özet

Mürin lokal lenf nodu denemesi (LLNA), kantitatif doz yanıt verilerinin ara değerlerinin bulunmasıyla sunularak, kimyasalların relatif cilt hassaslaştırma güçlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Bu yaklaşımı kullanarak, önceden, ciltte karşılaşılan bir kimyasal allerjendeki vehikül matrisin, hassaslaştırma gücü üzerinde belirgin bir etkisi olabileceğini göstermiştik. 3'ün bir stimülasyon göstergesine (SI) neden olarak tahmini bir konsantrasyon olan, EC3 değerinden matematiksel olarak türetilen bir fonksiyonu gibi, relatif güç tahminleri LLNA doz yanıtından hesaplanabilir. Hassaslaştırma gücü üzerindeki uygulama vehikülünün daha ileri etkisini araştırmak için, dört tanınan insan kontak allerjeninin aktivitesini araştırmak için LLNA kullanıldı: İki güzel kokulu kimyasal izoöjenol ve sinamik aldehit; 3-dimetil aminopropilamin (duş jelinde kullanılan bir sürfaktan, kokamidopropil betain'in hassaslaştırıcı bir kirliliği) ve dibromodisiyanobütan (kozmetiklerde kullanılan bir koruyucu olan Öksil K400'ün hassaslaştırıcı unsuru). Dört kimyasal da, yedi farklı vehikülün her birinde uygulandı (aseton: zeytin yağı [4:1]; dimetilsülfoksit; metiletilketon; dimetil formamid; propilen glikol ve hem 50:50 ve hem de 90:10 karışımı etanol ve su). Bir kimyasalın bulunduğu vehikül epidermise sunulduğunda, hassaslaştırıcı etki üzerinde belirgin bir etkisi bulunduğu görüldü. EC3 değerleri, izoöjenol için %0.9-4.9, sinamik aldehit için %0.5-1.7, dimetilaminopropilamin için %1.7->10 ve dibromodisiyanobütan için %1.7-6.4'du. Bu veriler, içindeki kimyasalın ciltte karşılaştığı vehiküllerin kimyasalların relatif cilt hassaslaştırıcı gücü üzerinde önemli etkisi olduğunu doğrulamakta ve allerjik kontakt dermatitler karşılaşma üzerinde de belirgin bir etkisi olabilmektedir. Veriler ayrıca, bu etkileri önceden gösteren bir metod olarak LLNA'nın yararını ve böylece daha hassas risk değerlendirmelerinin gelişiminde göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Lokal lenf nodu denemesi, Güç, Risk değerlendirmesi, Cilt hassaslaştırılması, Vehikül

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:135-143

Summary

The murine local lymph node assay (LLNA) can be used to determine the relative skin sensitizing potency of chemicals via interpolation of the quantitative dose response data generated. Using this approach we have demonstrated previously that the vehicle matrix in which a chemical allergen is encountered on the skin can have a significant influence on sensitizing potency. Estimates of relative potency are calculated from LLNA dose responses as a function of the mathematically derived EC3 value, this being the concentration estimated to induce a stimulation index (SI) of 3. To investigate further the influence of application vehicle on sensitizing potency, the LLNA has been used to examine the activity of four recognized human contact allergens: isoeugenol and cinnamic aldehyde (two fragrance chemicals; 3-dimethylaminopropylamine (ϵ sensitizing impurity of cocamidopropyl betaine, a surfactant used in shower gel) and dibromodicyanobutane (the sensitizing component of Euxyl K 400, a preservative used in cosmetics). The four chemicals were applied in each of seven different vehicles (acetone: olive oil [4:1]; dimethyl-sulphoxide methylethylketone; dimethyl formamide; propylene glycol and both 50:50 and 90:10 mixtures of ethanol and water). It was found that the vehicle in which a chemical is presented to the epidermis can have a marked effect on sensitizing activity. EC3 values ranged from 0.9 to 4.9% for isoeugenol, from 0.5 to 1.7% for cinnamic aldehyde, from 1.7 to > 10% for dimethylaminopropylamine and from 0.4 to 6.4% for dibromodicyanobutane. These data confirm that the vehicle in which a chemical is encountered on the skin has an important influence on the relative skin sensitizing potency of chemicals and may have a significant impact on the acquisition of allergic contact dermatitis. The data also demonstrate the utility of the LLNA as a method for the prediction of these effects and thus for the development of more accurate risk assessments.

Key Words: Local lymph node assay, Potency, Risk assessment, Skin sensitization, Vehicle

T Klin J Cosmetol 2002, 3:135-143

Mürin lokal lenf nodu denemesi (LLNA), cilt hassaslaştırıcı kimyasalları tanımlayan bir metoddur (1-3). Metod, cilt hassaslaştırıcı kimyasalların tanımlanması için tek bir test olacak şekilde yeteri kadar onaylanmasına karar verilen, Interagency Co-ordinatory Committee for the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (Alternatif metodların onaylanması için ayarlanma koordinasyon komitesi) tarafından değerlendirilmiştir (4). Benzer onay, European Commission, via the European Centre for the Validation of Alternative Methods (Alternatif metodların onaylanması için Avrupa merkezinin, Avrupa komisyonu) tarafından da verilmiştir (5).

Son zamanlarda, LLNA'nın riskli tanımlanmaya ek olarak, kimyasalların relatif cilt hassaslaştırıcı gücünün belirlenmesinde bir yaklaşım sağladığıda gösterilmiştir. Deneme, farelerde tekrarlanan topikal uygulamadan sonra uygulanan yeri direne eden lenf nodlarındaki bir fonksiyon olarak proliferatif yanıtlara neden olan bir test kimyasalın hassaslaştırıcı aktivitesini ölçmektedir. Bir kimyasal, aynı zamandaki vehikülle tedavi edilen kontrollerle karşılaştırıldığında, bir veya daha fazla test konsantrasyonlarının lenf nod hücreleri (LNC) proliferasyonunda 3 kat veya daha fazlasını stimüle edecek bir cilt hassaslaştırıcısıdır (1). Bu bir EC3 değerinin türetilmesiyle sağlanabilir, bu da LNC proliferasyonunda 3 katlık bir artışı sağlamak için stimülasyonu gereken kimyasalın tahmini konsantrasyonudur (6-8). Bu yaklaşımı kullanarak, önceden, cilt üzerinde vehikül matriksteki bir materyalin karşılaştığı iki kimyasal allerjenin hassaslaştırma gücü üzerinde çok belirgin bir gücü olduğunu göstermiştir (9,10). Önceki araştırmamızda, vehikül matriksinin etkilemesinin, kimyasal allerjenler arasında değişip değişmediği açıkça belirgin değildi.

Yukarıda yazılanların ışığında, LLNA'da bir sıra kontakt allerjenlerdeki farklı vehiküllerin etkisinin tespiti için ileri analizler yürütülmesi yolunu seçtik. Bir amacımız vehikül etkisinin sürekliliğini araştırmak ve ikincisi de, risk değerlendirme sürecinde bir ilk basamak olarak güvenilir cilt hassaslaştırıcı aktivitenin

değerlendirilmesi için LLNA'nın yararının daha da fazla araştırılmasıydı (11,12). Burada raporlanan, konuyla ilgili ürün formülünü de içeren, iki laboratuvar da dört bilinen insan kontakt allerjeninin, yedi farklı vehikülün herbirinde uygulandığındaki LLNA sonuçlarıdır.

Materyel ve Metodlar

Katılan Laboratuvarlar

Bu araştırmalara katılan 2 laboratuvar, Safety and Environmental Assurance Centre (SEAC) Toxicology Unit, Unilever Research, Sharnbrook, U.K. (Laboratuvar 1) ve Zeneca Central Toxicology Laboratory, Macclesfield, U.K. (Laboratuvar 2).

Materyeller

İzoöjenol (saflık % + 99.0) Aldrich'ten (Poole, Dorset, U.K.), sinnamik aldehit (saflık % 99.0) ve 3-dimetilaminopropilamin (saflık % + 99.0) Sigma'dan (Poole, Dorset, U.K.) ve dibromodisyanobütan (metildibromoglutaronitril) (saflık % 99.8) Calgon Corporation (Pittsburg, U.S.A.)'dan elde edildi. İzleyen vehiküller, her laboratuvar tarafından bağımsız olarak sağlandı: aseton: zeytin yağı 4:1 (AOO); metiletilketon (MEK); dimetil formamid (OMF); polietilen glikol (PG); dimetil sülfoksit (DMSO), etanol: su (EtOH), 90:10 ve etanol: su, 50:50. Dozlu solüsyonlar hergün tedaviden önce, acele olarak ve taze olarak hazırlandı.

Hayvanlar

Çalışmaların başından sonuna kadar 6 ve 12 hafta arası yaşlarında dişi CBA/Ca ırkı fare (Harlan UK Ltd, Bicester, Oxford, UK) kullanıldı. Hayvanlar standart koşullarda kafes başına dörder tane olmak üzere barındırıldı: Porton kombine diyet (Special Diets Services Ltd, Witham, UK9 ve ad libitum olarak musluk suyu uygundu.

Lokal Lenf Nodu Denemesi

Laboratuvar 1 yedi farklı vehikülde sinnamik aldehidin ve dibromodisyanobütan'ın beş konsantrasyonunu test etti. EC3 değerlerini türetmek amacıyla tekrar test etmeler, DMF ve DMSO'daki sinnamik aldehit ve MEK'deki

dibromodisiyanobütan durumunda daha düşük konsantrasyonlarda yönetildi. DMSO'daki dibromodisiyanobütan, doz yanıtını uzatmak amacıyla iki kere test edildi. Laboratuvar 2; yedi farklı vehiküldeki izoöjenol ve 3-dimetil aminopropilaminin beş konsantrasyonunu test etti. Önce tanımlanan laboratuvarların her ikisinde de standart LLNA protokolu kullanıldı (1).

Özet olarak, üç gün arka arkaya günlük olarak dörtlü fare gruplarının kulaklarının arkalarına topikal olarak 25 µL'lik her bir test kimyasal konsantrasyonu veya yalnız uygun vehikülün eşit volümünden sürüldü. İlk tedaviden beş gün sonra, bütün farelere 20 µCi [³H] metiltimidin (3HTdR) (Amersham International, Amersham, UK, 2 Ci mmol⁻¹'lik spesifik aktivite, 1 mCi µL⁻¹ konsantrasyon) içeren 250 µL fosfat tamponlu salin (PBS) intravenöz olarak enjekte edildi. Beş saat sonra, fareler karbondioksit boğulmasıyla sakrifiye edildi. Drene eden avriküler lenf nodları (DLN) hızla eksize edildi ve her deneysel grup için toplandı. LNC'nin tek hücre süspansiyonları, paslanmaz çelik kafesle hassasça mekanik disagregasyonla hazırlandı (200 mesh boyunda, John Staniar & Co., Manchester, UK). Mesh, sonra PBS'le iki kere yıkandı ve hücreler gece boyunca 4°C'da %5 trikloroasetik asitte (TCA) çöktürüldü. Her çökelti sonradan toprak haline getirildi ve %5 TCA'da resüspende edildi ve 10 ml'lik sintillasyon sıvısıyla sintillasyon şişesine transfer edildi (Optiphase Hisafe 3, Wallac, Turku, Finland). ³HTdR'nin birleşmesi, her deneysel grup için nod başına dakika (dpm) başına dağılımlar olarak, β-sintillasyon sayacı ile ölçüldü. Her grup için, aynı anda vehikülle tedavi edilen kontrol grubuna relatif olarak ³HTdR birleşmesindeki artışın belirlenmesiyle bir stimülasyon göstergesi (SI) türetildi.

Matematiksel Analiz

Aynı andaki vehikülle tedavi edilen kontrollere (EC3 değeri) 3 relatif olarak bir SI'ye neden olması gereken test kimyasalın tahmini konsantrasyonu için, doz-yanıt verilerinin doğrusal ara değerini bularak hesaplandı (13). 3'ün altında ve üstünde doğrudan doğruya uzanan SI aksında 2

veri noktasının doğrusal ara değeri bulunmasıyla EC3 değerleri belirlendi. Vehikülle tedavi edilen kontrol değerleri (SI=1) sonradan kullanılmadı. 3'ün SI değerinin altında ve üstünde doğrudan doğruya uzanan veri noktalarını kullanarak, EC3 değeri izleyen denklemi kullanarak hesaplanabilir (13).

$$EC3 = C + [(3-d) / (b-d)] (a-c)$$

Burada a= 3'ün üzerinde SI'yi veren en düşük konsantrasyon, b= a ile verilen SI değeri, c= 3'ün altında SI'yi veren en yüksek konsantrasyon, d= c ile verilen SI değeri.

Sonuçlar

İki laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar, bütün test edilen kimyasal/vehikül kombinasyonlar için dpm nod⁻¹ ve SI değerlerinin gösterildiği, Tablo 1-4'de sunulmuştur.

Önceden gösterildiği gibi, farklı vehiküllerle yalnız tedavi edilen fareler arasında tritiated timidin birleşmesinin seviyelerinde zeminde bazı değişiklikler vardı. AOO ile ³H birleşmesinin seviyeleri dört deneyde 307 dpm nod⁻¹'den 463 dpm nod'a değişirken, MEK için, beş deneyde sıra 216-360 dpm nod⁻¹, DMF için beş deneyde 215-429 dpm nod⁻¹, PG için üç deneyde 233-260 dpm nod⁻¹, DMSO için yedi deneyde 279-882 dpm nod⁻¹, EtOH/ddw (90:10) için dört deneyde 293-329 dpm nod⁻¹ ve EtOH/ddw (50:50) için üç deneyde 295-238 idi. Tekrarlanan çalışmalar arasında anlamlı farklılıklar vardı, örneğin DMSO (524/882/530 dpm nod⁻¹)'deki dibromodisiyanobütan, isoöjenol veya dimetilaminopropilaminle değil ama önceki gözlemlerle (9,10,14) birbirini tutan iki deneydeki (sinnamik aldehit ve dibromodisiyanobütan) diğer vehiküllerden DMSO zeminleri daha yüksekti (Tablo 1-4).

Bütün olgularda, uygun doz yanıtlarına erişilemedi. Örneğin AOO'daki dibromodisiyanobütan %10.0'a kadar bir sıradaki doz yanıtında SI değerleri üretirken arkasından SI değerlerinde bazı dalgalanmalar kaydedildi. SI değerlerindeki dalgalanmalar, ayrıca MEK, DMF ve DMSO'daki dibromodisiyanobütan, DMSO'daki izoöjenol, AOO, PG ve EtOH/ddw (50:50)'deki 3-

Tablo 1. Dörder farelik gruplar, 3 gün arka arkaya günlük olarak kulaklarının arkasına yalnızca vehikül veya vehikülde 25 µL değişik konsantrasyonlarda izoöjenol aldı. Tedavinin başlamasını izleyen 5 gün, bütün farelere PBS'de 20 µ Ci ³HTdR'den 250 µL intravenöz enjekte edildi. Beş saat sonra drene eden avriküler lenf nodları eksize edildi ve tek hücrelik bir süspansiyon hazırlandı. ³HTdR'in birleşmesi b-sintillasyon sayacı ile ölçüldü ve 7 vehikül için stimülasyon göstergesi (SI) ve her dörtlü fare gruplarından toplanan nodlar için ortalama dpm (dpm nod⁻¹) gösterildi. AOO, aseton; zeytin yağı; MEK, metil etilketon; DMEF, dimetil formamid; PG, propilen glikol; DMSO, dimetil sülfoksit; EtOH/ddw (90:10); EtOH/ddw (50:50).

Vehikül/konsantrasyon (%)	İzoöjenol	
	dpm nod ⁻¹	SI
AOO	307	1
0.5	552	1.8
1.0	898	2.9
2.5	2364	7.7
5.0	3389	11.1
10.0	3598	11.7
MEK	360	1
0.5	322	0.9
1.0	1149	3.2
2.5	1785	5.0
5.0	1768	4.9
10.0	2926	8.1
DMF	281	1
0.5	736	2.6
1.0	765	2.7
2.5	1046	3.7
5.0	2101	7.5
10.0	3315	11.8
PG	260	1
0.5	216	0.8
1.0	418	1.6
2.5	784	3.0
5.0	1369	5.3
10.0	2201	8.5
DMSO	279	1
0.5	518	1.9
1.0	894	3.2
2.5	2062	7.4
5.0	5549	20.0
10.0	4780	17.1
EtOH/ddw (90:10)	324	1
0.5	594	1.8
1.0	652	2.0
2.5	1235	3.8
5.0	1890	5.8
10.0	4065	12.6
EtOH/ddw (50:50)	295	1
0.5	293	1.0
1.0	377	1.2
2.5	586	2.0
5.0	896	3.0
10.0	1606	5.4

dimetilaminopropilamin ve AOO ve MEK'deki sinnamik aldehytlerde gözlemlendi.

3-dimetilaminopropilamin olgusunda, yalnız olarak MEK, DMF, PG ve EtOH/ddw (50:50) ile tedavi edilen fareler için tritiated timidin birleşmesinin seviyeleri relatif olarak birbirine yakındı, 215'den 236 dpm nod⁻¹'e sıralanıyordu (Tablo 2). 3-dimetilaminopropilaminin maksimal proliferatif yanıtları kullanılan vehiküle bağlı olarak değişiyordu, SI değerleri PG'de 2.2'den, DMP'de 15.7'ye kadar sıralanıyordu. İzoöjenol olgusunda, maksimal proliferatif yanıtlar kullanılan vehiküle bağlı olarak değişiyordu, SI değerleri en yüksek uygulama konsantrasyonunda etanol/su'da (50:50) 5.4'den DMSO'da 1.7'ye kadar sıralanıyordu (Tablo 1). Sinnamik aldehyd'in neden olduğu yanıtlar, kullanılan vehiküle bağlı olarak değişiyordu, SI değerleri AOO'da 5.4'den EtOH/ddw'de (50:50) 21.9'a kadar sıralanıyordu (Tablo 3). Dibromosiyanoöbütana olan proliferatif yanıtlar, kullanılan vehiküle bağlı olarak değişiyordu, SI değerleri AOO'da 5.4'den EtOH/ddw (90:10)'de 13.6'ya sıralanıyordu (Tablo 4).

Yedi vehiküldeki izoöjenol, sinnamik aldehyd ve 3-dimetilaminopropilamin ve dört vehiküldeki dibromosiyanoöbütan için EC3 değerleri, doğrusal ara değerini bulmayla matematiksel olarak türetildi (13) ve Tablo 5'de gösterildi. DMSO, PG ve EtOH/ddw (50:50)'deki dibromosiyanoöbütan ile, toksisite veya düşük eriyebilirliğin nedenleri için EC3 değerlerini üretmekte gerekli seviyelerde uygulama konsantrasyonlarını artırmak olası değildi. Dibromosiyanoöbütan, PG ve EtOH/ddw 50:50'de insolübl'di ve DMSO'da uygulandığında yüksek doz gruplarında ileri toksisiteye yol açıyordu. EC3 değerleri, izoöjenol için %0.9'dan %4.9'a, sinnamik aldehyd için %0.5'den %1.7'ye, 3-dimetilaminopropilamin için %1.7'den >%10'a ve dibromosiyanoöbütan için %0.4'den %6.4'e sıralanıyordu. İzoöjenol olgusunda, EC3 değerleri DMSO, AOO, MEK, DMF ve EtOH/ddw (90:10) için birbirine çok benzerken, PG ve EtOH/ddw (50:50) için yüksekti.

Dört kimyasal (en azdan yükseğe) farklı vehiküllerde en çok potentten en aza doğru şöyle sıralanabilir:

Tablo 2. Dörder farelik gruplar 3 gün arka arkaya günlük olarak kulaklarının arkasına yalnızca vehikül veya vehikülde 25 µL değişik konsantrasyonlarda 3-dimetilpropilamin aldı. Tedavinin başlamasını izleyen 5 gün, bütün farelere PBS'de 20 µ Ci ³HTdR'den 250 µL intravenöz enjekte edildi. Beş saat sonra drene edilen avriküler lenf nodları eksize edildi ve tek hücrelik bir süspansiyon hazırlandı. ³HTdR'nin birleşmesi β-sintillasyon sayacı ile ölçüldü ve 7 vehikül için stimülayon göstergesi (SI) ve her dördü fare gruplarından toplanan nodlar için ortalama dpm (dpm nod⁻¹) gösterildi. AOO, aseton: zeytin yağı; MEK, metil-etil keton; DMF, dimetil formamid; PG, propilen glikol; DMSO, dimetil sülfoksit; EtOH/ddw (90:10); EtOH/ddw (50:50).

Vehikül/konsantrasyon (%)	3-dimetilpropilamin	
	dpm nod ⁻¹	SI
AOO	463	1
0.5	597	1.3
1.0	486	1.1
2.5	1626	3.5
5.0	3223	7.0
10.0	6417	13.9
MEK	216	1
0.5	350	1.6
1.0	448	2.1
2.5	812	3.8
5.0	1463	6.8
10.0	2716	12.6
DMF	215	1
0.5	320	1.5
1.0	363	1.7
2.5	937	4.4
5.0	1370	6.4
10.0	3389	15.7
PG	237	1
0.5	359	1.5
1.0	234	1.0
2.5	306	1.3
5.0	325	1.4
10.0	518	2.2
DMSO	392	1
0.5	529	1.4
1.0	510	1.3
2.5	826	2.1
5.0	2107	5.4
10.0	3549	9.0
EtOH/ddw (90:10)	329	1
0.5	331	1.0
1.0	500	1.5
2.5	527	1.6
5.0	1262	3.8
10.0	1938	5.9
EtOH/ddw (50:50)	236	1
0.5	243	1.0
1.0	216	0.9
2.5	393	1.7
5.0	292	1.2
10.0	1293	5.5

Tablo 3. Dörder farelik gruplar, 3 gün arka arkaya günlük olarak kulaklarının arkasına yalnızca vehikül veya vehikülde 25 µL değişik konsantrasyonlarda sinnamik aldehid aldı. Tedavinin başlamasını izleyen 5 gün, bütün farelere PBS'de 20 µ Ci ³HTdR'den 250 µL intravenöz enjekte edildi. Beş saat sonra drene eden avriküler lenf nodları eksize edildi ve tek hücrelik bir süspansiyon hazırlandı. ³HTdR'in birleşmesi b-sintillasyon sayacı ile ölçüldü ve 7 ventrikül için stimülayon göstergesi (SI) ve her dördü fare gruplarından toplanan nodlar için ortalama dpm (dpm nod⁻¹) gösterildi. AOO, aseton: zeytin yağı; MEK, metil etil keton; DMF, dimetil formamid; PG, propilen glikol; DMSO, dimetil sülfoksit; EtOH/ddw (90:10); EtOH/ddw (50:50) # tekrarlanan çalışmalar.

Vehikül/konsantrasyon (%)	Sinnamik aldehid	
	dpm nod ⁻¹	SI
AOO	422	1
1.0	912	2.2
2.5	1632	3.9
5.0	1937	4.6
10.0	3190	7.6
25.0	2290	5.4
MEK	293	1
1.0	816	2.8
2.5	1823	6.2
5.0	2504	8.5
10.0	4287	14.6
25.0	3873	13.2
DMF	429/#426	1
0.1	#348	#0.8
0.25	#638	#1.5
0.5	#1319	#3.1
1.0	1899/#1970	4.4/#4.6
2.5	3582	8.3
5.0	3705	8.6
10.0	4575	10.7
25.0	4767	11.1
PG	233	1
1.0	491	2.1
2.5	1344	5.8
5.0	1899	8.2
10.0	3804	16.3
25.0	3965	17.0
DMSO	524/~882	1
0.1	~620	~0.7
0.25	~1465	~1.7
0.5	~2052	~2.3
1.0	2935/~2732	5.6/~3.1
2.5	4003	7.6
5.0	3989	7.6
10.0	4480	8.5
25.0	5898	11.3
EtOH/ddw (90:10)	293	1
1.0	792	2.7
2.5	1034	3.5
5.0	1414	4.8
10.0	1521	5.2
25.0	1694	5.8
EtOH/ddw (50:50)	238	1
1.0	492	2.1
2.5	2253	9.5
5.0	2454	10.3
10.0	3288	13.8
25.0	5223	21.9

Tablo 4. Dörder farelik gruplar, 3 gün arka arkaya günlük olarak kulaklarının arkasına yalnızca vehikül veya vehikülde 25 µL değişik konsantrasyonlarda dibromodisiyanobütan aldı. Tedavinin başlamasını izleyen 5 gün, bütün farelere PBS'de 20 µ Ci 3HTdR'den, 250 mL intravenöz enjekte edildi. Beş saat sonra drene eden avriküler lenf nodları eksize edildi ve tek hücrelik bir süspansiyon hazırlandı. 3HTdR'in birleşmesi β-sintillasyon sayacı ile ölçüldü ve 7 vehikül için stimülasyon göstergesi (Sİ) ve her dördü fare gruplarından toplanan nodlar için ortalama dpm (dpm nod⁻¹) gösterildi. AOO, aseton; zeytin yağı; MEK, metil etil keton; DMF, dimetil formamid; PG, propilen glikol; DMSO; dimetil sülfoksit; EtOH/ddw (90:10); EtOH/ddw (50:50) #^{1/2} tekrarlanan çalışmalar; nd-yapılmadı.

Vehikül/konsantrasyon (%)	Dibromodisiyanobütan	
	dpm nod ⁻¹	Sİ
AOO	422	1
1.0	734	1.7
2.5	1162	2.8
5.0	2981	7.1
10.0	1908	4.5
25.0	2283	5.4
MEK	293/#216	1
0.25	#372	#1.7
0.5	#980	#4.5
1.0	#797	#3.7
2.5	910	3.1
5.0	982	3.4
10.0	1649	5.6
25.0	2307	7.9
50.0	1891	6.5
DMF	429	1
1.0	877	2.0
5.0	973	2.3
10.0	2101	4.9
25.0	2552	5.9
50.0	2292	5.3
PG	nd	nd
2.5	nd	nd
5.0	nd	nd
10.0	nd	nd
25.0	nd	nd
50.0	nd	nd
DMSO	524/[1]882/[2]530	1
0.25	/[1]596/[2]590	/[1]0.7/[2]1.1
0.5	/[1]736/[2]1063	/[1]0.8/[2]2.0
1.0	1774/[1]1819/[2]1093	3.4/[1]0.9/[2]2.1
5.0	1003/[1]1909/[2]1910	1.9/[1]2.2/[2]3.6
10.0	1331/[1]1272/[2]1201	2.5/[1]1.4/[2]2.3
25.0	2151/[1]1420/[2]1435	4.1/[1]1.6/[2]2.7
50.0	2559/[2]1281	4.9/[2]2.4
EtOH/ddw (90:10)	293	1
0.5	455	1.6
1.0	866	3.0
2.5	1492	5.1
5.0	2132	7.3
7.5	3977	13.6
EtOH/ddw (50:50)	nd	nd
2.5	nd	nd
5.0	nd	nd
10.0	nd	nd
25.0	nd	nd
50.0	nd	nd

Tablo 5. EC3 değeri, 3'ün bir stimülasyon göstergesine neden olarak, doğrusal ara değeri bulmasıyla matematiksel olarak türetilen; gerekli kimyasal konsantrasyonudur. AOO, aseton; zeytin yağı; MEK, metil etil keton; DMF, dimetil forfamid; PG, propilen glikol; DMSO, dimetil sülfoksit; EtOH/ddw (90:10), etanol: su (90:10); EtOH/ddw (50:50), etanol: su (50:50). PG ve EtOH/ddw ile kombine DBDCB'nın EC3 değeri, eriyebilirlik (50:50) dağıtımlarına ve DMSO'daki DBDCB'nın EC3 değeri toksisiteye bağlı olarak belirlenemedi. n.d.= yapılmadı; n.a.= uygun değil; İE: izoöjenol; CA: sinnamik aldehyd; DMAPA= 3-dimetilpropilamin; DBDCB= dibromodisiyanobütan

Vehikül	EC3 Değeri (% v/v)			
	İE	CA	DMAPA	DBDCB
AOO	1.0	1.7	2.2	5.2
MEK	1.0	1.1	1.8	0.4
DMF	1.4	0.5	1.7	6.4
PG	2.5	1.4	>10	n.d.
DMSO	0.9	0.9	3.2	n.a.
EtOH/ddw (90:10)	1.8	1.6	4.1	1.0
EtOH/ddw (50:50)	4.9	1.2	7.1	n.d.

İsoöjenol: DMSO > AOO = MEK > DMF > EtOH/ddw (90:10) > PG > EtOH/ddw (50:50)

Sinamik Aldehyd: DMF > DMSO > MEK > EtOH/ddw (50:50) > PG > EtOH/ddw (90:10) > AOO

3-dimetilaminopropilamin: DMF > MEK > AOO > DMSO > EtOH/ddw (90:10) > EtOH/ddw (50:50) > PG

Dibromodisiyanobütan: MEK > ETOH/ddw (90:10) > AOO > DMF

Laboratuvar 1, sonuçlar tutarsız ve bir EC3 değerinin türetilmesi olarak dışı olduğundan, dibromodisiyanobütan/DMSO çalışmasını iki kere yineledi (Tablo 4, koyu yazılar). Bu sunulacak ve yüksek dozlardaki şüpheli toksisitesi doğrulanacak konsantrasyonların sıralanmasına yol açtı. İlk tekrarlanan çalışma %0.25, %0.5, %1.0, %5.0, %10.0 ve %25.0'lık konsantrasyonlarda gerçekleştirildi. Bütün SI değerleri negatif ama gözlenen lokal tahriş yoktu. Sonra test, %0.25, %0.5, %1.0, %5.0, %10.0, %25.0 ve %50.0'da

gerçekleştirildi. %5.0'da pozitif bir yanıt gözlenirken, bununla beraber lokal tahriş %5.0, %10.0, %25.0 ve %50.0'da açıkça belirlendi.

İlk veri grubundan bir EC3 değeri türetilmediğinden; MEK'teki dibromodisiyanobütanda %0.25, %0.5 ve %1.0'de yinelenildi. Pozitif bir lenfosit proliferatif yanıtı %0.5 ve %1.0'de açığa çıkarıldı. SI değerlerinde bazı dalgalanmalar gözlemlendi; bununla beraber, sonuçlar bir doz yanıtıyla uyumlu değildi ve önceki çalışmadan elde edilen sonuçlarla uyumluydu.

Laboratuvar 1, iki kimyasal/vehikül kombinasyonu için bir EC3 değerini çözmek amacıyla 2 diğer çalışmayı da yinelledi (Tablo 3, koyu resimler). DMF'deki sinnamik aldehyd, %0.1, %0.25, %0.5 ve %1.0'deki tekrar bir çalışmada analiz edildi ve %0.5 ve %1.0'lerde pozitif bir lenfosit proliferatif yanıt elde edildi. Sonuçlar, bir doz yanıtı ve ilk çalışmadaki sonuçlarla tutarlıydı. DMSO'daki sinnamik aldehyd %0.1, %0.25, %0.5 ve %1.0'da tekrarlandı ve pozitif bir lenfosit proliferatif yanıt %1.0'da açığa çıkarıldı. Yine, sonuçlar bir doz yanıtı ve önceki ilk çalışmadaki sonuçlarla tutarlıydı.

Tartışma

Otuzbeş yıldır, ciltle temas eden bir hassaslaştırıcı içeren vehikülün, allerjik kontakt dermatite neden olan bir derecede önemli bir etkisinin olabileceği bilinmektedir (15). Bununla beraber bilgilerimize göre, sadece insan deneme modellerinde (15,16) bu fenomen sınırlı yapılandırılmış araştırmalarla ele alınmış ve ginedomuzu kullanılarak sadece tek bir anlamlı çalışma yönetilmiştir (17). Bu incelemeler, risk değerlendirme amaçları için hassaslaştırıcı gücü yargılama aracını sağlamaktadır. Allerjik kontakt dermatitte klinik olarak uygun bir etkisi olan, içindeki ciltle temas eden kimyasalla matriksi öne sürmenin kullanışlı bulgu olması, ne büyük şanssızlıktır (18-20). Bu gereksinimi karşılamak için, relatif cilt hassaslaştırıcı gücün objektif ölçümüne izin veren LLNA'nın bir uygulamasını geliştirdik (6,8,13).

Şimdiki incelemelerde, dört bilinen insan kontakt allerjisi, bir sıra vehikül içinde gücün

türetilmesi amacıyla LLNA kullanılarak araştırıldı. Seçilen dört kimyasalın hepsi hergünkü şartlarda insan cildiyle temas ettiğinden cilt hassaslaştırma gücü üzerindeki etkilerinin anlamlılığı içinde uygundu. İzoöjenol ve sinnamik aldehyd, allerjik kontakt dermatite neden oluşturacak güzel kokulu kimyasallar olarak bilinmektedir (21). 3-dimetilaminopropilamin, örneğin kişisel bakım ürünlerinde (22) yaygın olarak kullanılan bir sürfaktan kokamidopropil betain (CAPD) bir cilt hassaslaştırıcı kirliliğidir, dibromodisiyanobütan ise örneğin kozmetiklerde ve ıslak tuvalet kağıdında koruyucu olarak kullanılan Euxyl K400'ün hassaslaştırıcı unsurudur (23). Son anlatılan kimyasal, giderek artan bir şekilde allerjik kontakt dermatit episodlarıyla beraber olmaktadır (24).

Burada sunulan veriler, vehikül seçiminin bu kimyasalların relatif cilt hassaslaştırıcı gücünü etkileyebileceğini, doğrulamaktadır. Aynı fenomen, 1,4-dihidrokuinon ve (kloro)-metilzotiazolinon (9,10) içeren diğer bilinen insan hassaslaştırıcı içinde rapor edilmiştir.

Hangi yollarla vehikül veya formül'ün cilt hassaslaştırıcı potansiyeli etkileyebileceği tam olarak tanımlanmamıştır. Teorikte, birçok uygun mekanizma vardır. Perkutan absorpsiyondaki değişikliklerin yokluğunda sodyum loril sülfatla (SLS), hassaslaştırıcı aktivitenin değiştirilebileceği deneysel incelemelerde gösterilmiş olmasına rağmen (25), vehikül matriksin, cilt geçirgenliğini ve/veya allerjenin lokalizasyonunu değiştirebileceği tahmin edilmiştir (15). Alternatif veya ek olarak, vehiküllerin, Langerhans hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlediği bilinen ve hassaslaştırmanın kazanılması için gerekli olan o epidermal sitokinlerin tanımlanması üzerinde farklı etkileri olabilir.

Bize yöneltilen bir soru, vehikülün özel bir kimyasal allerjen üzerindeki etkisinin önceden bilinip bilinemeyeceğidir, aslında önemli vehiküller her zaman daha güçlü hassaslaşmaya öncülük ederler (EC3 değerlerinden türetilmiş bir fonksiyon olarak belirtildiği gibi). İzoöjenol, sinnamik aldehyd ve dimetilaminopropilamin olgusunda, AOO, MEK, DMSO ve DMF genellikle en düşük EC3 değerleriyle beraberdir.

Tersine, PG ve etanol/su (50:50) özellikle dimetilaminopropilaminle yüksek EC3 değerleri vermiştir. İzoöjenol ve sinnamik aldehyd'in DMF ve DMSO'da test edilmesiyle elde edilen sonuçların araştırılması aydınlatıcıdır, ikisinin de EC3 değeri DMSO'da %0.9'dur ama DMF'de izoöjenol daha az güçlüyken (EC3 değeri genellikle ikiye katlanmıştır), sinnamik aldehyd daha güçlüdür (EC3 değeri yarılanmıştır). Açıkça bu, vehiküllerin etkileri hakkında genellemeler yapmakta karşı karşıya gelinecek gibi, bir zorluk endikasyonudur.

DMSO'daki dibromodisiyanobütan test edilmesinin, yinelenen çalışmalarındaki sonuçlar, bu vehiküldeki kimyasalın belirgin toksisitesini göstermektedir. Tahriş reaksiyonları (ödem ve eritem), 2. gündeki test kimyasalın topikal uygulanmasından önceki üst doz grubunda gözlenmiştir. Yeni kimyasalların test edilmesindeki standart işlem, temel olarak önceden tanımlanan standart panelden bir vehikülün seçimine dayanmaktadır (aseton: zeytin yağı (4:1), dimetil formamid, metiletilketon, polietilen glikol ve dimetil sülfoksit) (1). Bununla beraber DMSO'daki dibromodisiyanobütan için olan veriler, LLNA'daki test edilen herhangi bir kimyasal için vehikül matriksin dikkatli seçiminin önemini anlatmaktadır. Yalnızca erişebilirlik kritik bir faktör olarak kabul edilmez ama özel bir kimyasal/vehikül kombinasyonunun potansiyel toksik etkileriyle uzlaşmamış sonuçların sağlanmasını gerektirecek verilerin değerlendirilmesi ve herhangi bir lokal toksisiteyi ortaya çıkarmak için hayvanların dikkatli gözlenmesinde önemlidir. DMSO'daki dibromodisiyanobütan, kesin bir EC3 değerini önceden göstermeyi olanaksız kılacak, fare kulaklarının arkasında toksik bir reaksiyonu provoke etti. Böylece, dibromodisiyanobütan için bir EC3 değeri, MEK, EtOH (90:10), AOO veya DMF gibi farklı bir vehikül kullanılarak türetilenektir.

Şu andaki veri setinin ve önceden yayınlanan diğerlerinin gözden geçirilmesinden kaynaklanan, son bir nokta vardır (9,10). Çoksayıda toksikolog'un övgüye değer amacı, hayvanların

kullanılmasına gerek duymayan deneysel denemeler geliştirmektir. Bu denemeler ilk olarak riskin tanımlanmasına gereksinim duyarlar ama sonuçta bir risk tanımlandığında da güç üzerinde bilgi sağlanmasına gerek duyulabilir. Elbette, birçok maddeyle en azından belli bir dereceye kadar bir riskin sağlanması, cilt hassaslaştırılması için olgu olacaktır. LLNA ile sağlanan cilt hassaslaştırıcı kimyasallar üzerindeki relatif güç verisi, vehiküllerin etkisini oluşturabilecek kantitatif bilgiyle beraber, bu alanda gelecekteki in vitro alternatiflerin yararın değerlendirilmesine karşı yaşamsal bir kaynak oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kimber I and Basketter DA. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. *Fd Chem Toxicol* 1992; 30:165-9.
2. Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I and Loveless SE. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Fd Chem Toxicol* 1996; 34:985-97.
3. Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I, Dearman RJ, Lea LJ and Basketter DA. Local lymph node assay validation assessment for regulatory purposes. *Am J Cont Derm* 2000; 11:3-18.
4. NIH. The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. NIH Publication no. 99-4494. Internal NIH Publication, 1999.
5. ECVAM. Statement on the validity of the Local Lymph Node Assay for skin sensitisation testing. ECVAM Joint Research Centre, European Commission, Ispra, Italy, 21 March 2000, ATLA, in press, 2001.
6. Kimber I, and Basketter DA. Contact sensitization: a new approach to risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess* 1997; 3:385-95.
7. Dearman RJ, Hilton J, Evans P, Harvey P, Basketter DA and Kimber I. Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J Appl Toxicol* 1998; 18:281-4.
8. Basketter DA, Blaikie L, Dearman RJ and Rycroft RJG. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Cont Derm* 42, in press, 2000.
9. Lea LJ, Warbrick EV, Dearman RJ, Kimber I and Basketter DA. The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency of 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay. *Cont Derm* 1999; 10:213-8.
10. Warbrick EV, Dearman RJ, Basketter DA and Kimber I. Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisoithiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. *Cont Derm* 1999; 41:325-9.
11. Basketter DA. Skin sensitization: risk assessment. *Int J Cosmet Sci* 1998; 20:141-50.

12. Dearman RJ, Basketter DA and Kimber I. Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment. *J Appl Toxicol* 1999; 19:299-306.
13. Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ and Kimber IA. Comparison of statistical approaches to derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol* 1999; 19:261-6.
14. Kimber I, Hilton J, Dearman RJ and Hastings KL. Assessment of the skin sensitizing potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory trial. *J Toxicol Environ Health* 1998; 53:563-79.
15. Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay, (II). Factors influencing the induction and measurement of allergic contact dermatitis. *J Invest Derm* 1966; 47:375-92.
16. Marzulli FN and Maibach HI. Effects of vehicles and elicitation concentration in contact dermatitis testing. *Cont Derm* 1976; 2:325-9.
17. Magnusson B and Kligman AM. Allergic contact dermatitis in the guinea pig. Identification of contact allergens. Charles C. Thomas, Springfield, 1970.
18. Hjorth N and Thomsen K. Differences in sensitizing capacity of neomycin in creams and ointments. *Br J Dermatol* 1968; 80:163-9.
19. Ljunggren B and Moller H. Eczematous contact allergy to chlorhexidine. *Acta Dermato Venereol* 1972; 52:308-10.
20. Roevelde CG and van Ketel WG. Allergic reactions to a hair dye elicited by an ointment containing DMSO. *Cont Derm* 1975; 1:331.
21. Buckley DA, Wakelin SH, Seed PT, et al. The frequency of fragrance allergy in a patch-test population over a 17-year period. *Br J Dermatol* 2000; 142:279-83.
22. Angelini G, Foti C, Rigano L and Vena GA. 3-dimethylaminopropylamine: a key substance in contact allergy to cocamidopropylbetaine? *Contact Derm* 1995; 32(2):96-9.
23. Okkerse A, Geursen-Reitsma AM and van Joost, Th. Contact allergy to methyl-dibromoglutaronitrile and certain other preservatives. *Cont Derm* 1996; 34:151-2.
24. McFaaden JP, Ross JS, Jones AB, Rycroft RJ, Smith HR and White IR. Increased rate of patch test reactivity to methyl-dibromo glutaronitrile. *Cont Derm* 2000; 42:54-5.
25. Heylings JR, Clowes HM, Cumberbatch M, Dearman RJ, Fielding I, Hilton J and Kimber I. Sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene: influence of vehicle on absorption and lymph node activation. *Toxicology* 1996; 109:57-65.

**Orijinal İngilizce şeklinde Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.*

Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.