



İN VİTRO DERİ MODELLERİ

IN VITRO SKIN MODELS

Ömer YEDİKAYA , F. Ulya BADILLI * 

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Topikal veya sistemik etki sağlamak için deriye uygulanan formülasyonların tasarımında ve optimizasyonunda deri modellerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Etken maddelerin deriden penetrasyon / permeasyon çalışmalarında sıçan veya domuz derisi sıklıkla kullanılmakta ancak hayvan derisinden elde edilen sonuçların insan derisi ile uygunluğu sorgulanmaktadır. Diğer taraftan insan derisinin kullanımı ise, temininin genellikle zor olması ve etik kaygılar nedeniyle sınırlıdır. Bu durum, in vitro deriden permeasyon testlerinin önemini artırmaktadır. Bu derlemede, en sık kullanılan in vitro deri modellerinin avantajları ve dezavantajları vurgulanarak, bu modeller ile gerçekleştirilen güncel çalışmalar incelenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Yapay membranlar; tekrar üretilebilirlik, düşük maliyet, kullanım kolaylığı ve modifiye edilebilir olması gibi birçok avantajı sebebiyle insan ve hayvan derisi yerine tercih edilmektedir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin ise, veri tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, etik kurul izni gerekmemesi, deri metabolizmasının, deri korozyonunun ve fototoksisitenin değerlendirilebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin bütün bu avantajlarına ve geliştirilmesindeki önemli adımlara rağmen, etken maddelerin deriden absorpsiyonunun in vivo tahmini için insan veya hayvan derisinin yerini tamamen almaları henüz tam anlamıyla mümkün değildir. Yeniden yapılandırılmış deri modellerinin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerin başında, yüksek maliyet ve düşük bariyer fonksiyonları gelmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deriden penetrasyon / permeasyon çalışmaları, in vitro deri modelleri, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri, yapay deri modelleri

ABSTRACT

Objective: The use of skin models is of great importance in the design and optimization of formulations applied to the skin for topical or systemic effects. Although rat or pig skin is often used in skin penetration/permeation studies of active substances, the compatibility of results obtained from animal skin and human skin is questioned. On the other hand, the use of human skin is limited since it is difficult to attain and due to the ethical concerns. This situation increases the importance of in vitro skin permeation tests. In this review, the advantages and disadvantages of the most commonly used in vitro skin models were emphasized, and current studies performed with these models were reviewed.

* **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** F. Ulya Badilli
e-posta / e-mail: unuman@pharmacy.ankara.edu.tr, **Tel. / Phone:** +903122033150

Result and Discussion: *Artificial membranes are preferred over human and animal skin due to many advantages such as reproducibility, low cost, ease of use and able to modify. Reconstructed human skin equivalents have advantages such as high data repeatability, nonnecessity of ethics committee approval and availability for the evaluation of skin metabolism, corrosion and phototoxicity. Despite all these advantages of reconstructed human skin equivalents and important steps in their development, it is not yet entirely possible replacing human or animal skin completely for in vivo estimation of absorption of active ingredients through the skin. The most important factors limiting the use of reconstructed skin models are their high cost and low barrier functions.*

Keywords: *Artificial skin models, in vitro skin models, reconstructed human skin equivalents, skin penetration/permeation studies*

GİRİŞ

Çok sayıda etken / aktif madde, deride terapötik veya kozmetik etki oluşturmak amacıyla uygulanmaktadır. Deri, etken madde absorpsiyonu için kolayca erişilebilen bir yüzey alanı sunmaktadır. Ancak derinin sahip olduğu bariyer fonksiyonu, maddelerin deri yoluyla uygulanmasını sınırlandıran önemli bir faktördür [1].

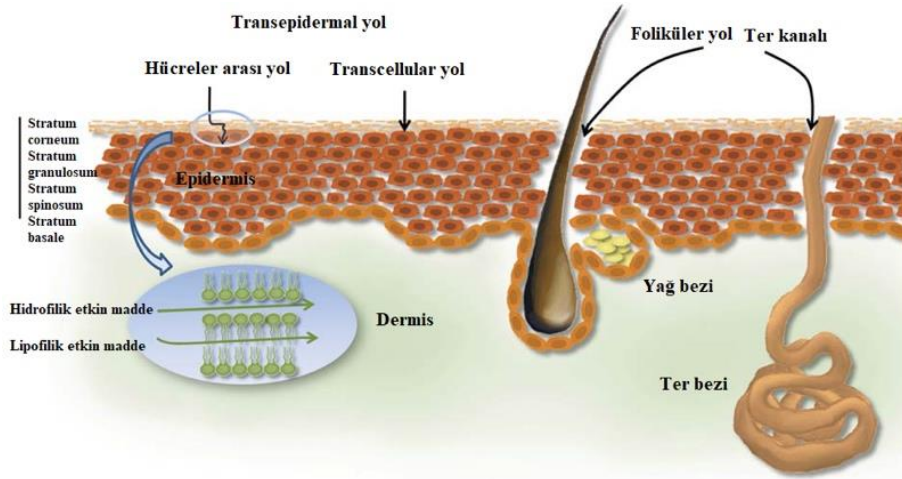
Topikal veya sistemik etki sağlamak için deriye uygulanan formülasyonların tasarımında ve optimizasyonunda, formülasyonun özelliklerini değerlendirebilmek için deri modellerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Etken madde penetrasyonuna katkıda bulunan kritik formülasyon özellikleri belirlendikten sonra formülasyonun optimizasyonu mümkün hale gelmektedir [2].

Eksizyonla elde edilen insan derisi, kimyasalların transdermal ve topikal verilmesini değerlendirmek için “altın standart” olarak kabul edilen dokudur [3]. Bununla birlikte, insan dokusunun temininin genellikle zor olması ve etik kaygılar, uygulamalarda birtakım kısıtlamalara neden olmaktadır. Ayrıca donörün cinsiyeti, ırkı, yaşı ve anatomik bölgesi ile ilgili varyasyonlar sonucu standardizasyonun düşük olması da önemli bir dezavantajdır [4]. Hayvan derisinin kullanımı, hem yeni etken maddelerin geliştirilmesinde hem de deriye uygulanmaya yönelik yeni ilaç formülasyonlarının tasarımında temel yaklaşım olmuştur [5]. Domuz derisi, insan derisine kıyasla daha düşük bariyer işlevine sahip olmasına rağmen insan derisinin permeabilitesini tahmin etmek için uygun bir doku olarak kabul edilmiştir [4, 6, 9]. Diğer taraftan literatürde, sıçan (rat) derisi kullanılarak penetrasyon / permeasyon incelemelerinin gerçekleştirildiği çok sayıda çalışmada da mevcuttur [10-14]. Hayvan derisi kullanımında sıklıkla karşılaşılan problemler arasında permeabilite, hücre tipi, lipid bileşimi ve organizasyonu ve diğer fizyolojik özellikler açısından insan derisine kıyasla farklılık göstermeleri sayılabilmektedir [15]. Diğer taraftan Avrupa Birliği, insan dokusu kullanarak finansal kazanç elde edilmesini ve 2009 yılından bu yana da, kozmetik ürünler için toksikolojik veri toplamak amacıyla hayvanların kullanılmasını yasaklamıştır [16]. Ayrıca 2018'de, Avrupa İlaç Ajansı'nın topikal ürünlerin kalitesi ve eşdeğerliği hakkındaki taslak kılavuzu, bitmiş bir topikal dozaj formunun performansını daha iyi anlamak ve karakterize etmek için sentetik membranların kullanılmasını önermektedir [17]. Bu durum, *in vitro* deriden penetrasyon / permeasyon testlerinin önemini büyük ölçüde artırmaktadır.

Deri ve Derinin Bariyer Özellikleri

Deri, insan vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sını oluşturur ve yetişkinlerde yaklaşık 2 m² yüzey alanına sahiptir [18]. Dış çevreye karşı fiziksel bir bariyer oluşturur, su, elektrolit ve ısı kaybını önleyerek homeostazı sağlar ve vücudu mikroorganizmalara, toksik ajanlara ve ultraviyole ışınlar karşı korur. Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç temel katmandan oluşur. Deri ekleri olarak tanımlanan saçlar, tırnaklar, yağ bezleri ve ter bezleri (apokrin ve ektrin bezler) deriden köken alır. Derinin kalınlığı bireyin yaşına ve anatomik bölgeye göre değişir [19, 20].

Derinin temel bariyer özelliği, en üst tabaka olan stratum korneum (SC)'dan ileri gelmektedir [21, 22] ancak bütün olarak epiderminin rolü ihmal edilmemelidir [23]. Deriden etken maddenin geçişi transepidermal yolla veya deri ekleri aracılığıyla gerçekleşebilmektedir (Şekil 1) [24, 25]. Etken maddeye ait fizikokimyasal parametreler (molekül ağırlığı, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve oktanol-su partisyon katsayısı gibi) maddenin deriye penetrasyon potansiyelini belirlemektedir [24]. Etken maddenin deriden penetrasyonu, doğru taşıyıcı seçimi ile artırılabilir. Taşıyıcı ve etken madde arasındaki etkileşimler, formülasyon geliştirme çalışmalarında oldukça önemli bir yere sahiptir [26].



Şekil 1. Transdermal geçiş yolları: transepidermal yol (hücreler arası ve transsellüler yol) ve diğer yollar (foliküler yol ve ter kanalı) [28]

Deriden geçiş pasif difüzyonla olmaktadır, bu nedenle *in vitro* deri modelleri bu süreci oldukça uygun bir şekilde taklit edebilmektedir. Ancak, herhangi bir modellemede taklit edilmesi oldukça zor olan özellik, özellikle epiderminin canlı kısımlarında meydana gelen ve hedeflenen sistemik etki için molekülün biyoyararlanımını önemli ölçüde azaltan metabolik faaliyetlerdir [27].

Deri Modelleri

In vitro deri modelleri, yapay deri modelleri ve yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılabilir.

Yapay Deri Modelleri

Etken madde permeasyonunu incelemek için basit ve tekrarlanabilir bir alternatif sunan yapay model membranlar, etkili bir formülasyon tasarımı ve optimum penetrasyon artırıcı seçimi için önemli olan taşıyıcı-membran etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla tercih edilmektedir [29, 30]. Yapay modellerin çoğu, sağlam bariyer özelliklerine sahip sağlıklı deriyi taklit etmek için kullanılır. Nispeten az sayıdaki yapay model, bütünlüğü bozulmuş deriyi taklit etme potansiyeli sunmaktadır [31]. İlk yapay modeller, deride bulunan lipit fazı yerine, filtre kağıdına izopropil miristat (IPM) emdirilmesi ile elde edilmiş membranlar olmuştur [32]. Deriden permeasyonu modellemek için kullanılan diğer lipitler, tetradekan, linoleik asit ve IPM içindeki fosfolipit dispersiyonlarını içermektedir [33]. *In vitro* permeasyon çalışmaları, poli (dimetilsiloksan) gibi polimerik membranlarla da gerçekleştirilmiştir [34, 35, 36]. Literatürde Franz difüzyon hücreleri ile sıklıkla kullanılan sentetik membranlar selüloz bazlı ve polimerik bazlı membranlar olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Selüloz bazlı membranlar selüloz asetat, selüloz nitrat ve rejenere selülozdan (Visking[®], Cuprophan[®], SpectraPor[®]) üretilmektedir. Polimer bazlı membranlardan en çok kullanılanları ise naylon, polisülfon (Tuffryn[®], Supor[®]) ve polikarbonat (Nuclepore[®], Cyclopore[®]) membranlardır. Bu membranlar genel olarak gözenekler içermeleri, kimyasal olarak nispeten inert ve çözücülerle büyük ölçüde geçimli olmaları ve ticari olarak temin edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptirler ve topikal ürünlerin kalite kontrolü için gerçekleştirilen *in vitro* salım deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [37, 38]. Bu sentetik membranlarla gerçekleştirilen çalışmalar, formülasyondaki etken maddenin termodinamik aktivitesini araştırmak için yararlıdır ancak, deri ile madde arasındaki spesifik etkileşimler hakkında fikir verme konusunda yetersiz kalmaktadır [8]. Son yıllarda, silikon membranlar gibi lipit esaslı olmayan modeller [29, 39-41] ve lipit esaslı modeller gibi çeşitli yaklaşımlar ile güvenilir deri modelleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Lipit Esaslı Olmayan Deri Modelleri

Silikon Model Membranlar

Poli(dimetilsiloksan) (PDMS) veya silikon membranlar, farklı taşıyıcıların (sıvağların) deriden etken madde penetrasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır [29]. 1970'de Nakano ve Patel, beş farklı merhem sıvağından salisilik asit salımını incelemek için silikon membranları kullanmış ve *in vitro* salım profillerinin, literatürde rapor edilen *in vivo* verilerle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir [42]. Dias ve ark. (2007), çok sayıda taşıyıcı (mineral yağ, IPM, oleik asit, dekanol, oktanol, butanol, etanol, propilen glikol, benzoik asit, gliserin, su ve bunların karışımları) kullanarak, kafein ve salisilik asidin permeasyonu üzerine bir çalışma yürütmüştür [34]. Bir diğer çalışmada, hem hidrofilik hem de lipofilik taşıyıcıların (su, etanol, propilen glikol, mineral yağ, Miglyol 812) ibuprofen penetrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir [43-44]. Oliveira ve ark. (2012), dermal formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan farklı taşıyıcıların (etanol, izopropil miristat, dimetil izosorbit, PEG 200 ve

PEG 400 ve Transcutol P) silikon model membranlar ile etkileşimlerini değerlendirmek için membran transport ve partiyon çalışmaları gerçekleştirmiştir [36].

Bu membranların, lipofilik bileşiklerin deriden geçişini tahmin etmek için kullanılabilceği ancak hidrofilik bileşikler için kullanımlarının çok uygun olmadığı önerilmiş ve modeli geliştirmek için PDMS ve PEG 6000 kopolimer emdirilmiş bir membran sistemi geliştirilmiştir. Bu geliştirilen model ile sadece sulu çözelti şeklindeki formülasyonlar test edilmiş ancak formülasyon geliştirmedeki potansiyeli henüz açıklığa kavuşturulamamıştır [46].

Strat-M

EMD Millipore tarafından ticari olarak piyasaya sürülen Strat-M[®], hem lipofilik hem de hidrofilik etken madde permeasyonunu öngörebilen sentetik bir membrandır [47]. Strat-M[®] membranları, insan epidermisine benzer yapısal ve kimyasal özellikleri taşımaktadır. İnsan derisinin çok katmanlı yapısını ve lipit organizasyonunu taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. Her Strat-M[®] membranın kalınlığı yaklaşık 300 µm'dir; tek bir poliolefin destek üzerinde iki tabaka poröz polieter sülfon ile desteklenen çok sıkı bir üst tabakadan oluşmaktadır. Membranın bu çok tabakalı yapısı, insan derisinin farklı katmanlarını (epidermis, dermis ve subkutan doku) taklit ederek, insan derisine benzer bir morfoloji elde edilmesine olanak tanımaktadır. Poröz membran, sentetik lipitlerin uygun bir karışımı ile muamele edilmiştir. Bu sentetik membran, insan SC'sinde bulunanlara benzer belirli oranlardaki lipitlerin (seramidler, kolesterol, serbest yağ asitleri ve diğer bileşenler) kombinasyonunu içermektedir [48, 49]. Strat-M[®] membranı, seriden seriye yüksek varyasyon, güvenlik ve depolama gibi dezavantajları ortadan kaldıran, insan derisinden difüzyonu tahmin etmeyi sağlayan sentetik bir polimerik membrandır [47].

Kaur ve ark. (2018), insan, sıçan ve domuz kulak derisi ile Strat-M[®] membran kullanarak yüksek molekül ağırlıklı bir etken madde olan amfoterisin B'yi içeren nanoformülasyonlar ile deriden permeasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Amfoterisin B'nin Strat-M[®] ile elde edilen permeasyon profillerinin insan derisine benzerliğinin sıçan ve domuz derisine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [50]. Bir başka çalışmada, rivastigmin içeren piyasa preparatından (Exelon[®] Patch) etken madde salımını değerlendirmek için farklı sentetik polimerik membranlar ve domuz kulak derisi kullanılarak Franz difüzyon hücresinde permeasyon çalışmaları yapılmıştır. Strat-M[®], domuz kulak derisine benzer bir rivastigmin permeasyon profili göstermiştir [51].

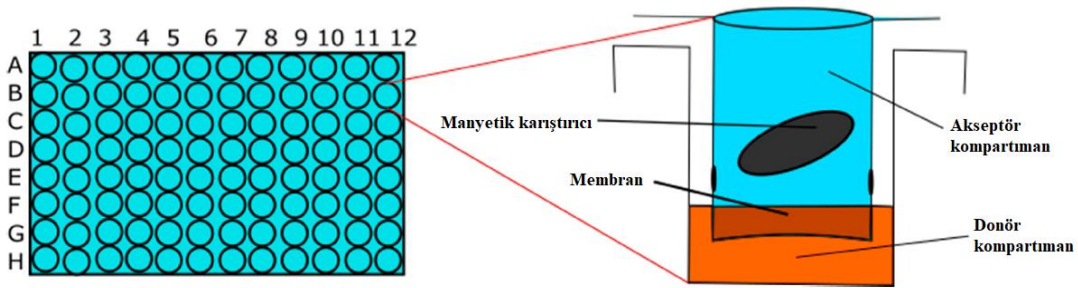
Haq ve ark. (2018), yaptıkları bir çalışmada, çeşitli penetrasyon arttırıcıların model bileşik olan nikotin deriden permeasyonunu nasıl etkilediğini değerlendirmişlerdir. Franz difüzyon hücresi yöntemiyle gerçekleştirdikleri çalışmada, insan kadavra derisi ve Strat-M[®] membranı ile elde edilen verilerin iyi bir korelasyon gösterdiği sonucuna varmışlardır [49]. Uchida ve ark. (2015), Strat-M[®]'i, insan ve hayvan derisine bir alternatif olarak kimyasal bileşiklerin deriden geçişlerini tahmin etmek üzere kullanmıştır. Strat-M[®], insan derisi ve tüysüz sıçan derisi kullanarak farklı molekül ağırlıklarına

ve oktanol/su partisyon katsayısına sahip on üç farklı bileşiğin permeasyon profillerini belirlemişlerdir. Çalışmada Strat-M® ile elde edilen sonuçların, insan derisi ve sıçan derisi ile elde edilenlere benzer olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar, Strat-M®'in permeasyon çalışmalarında hayvan veya insan derisine alternatif olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Daha tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar, kolay kullanılabilirlik ve insan derisine kıyasla daha düşük varyasyon gibi özellikleri, Strat-M®'in deriden permeasyon çalışmaları için iyi bir alternatif olabileceğini göstermektedir [52].

Lipit Esaslı Deri Modelleri

Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) Modeli

Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) modeli, Kansy ve ark. (1998) tarafından etken maddelerin membranlardan permeasyonunu incelemek için geliştirilmiştir [53]. Bu *in vitro* model, ilk olarak transselüler bağırsak permeabilitesinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Orijinal PAMPA modeli, donör ve akseptör bölmelerini ayıran bir membran bariyeri ile n-dodekan içinde çözülmüş fosfatidilkolin ile kaplanmış hidrofobik bir filtre içeren yapay bir membrandan oluşur ve bu yapay membranın bileşimi modifiye edilebilmektedir (Şekil 2). Ancak membrandaki lipit - çözücü karışımları iyi karakterize edilmemiştir ve biyolojik membranlarda bulunan lipit çift tabaka katmanlarından yoksundur [54]. PAMPA, gastrointestinal membrandan [55] ve kan beyin bariyerinden [56] etken madde geçişini incelemek için kullanılmıştır. PAMPA tekniğinin deriden geçişin tahmini için kullanımı, ilk olarak Ottaviani ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, insan derisinin bariyer özelliğini taklit etmek için kullanılan membranlar, IPM veya silikon yağı veya iki bileşenin karışımları ile oluşturulmuş filtrelerdir [41].



Şekil 2. Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) şematik gösterimi [57]

Sinko ve arkadaşları, SC'de bulunan doğal olarak bulunan seramidlerin sentetik analogları olan sertramidleri kullanarak, deri-PAMPA'yı geliştirmiştir [57, 58]. Sertramidler, daha uzun saklama süresine sahiptir ve doğal seramidlere kıyasla daha ucuz alternatiflerdir [59]. Sertramidler seramidlerden yapısal olarak farklı olmalarına rağmen, kıyaslanabilir molekül ağırlıkları ve hidrojen akseptör / donör

kapasiteleri nedeniyle, PAMPA sandviç membran modelinde kolesterol, stearik asit ve silikon yağı ile birlikte lipit bileşen olarak kullanılabilir [57, 58].

Deri-PAMPA ile test edilen çeşitli model etken maddelerin penetrasyon profilleri, farklı veri tabanlarındaki insan derisine ait penetrasyon verileri ile korele sonuçlar göstermiştir. Deri-PAMPA ve epidermis arasındaki korelasyon zayıf iken, deri-PAMPA ile tam kalınlıktaki deri arasında iyi bir korelasyon elde edilmiştir [58]. PAMPA modeli ile çözelti ve jel gibi farklı dozaj şekillerinden etken madde salımında gözlenebilen belirgin farklılıklar, diğer modellerde gözlenmemiştir [61, 61].

Karadzovska ve Riviere (2013) tarafından yapılan çalışmada, farklı etken maddelerin deriden penetrasyonu üzerine taşıyıcıların etkilerini değerlendirmek için deri-PAMPA, lipid esaslı olmayan deri-PAMPA ve Strat-M® membran kullanılmıştır. Elde edilen veriler, domuz derisi kullanılarak yapılan difüzyon hücresi verileriyle karşılaştırılmıştır. Bu üç membran içinde deri-PAMPA'nın SC'un lipit matrisini en iyi temsil eden model olduğu bildirilmiştir [62].

Tsinman ve Sinko (2013), ibuprofen içeren silikon bazlı anhidrid jel formülasyonu, silikon ve bir akrilik kopolimer içeren formülasyon ve ibuprofenin piyasa preparatını kullanarak deri-PAMPA'nın farklı topikal formülasyonlarının deriden penetrasyon profillerini ayırt edebilme yeteneğini değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçların, insan derisi ile elde edilen permeasyon verileri ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir [59].

Vizserálek ve ark. (2015), transdermal ve lokal etkili terapötik yamaları test etmek için orijinal deri-PAMPA yöntemini modifiye ederek kullanmışlardır. Yapılan çalışmada dört farklı etken maddenin (nikotin, fentanil, rivastigmin ve ketoprofen) transdermal ve lokal etkili yama formundaki piyasa preparatlarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, deri-PAMPA sisteminin transdermal terapötik sistemlerin gelişim sürecinde permeasyon çalışmaları için kullanılabilirliğini ifade etmişlerdir [60].

Zhang ve ark. (2019), niasinamidin deriden permeasyonunu tahmin etmek için deri-PAMPA modelinin uygunluğunu araştırmışlardır. Niasinamidin domuz derisi, insan derisi ve deri-PAMPA modeli ile elde edilen permeasyon profilleri, PAMPA'nın biyolojik dokulara kıyasla daha düşük bir bariyer fonksiyona sahip olduğunu ortaya koymuştur. Diğer taraftan, deri-PAMPA'nın deriden penetrasyonu tahmin potansiyelini tam olarak belirleyebilmek için, daha geniş bir etken madde yelpazesinin incelenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir [63].

Kerns ve ark. (2004), PAMPA ve tek tabakalı hücre (Caco-2 ve MDR1-MDCKII) yöntemlerini kullanarak bir grup bileşiğin permeasyon profillerini karşılaştırmışlardır. Etken maddelerin pasif difüzyon ile permeasyonunda, PAMPA ve tek tabakalı hücre yöntemlerinin arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. İki yöntemin özellikleri göz önüne alındığında, PAMPA ve Caco-2'nin etken madde permeasyonunun etkili ve hızlı bir şekilde araştırılması için sinerjik olarak uygulanabileceğini önermişlerdir [64].

Luo ve ark. (2016), insan ve domuz derisinin yanısıra PAMPA modeli ve silikon membran kullanarak *in vitro* permeasyon çalışması yapmışlardır. Ticari ibuprofen formülasyonlarının ve ibuprofen çözeltilerinin kullanıldığı çalışmalarda 6 saatin sonunda ibuprofen permeasyonunun PAMPA'da insan derisinden daha fazla olduğu görülmüştür. PAMPA ve silikon membrandan elde edilen sonuçların değişkenliğinin düşük olması, bu membranların özelliklerine atfedilmiştir. Domuz ve insan derisi ile elde edilen sonuçların, biyolojik membranların karmaşık yapısı nedeniyle daha değişken olduğu ifade edilmiştir [8].

Bu yönetime endüstrinin ilgisi, çoğunlukla yöntemin düşük maliyeti ve yüksek veriminden dolayı, son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. PAMPA'nın, önformülasyon çalışmalarında aday moleküllerin erken aşamada fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için iyi bir araç olduğunu gösteren birçok makale yayınlanmıştır [65].

Fosfolipit Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) Modeli

Fosfolipit Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) modeli, biyolojik membranlardan pasif difüzyon ile etken madde geçişini tahmin etme fırsatı sunan bir yöntemdir. Biyolojik membranları taklit eden bariyer, bir filtre desteği üzerinde çok sıkı ve yoğun bir lipozom tabakasından oluşmaktadır. Orijinal PVPA, bağırsak geçirgenliğinin değerlendirilmesi için geliştirilen bir modeldir [66]. Şekil 3'de gösterildiği gibi bariyerde hem daha küçük tek katmanlı ve daha büyük çok katmanlı yapıların bulunduğu PVPA modelinin, yüksek verimli bir model olarak çalışma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [67]. Kullanılan lipozomların bileşimi, çeşitli absorpsiyon bölgelerindeki bariyerleri taklit edecek şekilde ayarlanabilir.

Son zamanlarda, derinin SC bariyerini taklit eden yeni bir PVPA modeli geliştirilmiştir. Orijinal PVPA modeli üzerinde, deriden etken madde penetrasyonu tahmininde kullanılmak üzere modifikasyon yapılmıştır. Modifikasyonla hazırlanan modeller, kolesterol ve yumurta fosfatidilkolinden yapılmış lipozomlar kullanılarak hazırlanan PVPA_c ve deride bulunan ana lipit sınıfları (seramid, kolesterol, serbest yağ asidi ve kolesteril sülfat ve yumurta fosfatidilkolin) kullanılarak hazırlanan PVPA_s'tir (Şekil 3). İki PVPA deri modelinde altı bileşiğin (flufenamik asit, ibuprofen, indometazin, salisilik asit, kalsein ve FITC-dekstran) permeasyon profili değerlendirilmiştir. Permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçların, bir değer dışında, hayvan derisi penetrasyon deneylerinden elde edilen verilerle uyumlu olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, PVPA modelinin bariyer fonksiyonunun kontrollü bir şekilde modifiye edilebildiği ve hazırlama koşulları değiştirilerek, potansiyel olarak farklı derecelerde bozulmuş deriyi temsil eden farklı sızıntı derecelerine sahip lipit esaslı bariyerlerin tekrarlanabilir şekilde hazırlanabildiği ifade edilmiştir [68].

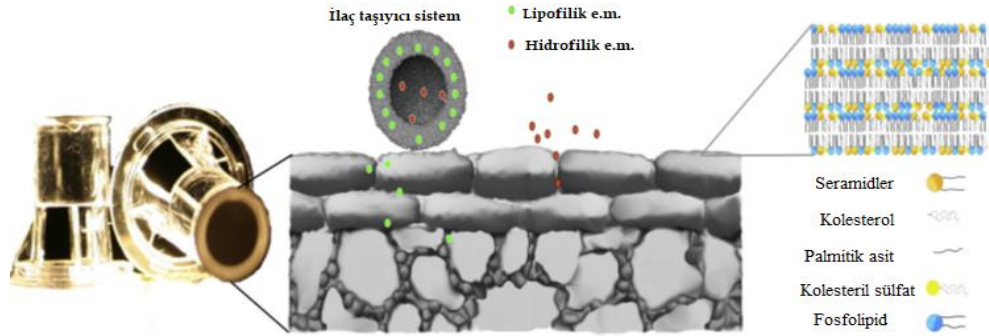
Bir başka çalışmada, lipozom formülasyonlarının diklofenak sodyumun deriden penetrasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için SC'yi taklit eden PVPA modeli kullanılmıştır. Diklofenak sodyum içeren geleneksel, deforme olabilen ve propilen glikol içeren lipozomların PVPA modelinden

permeasyonları incelenmiştir. PVPA_s ile yapılan permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar ile, etken madde permeasyonunun lipit bileşiminden etkilendiği ve lipozomlar içerisindeki penetrasyon arttırıcılar ve kenar aktivatörlerinin varlığında beklendiği gibi arttığı gösterilmiştir [69].

Shakel ve ark. (2019), insan SC tabakasına yakın bir lipit bileşimine sahip PVPA bariyeri (PVPAsc) hazırlayarak kalsein permeasyonunu incelemişlerdir. Elde edilen verilerin, domuz kulağı modeli ile iyi bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yeni PVPAsc modelinin -20 °C'de 2 haftaya kadar saklanabildiğini, pH 2.0 ila 8.0 aralığında ve DMSO, oleik asit ve Cremophor® gibi çözücülerin varlığında bütünlüğünü kaybetmeden kalabildiğini rapor etmişlerdir [70].

Moniz ve ark. (2020), nanopartiküllere yüklenmiş olan siklosporin A'nın deriden permeasyonunu incelemek amacıyla SC'un lipit yapısını taklit eden PVPAsc modelinin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. PVPAsc modelinin kullanım kolaylığı, tekrarlanabilirlik, uygun maliyet, nanopartiküllere yüklü halde bulunan etken maddenin permeasyonundaki farklılıkları tayin edebilme kapasitesi ve hayvan kullanımının azaltılmasını sağlaması gibi önemli avantajlar sunduğunu bildirmişlerdir [71].

Özetlenecek olursa deriyi taklit etmek amacıyla geliştirilen PVPA bariyerleri, farklı derecelerde lipofilisiteye ve penetrasyon potansiyeline sahip bileşiklerin permeasyonunun ve çeşitli penetrasyon arttırıcıların etkinliğinin değerlendirilmesi için kapsamlı olarak kullanılmaktadır [72]. Deri PVPA modellerinin, kullanım kolaylığı, verimlilik, maliyet ve uzun süreli saklama potansiyeli gibi özellikleri nedeniyle, erken ilaç geliştirme aşamasında önemli avantajlar sağladığı önerilmektedir [68].



Şekil 3. Stratum corneum'u taklit eden Fosfolipid Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) modeli, bir selüloz ester filtre desteği üzerine lipozomların yerleştirilmesiyle elde edilen sıkı bir bariyerden oluşur [2].

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Derisi Eşdeğerleri

Son yıllarda, etken maddelerin deriden permeasyon özelliklerinin incelenmesi amacıyla çeşitli doku kültürü temelli insan derisi modelleri geliştirilmiş ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür [28].

Deriyi temsil eden ilk modeller, kutanöz iritasyon çalışmaları için tasarlanmıştır. Bu modellerde normal insan keratinositleri (NİK'leri), de-epidermize edilmiş dermiste büyütülmüştür [74]. Sonraki yıllarda destekleyici membranlar üzerinde NİK'lerinin büyütülmesiyle, yeniden yapılandırılmış insan epidermisi modellerinin gelişimi hız kazanmıştır [28]. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelleri (örn. EpiSkin[®], SkinEthic[®], EpiDerm[®], LabSkin[®]) ve canlı deri eşdeğeri modelleri (GraftSkin[®], EpiDermFT[®], Pheninon[®]) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu modeller, doku kültürü olarak üretilen insan hücreleri ve normalde deride bulunan matris eşdeğerlerinden oluşmaktadır [75, 76]. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis modelleri, fototoksiste, korozivite ve iritasyon testlerinin yanı sıra permeasyon çalışmalarında da kullanılan faydalı araçlardır. Bu modeller aynı zamanda taşıyıcı bileşenlerinin optimizasyonu ve formülasyon tasarımında da kullanılmaktadır [28].

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis Eşdeğeri Modelleri

Günümüzde, birçok yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modeli ticari olarak mevcuttur. Bunlar ilaç ve kozmetik endüstrisinde hayvan derilerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu modellerin bazıları iyi karakterize edilmiştir, morfolojik özellikleri ve epidermal lipit bileşimi açısından *ex vivo* insan derisi ile karşılaştırılmıştır [77]. Morfolojik olarak insan derisine benzer olmalarına rağmen, lipit organizasyonları normal deriden biraz farklıdır. İnsan derisinden farklı olarak, bu modeller kan damarları, kıl kökleri veya ter bezleri gibi yapılar içermemektedir. Bu nedenle, penetrasyon yolları sadece hücreler arası (interselüler) ve hücre içi (transselüler) yol ile sınırlıdır [28]. Piyasada bulunan üç model SkinEthic[®] (SkinEthic Laboratories, Nice, Fransa), EpiDerm[®] (MatTek Corporation, Ashland, MA, ABD) ve EpiSkin[®] (L'Ore'al, Paris, Fransa) (Şekil 4) deriden absorpsiyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [76].

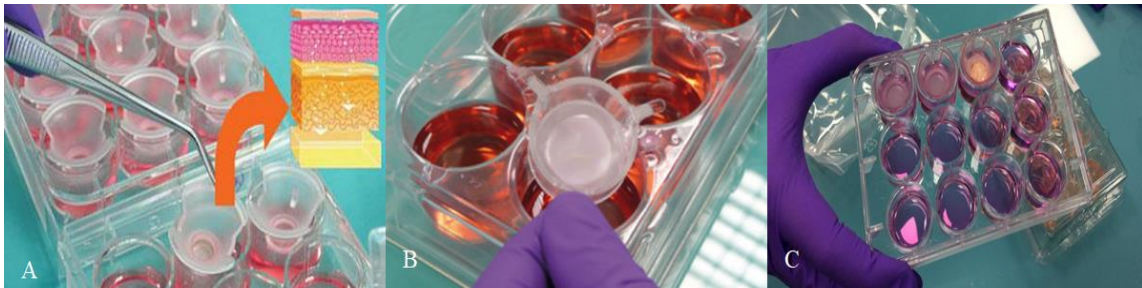
Ex vivo insan derisi modelleri ile karşılaştırıldığında, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğerleri önemli ölçüde daha geçirgendir ancak permeabilite açısından oldukça değişken olan insan derisine kıyasla daha tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir [76, 80]. Deri modelleri ile elde edilen verilerin tekrarlanabilir olması çok önemli bir avantajdır. Genel olarak, yeniden yapılandırılmış epidermis eşdeğeri modelleri kullanılarak yapılan permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçlardaki vasyasyon, domuz derisi ve *ex vivo* insan derisi ile yapılan deneylere kıyasla daha düşüktür [81, 82]. Bu modellerin en önemli dezavantajları ise oldukça yüksek maliyetleridir [2].

Dreher ve ark. (2002), s/y emülsiyonu, y/s emülsiyonu, lipozomal dispersiyonu ve hidrojel gibi çeşitli taşıyıcı sistemler içine yüklenen kafein ve alfa-tokoferolün deriden permeasyonunu EpiDerm[®] ve EpiSkin[®] modellerini kullanılarak değerlendirmişler ve sonuçları *ex vivo* insan derisi ile kıyaslamışlardır. Birbirinden oldukça farklı fizikokimyasal özelliklere sahip iki etken maddenin permeasyon özelliklerinin, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelleri ile doğru bir şekilde tahmin edilebildiğini ifade etmişlerdir [83]. Labouta ve ark. (2013), bu modellerin

nanopartiküllerin davranışını belirlemek ve insan derisine penetrasyon davranışlarını incelemek için uygun olabileceğini bildirmiştir [84]. Schäfer-Korting ve ark. (2008), EpiSkin[®], SkinEthic[®] ve EpiDerm[®] modellerinin, deriden etken madde penetrasyon – permeasyon çalışmalarında kullanmak için insan ve domuz derisine uygun alternatifler olduğu sonucuna varmışlardır. Bu modeller ve domuz derisi ile elde edilen permeasyon verilerinin, insan derisinden permeasyon sonuçlarını yansıttığını belirtmişlerdir [81].

Lotte ve ark. (2002) EpiDerm[®], EpiSkin[®] ve SkinEthic[®]'in seri içi ve seriler arası tekrar üretilebilirliğini araştırmışlardır. Bu amaçla, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip üç bileşiğin (laurik asit, mannitol ve kafein) deriden permeasyonunu bu deri modelleri ile incelemişlerdir. Bütün deri modelleri için, seri içi tekrar üretilebilirlik seriler arası tekrar üretilebilirlikten daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, değerlendirilen üç bileşiğin deriden permeasyon sonuçları, *ex vivo* insan derisi ile beklendiği şekilde elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu deri modellerinin perkütan absorpsiyonu değerlendirmek için umut verici olduğu ifade edilmiştir [85].

Deri modellerinin sadece deriden permeasyon ve penetrasyonu değil, metabolizasyona uğrayan etken maddeler için özellikle önem taşıyan ilaç metabolizmasını da tahmin etmesi önemlidir [86]. 1999 yılında yapılan bir çalışmada iki topikal glukokortikoid olan prednikarbat ve betametazon 17-valeratın penetrasyonu ve metabolizasyonu SkinEthic[®] modeli ile incelenmiştir. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelindeki esteraz aktivitesinin insan derisi ile korele olduğu ve glukokortikoidlerin metabolizasyonunun SkinEthic[®] modelinde iyi bir şekilde yansıtıldığı gösterilmiştir [80]. Mahmoud ve ark. (2005), SkinEthic[®] modelinde östradiol metabolizmasını araştırmışlar ve 17b-estradiolün, 17b-hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi ile estrona metabolize edilmesinin insan derisine benzer şekilde olduğunu bulmuşlardır [88]. Testosteronun metabolizasyonu da yeniden yapılandırılmış epidermal bir model üzerinde araştırılmış ve normal insan derisinde olduğu gibi polar ve polar olmayan metabolitler rapor edilmiştir [89].



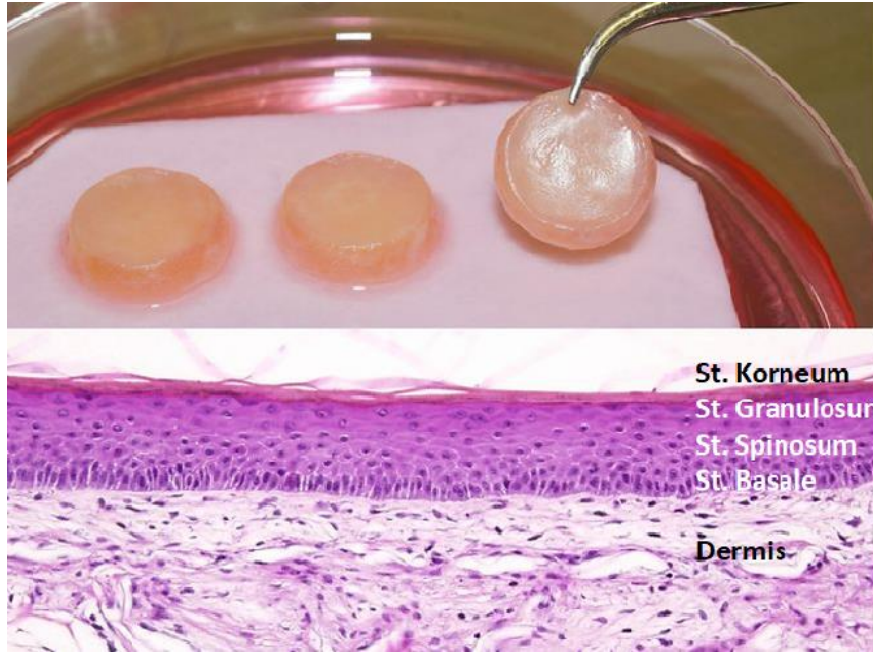
Şekil 4. EpiSkin[®] (A), SkinEthic[®] (B) ve EpiDerm[®] (C) modellerine ait görüntüler [71,72]

Çoğu araştırmacı, yeniden yapılandırılmış deri modellerinin, metabolizasyonun etken madde penetrasyonuna etkisini yeterince temsil eden uygun modeller olduğu sonucuna varmıştır.

Canlı Deri Eşdeğeri Modelleri

Canlı deri eşdeğeri modelleri, genellikle epidermis ve dermisten tabakalarından oluşur [90]. Bu modeller, keratinositler ve fibroblastlardan oluşur; bir epidermis ile insan derisi özelliklerine çok yakın morfoloji ve doku işlevselliği gösteren bir dermise sahiptir [91].

Canlı deri eşdeğeri modelleri; Phenion® *Full Thickness* Modeli (Şekil 5) (Phenion, Düsseldorf, Almanya); GraftSkin® (Apligraf; Organogenesis, MI, ABD); EpiDermFT® (MatTek Corporation, Ashland, MA, ABD) ve Vitrolife-Skin™ modeli (Kyoto, Japonya) ticari olarak piyasada bulunmaktadır [93]. Bu modeller daha çok yanık ve yaralanmalarda derinin yerini tutan (replacement) doku olarak kullanılırken, fototoksosite, korozivite ve deri iritasyon testleri ve transdermal permeasyon çalışmaları gibi alanlarda da değerlendirilmektedir [94]. Bu modeller *in vivo* koşullara daha iyi uyum göstermektedir.



Şekil 5. Phenion® *Full Thickness* modeline ait makroskobik ve histolojik görüntü [92]

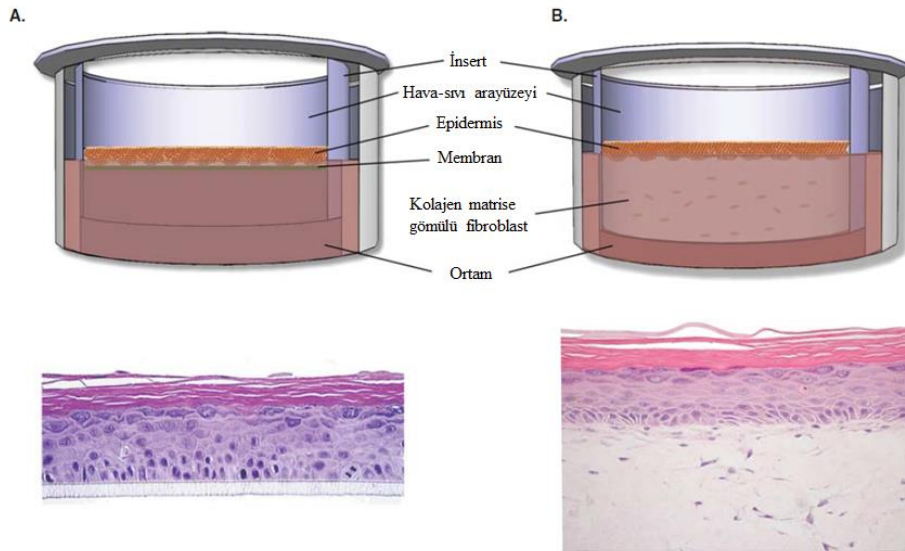
Phenion® FT modelinin bariyer fonksiyonu, dört bileşiğin permeasyonları ve gecikme süreleri incelenerek diğer deri modelleri ve domuz derisi ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Phenion® FT modelinin, EpiDerm®, SkinEthic® ve EpiSkin®'e kıyasla benzoik asit, nikotin ve kafeine karşı biraz daha zayıf bir bariyer fonksiyonuna sahip olduğunu gösterirken, yüksek oranda lipofilik bir bileşik olan testosteronun permeasyonu bu spesifik modelde daha etkili bir şekilde gecikmiştir [81].

Özetlenecek olursa, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin insan derisi ve hayvan derisi için iyi alternatifler olabilmesini sağlayan avantajları şu şekilde sıralanabilir [28].

- Kullanıma hazır modellerdir, çok sayıda etken maddenin permeasyonunun kolay ve hızlı bir şekilde incelenmesini sağlamaktadır.

- Veri tekrarlanabilirliği yüksektir.
- Gecikme süresi kısa ve sabit olduğundan deneylerin 6 - 8 saat içinde gerçekleştirilmesine imkân verir. Sonsuz ve sonlu dozların test edilmesi mümkündür.
- Deri metabolizmasının değerlendirilmesinde kullanılabilir.
- Etkin maddelerin deriden penetrasyon / permeasyon davranışı üzerine ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisini incelemeye olanak sağlar.

Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin bütün bu avantajlarına ve geliştirilmesindeki önemli adımlara rağmen, etkin maddelerin deriden absorpsiyonunun *in vivo* tahmini için insan veya hayvan derisinin yerini tamamen almaları henüz tam anlamıyla mümkün değildir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerin başında maliyet gelmektedir. Ticari yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin kullanıldığı permeasyon çalışmaları, tüysüz SKH-1 fareleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalardan en az iki kat daha maliyetlidir. Benzer şekilde, domuz derisi veya eksize edilmiş insan derisi yerine yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modelleri kullanıldığında da, araştırma giderleri çok daha yüksek olmaktadır. Domuz derisinin mezbahalardan elde edilebilir olması ve insan derisinin de maliyetsiz olması avantaj iken, her zaman kolayca bulunabilir olmaması da önemli bir sorundur. Diğer taraftan, insan veya hayvan derisi ile çalışmak için etik kurul onayı alınması gereklidir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modelleri kullanılırken etik kurul izninin gerekmemesi de oldukça önemli bir avantajdır [28].



Şekil 6. (A) Epidermis ve (B) canlı deri eşdeğeri (tam kalınlıkta yeniden yapılandırılmış) modellerinin gösterimi ve histolojik görüntüleri [77,78]

Sonuç olarak, incelenen *in vitro* modellerin ve insan derisinin avantajları ve sınırlamaları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Topikal formülasyonların optimizasyonu için kullanılan farklı deri modellerinin avantajları ve sınırlamaları [2,95].

Deri Modeli	Avantajları	Sınırlamalar
Silikon model membranlar	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Düşük maliyet Uzun süreli depolama	Lipit esaslı değil SC'ye düşük benzerlik Biyolojik kökenli değil
PAMPA	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Uzun süreli depolama Düşük maliyet	Sentetik lipitler / lipit esaslı değil Lipit organizasyonu karakterize edilmemiş / SC'ye düşük benzerlik Biyolojik kökenli değil
PVPA	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Lipit bileşimi kolayca modifiye edilebilir Nispeten düşük maliyet Uzun süreli depolama	Lipid organizasyonu karakterize edilmemiş Biyolojik kökenli değil
Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri	İnsan derisine kıyasla permeasyon verilerinde tutarlılık	İnsan derisine kıyasla yüksek geçirgenlik Tartışmaya açık bariyer işlevi Yüksek maliyet
İnsan derisi	Altın standart model	Etik izinler Domuz kulağı derisine göre daha yüksek değişkenlik Farklı kaynaklar, yaş, cinsiyet, ırk, plastik cerrahi, amputasyon, kadavra Farklı anatomik kısımlar: abdominal, göğüs, sırt vb. Depolama zorluğu

SONUÇ VE TARTIŞMA

Moleküllerin deriden permeasyonunun belirlenmesi, dermal veya transdermal taşıyıcı sistemlerin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Deriye uygulanması amaçlanan farmasötik ve kozmetik formülasyonların penetrasyon çalışmalarında, "altın standart" olarak kabul edilmesine rağmen, insan derisinin kullanımı her zaman mümkün olamamaktadır. İnsan derisinin her zaman ulaşılabilir olması genellikle zordur ve etik kaygılardan dolayı uygulamalarda birtakım kısıtlamaları içerir. Diğer taraftan, deney hayvanlarının kullanımında karşılaşılan bazı kısıtlayıcı faktörler de bulunmaktadır. Bu durum, alternatif *in vitro* deriden permeasyon modellerinin geliştirilmesi ve bu konuda yapılan çalışmaların artması sonucunu doğurmuştur.

Yapay membranlar; tekrar üretilebilirlik, düşük maliyet, kullanım kolaylığı, saklama koşulları ve modifiye edilebilir olması gibi birçok avantajı sebebiyle insan ve hayvan derisi yerine tercih edilmektedir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri ise; kullanıma hazır modeller olmaları,

yüksek veri tekrarlanabilirliğinin olması, etik kurul izni gerekmemesi ve deri metabolizmasının, deri korozyonunun ve fototoksitenin değerlendirilmesinde kullanılabilir olmaları gibi avantajları nedeniyle önemli hayvan derisi alternatifleri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin, düşük bariyer fonksiyonları ve yüksek maliyetleri nedeniyle, permeasyon çalışmalarında hayvan veya insan derisinin yerini tamamen alıp alamayacağı halen tartışmalıdır. Standart hale getirilmesi kolay, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip, ilaç keşfinin erken aşamalarında ve kozmetik araştırmalarda deriden etken madde penetrasyonunu tahmin etmeye yönelik ve geleneksel yaklaşımlara alternatif olabilecek *in vitro* deri modellerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *F.U.B.*, *Ö.Y.*; Tasarım: *F.U.B.*; Denetim: *F.U.B.*; Kaynaklar: *F.U.B.*, *Ö.Y.*; Malzemeler: *Ö.Y.*, *F.U.B.*; Veri Toplama ve/veya işleme: *Ö.Y.*, *F.U.B.*; Analiz ve/veya yorumlama: *F.U.B.*, *Ö.Y.*; Literatür taraması: *Ö.Y.*, *F.U.B.*; Makalenin yazılması: *Ö.Y.*, *F.U.B.*; Kritik inceleme: *F.U.B.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Lam, P.L., Gambari, R., (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies: *in vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release*, 178, 25–45. [CrossRef]
2. Flaten, G. E., Palac, Z., Engesland, A., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., Škalko-Basnet, N. (2015). *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10-24. [CrossRef]
3. Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195. [CrossRef]
4. Barbero, A. M., Frasc, H. F. (2009). Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. *Toxicology In Vitro*, 23(1), 1-13. [CrossRef]
5. Semlin, L., Schäfer-Korting, M., Borelli, C., Korting, H. C. (2011). *In vitro* models for human skin disease. *Drug Discovery Today*, 16(3-4), 132-139. [CrossRef]

6. Schmoock, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 215, 51–56. [CrossRef]
7. Vallet, V., Cruz, C., Josse, D., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., (2007). *In vitro* percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and splitthickness pig and human skin. *Toxicology In Vitro*, 21, 1182–1190. [CrossRef]
8. Luo, L., Patel, A., Sinko, B., Bell, M., Wibawa, J., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2016). A comparative study of the *in vitro* permeation of ibuprofen in mammalian skin, the PAMPA model and silicone membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, 505, 14–19. [CrossRef]
9. Yoshimatsu, H., Ishii, K., Konno, Y., Satsukawa, M., Yamashita, S. (2017). Prediction of human percutaneous absorption from *in vitro* and *in vivo* animal experiments. *International Journal of Pharmaceutics*, 534, 348–355. [CrossRef]
10. Badıllı, U., Tuba Şengel-Türk, C., Amasya, G., Tarımcı, N. (2017). Novel drug delivery system for dermal uptake of etofenamate: Semisolid SLN dispersion. *Current Drug Delivery*, 14(3), 386-393. [CrossRef]
11. Gümüştas, M., Tuba Şengel-Türk, C., Badıllı, U., Amasya, G., Özkan, S. A., Tarımcı, N. (2017). Optimization of stability indicating LC method for the sensitive in vitro determination from Solid Lipid Nanoparticles and ex vivo analysis from rat skin of etofenamate. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 63-71. [CrossRef]
12. Amasya, G., Gümüştas, M., Badıllı, U., Özkan, S. A., Tarımcı, N. (2018). Development of a HILIC method for the determination of 5-fluorouracil from nano drug delivery systems and rat skin extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 285-293. [CrossRef]
13. Amasya, G., Aksu, B., Badıllı, U., Onay-Beşikçi, A., Tarımcı, N. (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 563, 110-121. [CrossRef]
14. Kumar, P., Singh, S. K., Mishra, D. N., Girotra, P. (2015). Enhancement of ketorolac tromethamine permeability through rat skin using penetration enhancers: An ex-vivo study. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(3), 142. [CrossRef]
15. MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880. [CrossRef]
16. European Commission. (2003). Draft of technical guidance document. 2nd ed. European Chemicals Bureau
17. EMA-CHMP. Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products. European Medicines Agency; Amsterdam, The Netherlands: (2018). s. 1–36. Erişim: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-equivalence-topical-products_en.pdf. Erişim Tarihi: 12.03.2021

18. Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
19. Montagna W, Parakkal PF. (2012) The Structure and Function of Skin. 3rd ed. New York: Academic Press
20. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA, Walters KA. (2002). Skin transport. In: Walters KA, Editor. *Dermatological and Transdermal Formulations*, (pp. 89–196). New York: Marcel Dekker.
21. Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30, 257–262. [\[CrossRef\]](#)
22. Menon, G.K., Cleary, G.W., Lane, M.E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435, 3–9. [\[CrossRef\]](#)
23. Andrews, S.N., Jeong, E., Prausnitz, M.R. (2013). Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharmaceutical Research*, 30, 1099–1109. [\[CrossRef\]](#)
24. Bolzinger, M.-A., Briçon, S., Pelletier, J., Chevalier, Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex-rate controlling membrane. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17, 156–165. [\[CrossRef\]](#)
25. Schaefer, U.F., Hansen, S., Schneider, M., Luengo Contreras, J., Lehr, C.M. (2008). Models for skin absorption and skin toxicity testing. In: Kim, K., Ehrhardt, K.-J. (Eds.), *Drug Absorption Studies*, (pp. 3–33). New York: Springer.
26. Chittenden, J.T., Brooks, J.D., Riviere, J.E. (2014). Development of a mixed-effect pharmacokinetic model for vehicle modulated *in vitro* transdermal flux of topically applied penetrants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 1002–1012. [\[CrossRef\]](#)
27. Souto, E.B. (2005). PhD Thesis. SLN and NLC for Topical Delivery of Antifungals. Institut of Pharmacy, Freie Universität, Berlin.
28. Van Gele, M., Geusens, B., Brochez, L., Speckaert, R., Lambert, J. (2011). Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(6), 705-720. [\[CrossRef\]](#)
29. Oliveira, G., Beezer, A.E., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2011). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning. *International Journal of Pharmaceutics*, 420, 216–222. [\[CrossRef\]](#)
30. Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M. E. (2012). The influence of volatile solvents on transport across model membranes and human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 38-49. [\[CrossRef\]](#)
31. de Jager, M., Groenink, W., Bielsa, I., Guivernau, R., Andersson, E., Angelova, N., Ponc, M., Bouwstra, J. (2006). A novel *in vitro* percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharmaceutical Research*, 23, 951–960. [\[CrossRef\]](#)

32. Albery, W.J., Burke, J.F., Leffler, E.B., Hadgraft, J. (1976). Interfacial transfer studied with a rotating diffusion cell. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1* 72, 1618–1626. 27 Nisan 2021’de alındı, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1976/F1/F19767201618>
33. Guy, R.H., Fleming, R. (1979). The estimation of diffusion coefficients using the rotating diffusion cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 3, 143–149. [\[CrossRef\]](#)
34. Dias, M., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2007). Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(1), 108–114. [\[CrossRef\]](#)
35. Santos, P., Machado, M., Watkinson, A.C., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2009). The effect of drug concentration on solvent activity in silicone membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1–2), 70–75. [\[CrossRef\]](#)
36. Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2012). The role of vehicle interactions on permeation of an active through model membranes and human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 536–545. [\[CrossRef\]](#)
37. Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Eccleston, G. M. (2012). The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Archives of Pharmacal Research*, 35(4), 579-593. [\[CrossRef\]](#)
38. Ng, S. F., Rouse, J., Sanderson, D., Eccleston, G. (2010). A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using Franz diffusion cells. *Pharmaceutics*, 2(2), 209-223. [\[CrossRef\]](#)
39. Loftsson, T., Konradsdottir, F., Masson, M. (2006). Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *International Journal of Pharmaceutics*, 326, 60–68. [\[CrossRef\]](#)
40. Oliveira, G., Beezer, A.E., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2010). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 393, 61–67. [\[CrossRef\]](#)
41. Ottaviani, G., Martel, S., Carrupt, P.A. (2006). Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 3948–3954. [\[CrossRef\]](#)
42. Nakano, M., Patel, N. K. (1970). Release, uptake, and permeation behavior of salicylic acid in ointment bases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(7), 985-988. [\[CrossRef\]](#)
43. Watkinson, R.M., Guy, R.H., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2009). Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery II: influence of propylene glycol on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 225–230. [\[CrossRef\]](#)
44. Watkinson, R.M., Herkenne, C., Guy, R.H., Hadgraft, J., Oliveira, G., Lane, M.E. (2009). Influence of ethanol on the solubility, ionization and permeation characteristics of ibuprofen in silicone and human skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 15–21. [\[CrossRef\]](#)

45. Watkinson, R.M., Guy, R.H., Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E., (2011). Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III – influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24, 22–26. [CrossRef]
46. Miki, R., Ichitsuka, Y., Yamada, T., Kimura, S., Egawa, Y., Seki, T., Juni, K., Ueda, H., Morimoto, Y., (2015). Development of a membrane impregnated with a poly(dimethylsiloxane)/poly(ethylene glycol) copolymer for a highthroughput screening of the permeability of drugs, cosmetics, and other chemicals across the human skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66, 41–49. [CrossRef]
47. Joshi, V., Brewster, D., Colonerio, P., (2012). Transdermal diffusion. *In vitro* diffusion studies in transdermal research: a synthetic membrane model in place of human skin. *Drug Development and Delivery*, 12, 40–42. 10 Haziran, 2021’de alındı, <https://drug-dev.com/in-vitro-diffusion-studies-in-transdermal-research-a-synthetic-membrane-model-in-place-of-human-skin/>
48. Merck. (2012). Millipore. Strat-MTM Membrane: A Synthetic Transdermal Diffusion Test Model. Millipore Corporation, Darmstadt, German. Erişim: http://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/61173?v=635459653141970000. Erişim Tarihi: 12.03.2021
49. Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., Michniak-Kohn, B. (2018). Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1-2), 432-437. [CrossRef]
50. Kaur, L., Singh, K., Paul, S., Singh, S., Singh, S., Jain, S. K. (2018). A mechanistic study to determine the structural similarities between artificial membrane Strat-M™ and biological membranes and its application to carry out skin permeation study of amphotericin B nanoformulations. *AAPS Pharmscitech*, 19(4), 1606-1624. [CrossRef]
51. Simon, A., Amaro, M. I., Healy, A. M., Cabral, L. M., de Sousa, V. P. (2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with *in vivo-in vitro* correlation. *International Journal of Pharmaceutics*, 512(1), 234-241. [CrossRef]
52. Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., Sugibayashi, K. (2015). Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 113-118. [CrossRef]
53. Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(7), 1007-1010. [CrossRef]
54. Faller, B. (2008). Artificial membrane assays to assess permeability. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 886-892. [CrossRef]
55. Bujard, A., Sol, M., Carrupt, P.-A., Martel, S. (2014). Predicting both passive intestinal absorption and the dissociation constant toward albumin using the PAMPA technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 36–44. [CrossRef]
56. Di, L., Kerns, E.H., Bezar, I.F., Petusky, S.L., Huang, Y. (2009). Comparison of blood–brain barrier permeability assays: *in situ* brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 1980–1991. [CrossRef]

57. Sinko, B., Kokosi, J., Avdeef, A., Takacs-Novak, K. (2009). A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. *Chemistry and Biodiversity*, 6, 1867–1874. [CrossRef]
58. Sinko, B., Garrigues, T.M., Balogh, G.T., Nagy, Z.K., Tsinman, O., Avdeef, A., Takacs-Novak, K. (2012). Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 698–707. [CrossRef]
59. Tsinman, K., Sinko, B. (2013). A high throughput method to predict skin penetration and screen topical formulations. *Cosmetic Toiletries*, 128, 192–199. 1 Mayıs 2021’de alındı, <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/testing/invivo/premium-A-High-Throughput-Method-to-Predict-Skin-Penetration-and-Screen-Topical-Formulations-201519931.html>
60. Vizserálek, G., Berkó, S., Tóth, G., Balogh, R., Budai-Szűcs, M., Csányi, E., Sinkó, B., Takács-Novák, K. (2015). Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 165–172. [CrossRef]
61. Balazs, B., Vizserálek, G., Berkó, S., Budai-Szűcs, M., Kelemen, A., Sinkó, B., Takács-Novák, K., Szabó-Révész, P., Csányi, E. (2016). Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimic artificial membrane. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1134–1140. [CrossRef]
62. Karadzovska, D., Riviere, J.E. (2013). Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 569–576. [CrossRef]
63. Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., Sinko, B. (2019). A comparison of the *in vitro* permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 142-149. [CrossRef]
64. Kerns, E. H., Di, L., Petusky, S., Farris, M., Ley, R., Jupp, P. (2004). Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6), 1440-1453. [CrossRef]
65. Avdeef, A. (2005). The rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 1(2), 325-342. [CrossRef]
66. Flaten, G.E., Bunjes, H., Luthman, K., Brandl, M. (2006). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 336– 343. [CrossRef]
67. Flaten, G.E., Awoyemi, O., Luthman, K., Brandl, M., Massing, U. (2009). The Phospholipid Vesicle-based Permeability Assay: 5. Development Towards an Automated Procedure for High Throughput Permeability Screening. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, s. 12–21. [CrossRef]
68. Engesland, A., Skar, M., Hansen, T., Škalko-Basnet, N., Flaten, G.E. (2013). New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 1588–1600. [CrossRef]

69. Palac, Z., Engesland, A., Flaten, G.E., Škalko-Basnet, N., Filipovic' - Grčić, J., Vanic', Z'. (2014). Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro* stratum corneum model in formulation development. *Journal of Liposome Research*, 24, 313–322. [CrossRef]
70. Shakel, Z., Nunes, C., Lima, S. A. C., Reis, S. (2019). Development of a novel human stratum corneum model, as a tool in the optimization of drug formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118571. [CrossRef]
71. Moniz, T., Lima, S. A. C., Reis, S. (2020). Application of the Human stratum corneum lipid-based mimetic model in assessment of drug-loaded nanoparticles for skin administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 591, 119960. [CrossRef]
72. Ma, M., Di, H. J., Zhang, H., Yao, J. H., Dong, J., Yan, G. J., Chen, J. (2017). Development of phospholipid vesicle-based permeation assay models capable of evaluating percutaneous penetration enhancing effect. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43 (12), 2055-2063. [CrossRef]
73. Engesland, A., Škalko-Basnet, N., Flaten, G.E. (2015). PVPA and EpiSkin® in assessment of drug therapies destined for skin administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (3), 1119–1127. [CrossRef]
74. Ponec, M. (1992). *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal of Cosmetic Science*, 14 (6), 245-264. [CrossRef]
75. Godin, B., Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1152–1161. [CrossRef]
76. Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P.W., Schaefer, U.F., (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 167–178. [CrossRef]
77. Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., Mommaas, M. (2002). Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15 (Suppl. 1), 4-17. [CrossRef]
78. Episkin Laboratories. Erişim: <https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE> Erişim Tarihi: 10.03.2021.
79. MatTek Laboratories Erişim: <https://www.mattek.com/products/epidermft/> Erişim Tarihi: 10.03.2021.
80. Netzlaff, F., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., Meiers, P., Stahl, J., Kietzmann, M., Niedorf, F., (2006). Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 34, 499–513. 9 Mayıs 2021'de alındı, https://www.researchgate.net/publication/6677538_Comparison_of_bovine_udder_skin_with_human_and_porcine_skin_in_percutaneous_permeation_experiments
81. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W. (2008). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 36 (2), 161–187. [CrossRef]

82. Schäfer-Korting M, Bock U, Gamer A. (2006). Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 34, 283-94. [CrossRef]
83. Dreher, F., Fouchard, F., Patouillet, C., Andrian, M., Simonnet, J. T., Benech-Kieffer, F. (2002). Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or α -tocopherol applied on human skin models or human skin *ex vivo* at finite doses. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(Suppl. 1), 40-58. [CrossRef]
84. Labouta, H.I., Thude, S., Schneider, M. (2013). Setup for investigating gold nanoparticle penetration through reconstructed skin and comparison to published human skin data. *Journal of Biomedical Optics*, 18, 061218. [CrossRef]
85. Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M., Messenger, A., Roguet, R. (2002). Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(Suppl. 1), 18-30. [CrossRef]
86. Bando, H., Mohri, S., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. (1997). Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (6), 759-761. [CrossRef]
87. Gysler, A., Kleuser, B., Sippl, W., Lange, K., Korting, H. C., Höltje, H. D., Schäfer-Korting, M. (1999). Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharmaceutical Research*, 16(9), 1386-1391. [CrossRef]
88. Mahmoud, A., Haberland, A., Dürrfeld, M., Heydeck, D., Wagner, S., Schäfer-Korting, M. (2005). Cutaneous estradiol permeation, penetration and metabolism in pig and man. *Skin Pharmacology and Physiology*, 18(1), 27-35. [CrossRef]
89. Slivka, S. R. (1992). Testosterone metabolism in an *in vitro* skin model. *Cell Biology and Toxicology*, 8(4), 267-276. [CrossRef]
90. Planz, V., Lehr, C. M., Windbergs, M. (2016). *In vitro* models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 242, 89-104. [CrossRef]
91. Ackermann, K., Borgia, S. L., Korting, H. C., Mewes, K. R., Schäfer-Korting, M. (2010). The Phenion® full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(2), 105-112. [CrossRef]
92. Henkel Laboratories Erişim: <https://www.phenion.com/products/reconstructed-tissues> Erişim Tarihi: 11.03.2021.
93. De Wecer, B., Petersohn, D., Mewes, K. R. (2013). Overview of human three-dimensional (3D) skin models used for dermal toxicity assessment. *HPC Today*, 8, 18-22. 2 Mayıs 2021'de alındı, https://www.teknoscienze.com/Contents/Riviste/PDF/tutto_HPC1_2013_RGB_20-25.pdf
94. Neupane, R., Boddu, S. H., Renukuntla, J., Babu, R. J., Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to biological skin in permeation studies. *Current Trends and Possibilities. Pharmaceutics*, 12(2), 152. [CrossRef]

95. Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H., Namjoshi, S., Roberts, M. S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 8, 163. [\[CrossRef\]](#)