

# Kozmetiklerin Deri iritasyon/Korozyon Potansiyellerinin Değerlendirilmesi için Yöntemler

Received : 16.03.2016  
Revised : 17.02.2017  
Accepted : 17.02.2017

Özge Köse\*, Suna Sabuncuoęlu\*, Pınar Erkekoęlu\*,  
Belma Koęer Gümüsel<sup>o</sup>\*

## Özet

İnsan derisi, organizmayı çevresel faktörlere karşı koruyan, farmasötik formülasyonların ve kozmetik ürünlerin içeriğinde bulunan birçok kimyasal maddeye karşı engel teşkil eden önemli bir organdır. Kimyasal maddelere maruziyet sonrasında oluşan lokal toksik etkiler arasında en sık görüleni deri iritasyonudur. Geçmişte kozmetik ürünlerinin deride iritasyon oluşturma potansiyelleri hayvan deneyleri ile değerlendirilmiştir. Etik açıdan, deri iritasyon ve deri korozyon testlerinin laboratuvar hayvanları üzerinde yapılması, hayvanlara önemli derecede rahatsızlık ve acı verme potansiyeline sahiptir. 3R ilkelerinin yayınlanmasından bu yana kimyasal maddelerin potansiyel toksik etkilerinin değerlendirilmesi için, birçok alternatif metod geliştirilmiş, valide edilmiş ve düzenleyici kuruluşlar tarafından kabul edilmiştir. 11 Mart 2013 tarihinde Avrupa Birliği'nde hayvanlar üzerinde test edilen her tür kozmetik ve kişisel bakım ürününün satışı yasaklanmasından sonra kozmetik ürünlerin güvenlik değerlendirmeleri, alternatif *in vitro* toksisite testleri ile yapılmaya başlanmıştır. Alternatif yöntemler olarak; *in vitro* yeniden yapılandırılmış insan epidermis doku modelleri, insan derisine morfolojik olarak yakın benzerliği nedeni ile tercih edilmektedir. Bu derleme kapsamında, kozmetik ürünlerin iritasyon/korozyon potansiyellerinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vivo* ve alternatif *in vitro* yöntemlerden bahsedilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alternatif yöntemler, *in vitro*, deri iritasyonu, deri korozyonu, kozmetik ürünler

---

\* Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji, Ankara, Turkey  
<sup>o</sup> Yazışma Yapılacak Yazar: E-posta: belmagumusel@yahoo.com

## Abstract

# The Methods for Evaluation of Skin Irritation/Corrosion Potentials

The human skin is an important organ that protects the organism against environmental factors and chemicals in the pharmaceutical formulations and cosmetic products. Skin irritation is the most common local toxic effect after exposure to cosmetic products. The potentials of the cosmetic products to induce skin irritation were evaluated by animal experiments in the past. In ethical terms, the irritation and skin corrosion tests have the potential to cause significant pain. Since 3R principle was published, many alternative methods, which were validated and accepted by the regulatory authorities, have been developed for the evaluation of the potential toxic effects of the chemicals. On March 11, 2013, the commercial sale of any types of cosmetics and personal care products that were tested on animals was banned in the European Union; and since then, the safety evaluation of the cosmetics is being conducted with alternative *in vitro* toxicity tests. The *in vitro* restructured human epidermis tissue models are preferred as an alternative method because of their morphological similarity to the human skin. In this review, the traditional and alternative methods used for the evaluation of the irritation and corrosion potentials of cosmetic products are being discussed.

**Key words:** Alternative methods, *in vitro*, skin irritation, skin corrosion, cosmetic products

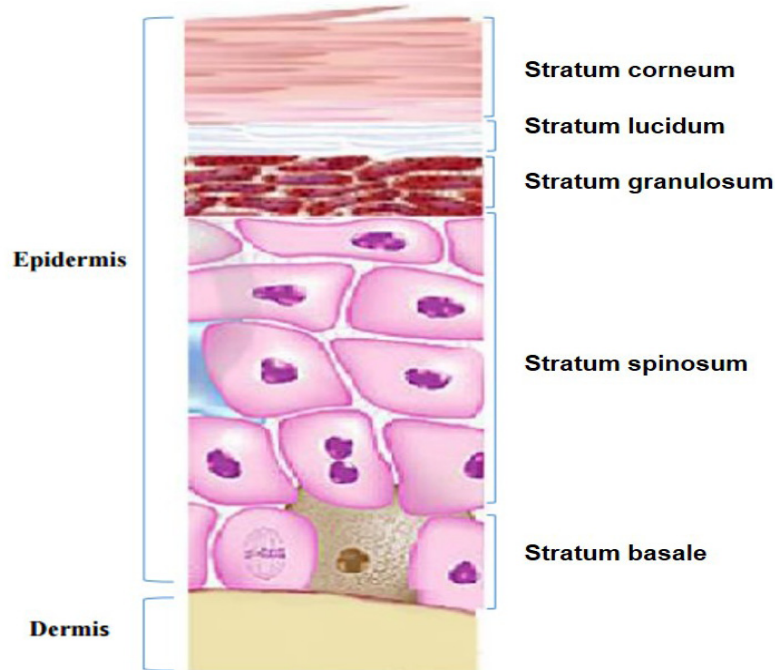
## Giriş

Başta çocuklar gibi hassas popülasyonlarda olmak üzere kozmetik ürünlerin güvenli kullanımı halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Kozmetiklerin deride irritasyon ve korozyon yapma olasılığı vardır ve uzun yıllar kozmetiklerin irritasyon ve korozyon testleri hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Ancak, Avrupa Birliği'nde yayımlanan "Kozmetik Regülasyonu" ile kozmetik ürünlerin güvenliliğinin belirlenmesinde 11 Mart 2013 itibariyle *in vivo* yöntemlerin kullanılması yasaklanmıştır. Bu da bu ürünlerin güvenlilik değerlendirmelerinde *in vitro* yöntemlerin hızlı bir şekilde kullanıma girmesini beraberinde getirmiştir. Bu alternatif yöntemlerin bazılarında elde edilen sonuçların *in vivo* yöntemlerle iyi korelasyon gösterdiğinin belirlenmesi ile, bu yöntemlerin kullanım sıklığı artmış; yeni ve daha gelişmiş modellerin geliştirilmesi için çalışmalar hızlanmıştır. Bu derleme kapsamında, kozmetik ürünlerin deri irritasyon/korozyon yapıcı etkilerinin değerlendirilmesinde *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerden söz edilecek ve alternatif *in vitro* yöntemler detaylı bir şekilde incelenecektir. Öncelikle derinin yapısı kısaca özetlenecek, takiben kozmetik ürünlerden, kozmetiklerde güvenlilik kavramından, kozmetiklerde genel risk değerlendirmesinden ve kozmetiklerin deri irritasyonu/korozyonu yapma olasılıklarından bahsedilecektir. Ayrıca, kozmetiklerin neden olabileceği deri irritasyonu ve korozyonunun nasıl belirlenebileceği; ilgili testler ve bu testlerin validasyonu anlatılacak, uluslararası regülasyonlar ve Türkiye'deki regülasyonlardan bahsedilecektir.

## 1. Derinin Yapısı

Çok sayıda fonksiyonu olan deri, vücudun dış yüzeyini kaplayan en geniş organdır. Mikroorganizmalar, kimyasal maddeler, radyasyon ve çok çeşitli alerjenlere karşı vücudu koruyucu bir bariyerdir. Çok farklı hücre tiplerini içeren heterojen bir yapısı olup; epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç farklı temel tabakadan oluşur [1-3].

Epidermis tabakasının kalınlığı derinin %5'ini oluşturur ve epidermis, en dıştan içe doğru; *Stratum corneum* (boynuzsu katman), *Stratum lucidum* (şeffaf katman), *Stratum granulosum* (granüler katman), *Stratum spinosum* (spinoz katman) ve *Stratum basale* (*Stratum germinativum*, bazal katman) olarak sıralanır [1-3] (Şekil 1). Epidermis tabakası, metabolik olarak aktif ve bölünme kapasitesine sahip olan basal tabakadaki keratinositlerinin farklılaşmasıyla oluşur. Bazal tabaka hücreleri, sürekli olarak mitoz bölünmeye uğrar ve epidermin yenilenmesini sağlar [4,5] Bu yenilenme normal bir insanda, yaş, hastalık, hücre döngüsü gibi faktörlere bağlı olarak yaklaşık 1 ay sürer. Kimyasal madde kaynaklı ya da mekanik olarak deride hasar oluşması durumunda ise, epidermin mitotik bölünme hızı artar [4,5]. Bazı bazal tabaka hücreleri yukarı doğru hareket eder ve farklılaşır. Epidermin en üst tabakası olan *Stratum corneum* keratinositlerin farklılaşması ile oluşan boynuzsu tabakadır ve bu tabaka çok sayıdaki maddeye karşı engel oluşturur. Keratinositler, epidermin tüm dış etkenlere karşın korunmasında önemli bir role sahiptir [6]. Bu hücreler, bazal tabakalardaki hücrelerden farklı olarak basık ve uzun haldedir. Ana bileşenini keratin olan bu hücrelerin çekirdekleri yoktur ve tüm metabolik aktivitelerini kaybetmişlerdir. Epidermiste keratinositler dışında iki dendritik hücre tipi olan melanosit ve Langerhans hücreleri de bulunmaktadır. İnsan derisinin ana pigmenti olan melani melanositler üretirken, Langerhans hücreleri IgG ve C3 reseptörleri ile 1a antijeni taşırlar. Dermis tabakasında ise, inflamasyon regülasyonu ve modülasyonuna katılan miyeloid ve lenfoid hücreler başta olmak üzere birçok hücre bulunmaktadır [7].



Şekil 1. İnsan Derisinin Yapısı 1

İnsanlar kozmetiklerin, temizlik ürünlerinin ve farmasötik formülasyonların içeriğinde bulunan birçok kimyasal maddeye günlük hayatta giderek artan düzeylerde maruz kalmaktadır. Dermal yol bu tür kimyasal maddelerin maruziyetinde önemli bir temas yoludur. Deri yolu ile maruziyet, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek sonuçlar doğurabilir. Dermal maruziyet deri iritasyonu ve korozyonu gibi lokal etkilere neden olabileceği gibi sistemik değişikliklere de yol açabilir [8,9].

## 2. Kozmetikler ve Güvenlilik

### 2.1. Kozmetik Ürün Tanımı

Avrupa Birliği 76/768/EEC sayılı Konsey Direktifinin birinci maddesine göre “kozmetik ürün” terimi; insan vücudunun dış yüzeyine (epidermis, saç, tırnak, dudak ve dış genital organ), ağız boşluğunun mukoz membranlarına ve dişlere uygulanmak üzere hazırlanmış olan temizleme, koku önleme, güzel koku verme, görünüşünü değiştirme amacıyla kullanılan herhangi bir madde veya karışımı ifade eder [10]. Doğal kozmetik ürünler, bitki, hayvan ve mineral kaynaklardan elde edilen çeşitli maddeler kullanılarak üretilmektedir ve binlerce yıl öncesine dayanan bir geçmişi bulunmaktadır. Günümüzde modern teknolojiyle bu ürünlere sentetik ve yarı-sentetik olanlar da eklenmiştir [11].

Topikal olarak uygulanan kozmetik ürünler insanların görünüşlerinde değişiklik yaratmak iddiasıyla piyasaya sunulur. Bu ürünlerin çeşitliliği ve üretim miktarları gün geçtikçe artmaktadır. Bu ürünlerin çoğunun bileşenleri sentetiktir. Bu bileşenlerin deride duyarlılığa neden olduğu ve bunun sonucu olarak kozmetik kullanımına bağlı dermatitlerin ortaya çıkışında artış olduğu belirtilmiştir. Dermal yolla oluşan lokal toksik etkiler, genellikle kutanöz inflamasyon reaksiyonları şeklinde ortaya çıkar. Bunlardan en sık görüleni deri iritasyonudur [12].

### 2.2 Kozmetik Ürünler için Kullanıcı Güvenliği

Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Konseyi'nin, Temmuz 1976 tarih ve 76/768/EEC sayılı eski direktifin yeniden düzenlenmesi sonrasında, 30 Kasım 2009 kabul tarihli EC 1223/2009 sayılı yeni “Kozmetik Direktifi” ve 5324 sayılı “Kozmetik Kanunu” yayımlanmıştır. Bu kanun, piyasaya sürülen bir kozmetik ürünün normal veya makul kullanım koşullarında insan sağlığına zarar vermeyecek nitelikte olması gerektiğini belirtmektedir. Ürünün güvenliliği ile ilgili tüm sorumluluk açıkça üretici firmaya bırakılmıştır [10-13].

Kozmetik ürünün güvenlilik değerlendirmesi bu konuda gerekli bilgi ve beceriye sahip sorumlu bir kişi tarafından yapılmalıdır. Bu kişi, kozmetik ürün içeriğindeki kimyasal maddelerin yapısını, toksikolojik özelliklerini ve maruziyet düzeylerini içeren bir güvenlilik dosyası hazırlayarak kozmetik ürünün belirlenen şartlar altına güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için gerekenleri yapmalıdır [10,11]. Avrupa Birliği'ne üye devletler, EC 1223/2009 sayılı “Kozmetik Direktifi” hükümlerine göre piyasaya uygun kozmetik ürünlerin sunulması için gerekli tüm önlemleri almak zorundadır. Kozmetik ürünler aşağıda belirtilen bilgilerine kolayca ulaşılabilir olmalı ve üretici firmalar bunu sağlamak için bir gözetim/denetim sistemi kurmalıdır [13,14]. Kozmetik ürünlerin Teknik Bilgi Dosyası ve Ürün Bilgi Dosyası'nda yer alması gereken ve gerek Avrupa Birliği direktiflerinde gerekse Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın ilgili kılavuzlarında ve 2005 yılında yayımlanan “Kozmetik Yönetmeliği”nde yer alan bilgiler aşağıda verilmiştir [13,14].

- Ürünün kalitatif ve kantitatif bileşimi,
- Kozmetik ürünün ve bileşenlerinin fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik spesifikasyonu ve kozmetik ürünün fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik spesifikasyona uygunluğuna ilişkin kontrol kriterleri,
- İyi İmalat Uygulamaları Kılavuzu hükümlerine uygun üretim metodu; üreticinin yeterliliği veya gerekli derecede tecrübesi olduğuna dair eğitim ve çalışma belgeleri,
- Bitmiş kozmetik ürünün insan sağlığı için güvenlik değerlendirilmesi

Bu amaçla üretici, ürün bileşenlerinin toksikolojik karakteri, kimyasal yapısı ve maruz kalma düzeylerini belirler. Ürünü kullanacak hedef kitlenin veya ürünün uygulanacağı bölgenin özellikleri göz önüne alınmalıdır. Dış genital organlara haricen uygulanmak amacıyla üretilmiş kişisel hijyen ürünleri ile üç yaşından küçük çocukların kullanımı için hazırlanan ürünler için özel güvenlik değerlendirmesi gerekir [13,14].

Bu değerlendirme, ülkemizde 25/6/2002 tarihli ve 24796 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri ve Test Laboratuvarlarının Belgelendirilmesine Dair Yönetmelik hükümlerine uygun olarak yapılır [15,16].

Bu değerlendirmede aşağıdaki bilgiler yer almalıdır:

- Güvenlilik değerlendirmesi yapan kişinin adı ve adresi (Güvenlilik değerlendirmesi eczacılık diplomasına sahip bir kişi tarafından veya tıp, diş hekimliği, biyoloji, kimya, biyokimya, mikrobiyoloji veya eşdeğer diplomaya sahip toksikoloji dalında veya kozmetik ürün güvenlilik değerlendirmesi alanında sunulan teorik ve uygulamalı müfredat programını tamamlayanlara verilen bir belgeye sahip kişi tarafından yapılır.)
- Kozmetik ürünlerin kullanımını sonucunda insan sağlığında oluşabilecek istenmeyen etkiler hakkında mevcut veriler,
- Gerekli durumlarda, kozmetik ürünün sahip olduğu iddia edilen etkiye ilişkin kanıtlayıcı bilgi ve belgeler,
- Avrupa Birliği dışındaki ülkelerin mevzuat veya diğer düzenlemelerinin gerekleri nedeniyle hayvanlar üzerinde yapılmış olan testler de dahil olmak üzere, üretici tarafından, ürünün geliştirilmesi veya ürün veya bileşenlerinin güvenlilik değerlendirilmesi için hayvanlar üzerinde yapılan testlerle ilgili veriler.

Kozmetik ürün güvenlilik raporunda ürünün formülasyonunda yer alan tüm maddelere ilişkin toksikolojik özelliklerin sunulması gerekmektedir. Bu kapsamda, kozmetik ürününün herbir bileşenine ilişkin pekçok toksik etkinin yanısıra, deri irritasyonu ve/veya korozyonuna dair bilgilerin de sunulması gerekir.

“Kozmetik Direktifi”nin (EC 1223/2009) 3. maddesine göre, piyasada bulunan bir kozmetik ürünün normal kullanım koşullarında insan sağlığı için güvenli olması gerektiği, bunun için de pazarlama öncesinde kozmetik ürünlerin güvenlilik değerlendirilmesinin yapılmasının zorunlu olduğu belirtilmiştir [14]. Bir kozmetik ürün piyasaya sunulmadan önce tüketici için “güvenli” olduğu gösterilmelidir. Kozmetik ürünlerin güvenlilik değerlendirilmesinde, bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif özellikleri, fiziksel ve kimyasal özellikleri, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (Quantitative structure–activity relationship, QSAR), kimyasal kategorileri, farmakokinetik ve toksikolojik özellikleri, *in vitro* çalışmalardan elde edilen veriler kullanılır. Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalar ve klinik veriler de bu değerlendirmede dikkate alınmaktadır. Tüketici Ürünleri Üzerine Bilimsel Komitenin (Scientific Committee on Consumer Products, SCCP) 6. revizyon

raporunda da yayınlandığı üzere kozmetik ürünler için Avrupa Parlamentosu 2003/15/EC2 Direktifi, günümüzde kozmetik ürünlerin güvenlik değerlendirilmesi için valide *in vitro* yöntemler kullanılmasını önermektedir [11].

### 2.3. Kozmetiklerde Genel Risk Değerlendirmesi

Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) kılavuzuna göre “risk değerlendirilmesi”, belirli bir hedef organizma, sistem ya da popülasyonun belirli bir maddeye maruz kalmasını takiben olası risklerin hesaplanması ve tahmin edilmesine dayanan bir süreç olarak tanımlanmaktadır [17].

Kozmetik ürünler dahil tüm kimyasal maddelerde bu süreç dört önemli basamaktan oluşur [17]:

- i. Tehlikenin tanımlanması
- ii. Doz-cevap ilişkisinin değerlendirilmesi
- iii. Maruziyetin değerlendirilmesi
- iv. Risk karakterizasyonu.

i. Tehlikenin tanımlanması: Bu basamakta, insan sağlığı açısından risk oluşturabilecek kimyasal maddeler tanımlanır. Çevrede mevcut olan konsantrasyonlarının belirlenir; varsa maruziyete dair epidemiyolojik çalışmaların sonuçları incelenir ve bu kimyasallara maruz kalan insanlarda spesifik toksisite (nörotoksisite, karsinojenisite, vb) değerlendirilir. Tehlikenin tanımlanmasında, hem kalitatif hem de kantitatif yöntemler kullanılır. Tehlike değerlendirmesinde deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar büyük ölçüde kullanılmakta iken, son yıllarda *in vitro* testlerin de önemi artmıştır. Kalitatif yöntemlerle organizma ya da popülasyonda ortaya çıkabilecek olası ters etkiler belirlenirken, kantitatif yöntemlerle toksik ajana bağlı doz-cevap ilişkisi ortaya konur. Karsinojenik ve/veya mutajenik etki şeklinde gözlenen bazı toksik cevaplar, var/yok yanıtları şeklinde (kuantal yanıt) tanımlanır [17].

ii. Doz-cevap ilişkisinin değerlendirilmesi: Bu basamak ile, kimyasal maddenin dozu ve toksik yanıt arasındaki kantitatif ilişki belirlenir. Maruz kalan bireylerde, ilgili kimyasal maddenin toksik etki oluşturma potansiyelinin maddenin uygulanan dozuyla ilişkisi ileri toksikolojik değerlendirmeler yapılmasını sağlar. Eşik doz-cevap ilişkisinin karakterizasyonu “hiç ya da en az düşük advers etki düzeyleri”nin “advers etki gözlenmeyen düzey (NOAEL)” veya “en düşük advers etki gözlenen düzey (LOAEL)” belirlenmesini içerir. Bu ilişkinin geliştirilmesi, matematiksel modellerin kullanılmasını kapsayabilir. Ayrıca, bu basamak, yaşa bağlı duyarlılık gibi yanıtta değişkenliklerin değerlendirilmesini kapsayabilir [17,18].

iii. Maruziyetin değerlendirilmesi: Maruziyet değerlendirilmesi, söz konusu etkene maruz kalan popülasyonun belirlenmesi, maruziyetin hangi yolla oluştuğunun tanımlanması ve insanların maruziyetinin bir sonucu olarak, aldıkları dozun miktarı, süresi ve sıklığının tahmin edilmesini içerir. Maruziyetin belirlenmesi için ürünün su, toprak, hava ve gıdalardaki miktarları biyolojik organizmalarda doku ve organlardaki düzeyleri ölçülmelidir. Bazı durumlarda matematiksel modeller kullanılarak maruziyet öngörülebilir [11,17,18].

iv. Risk karakterizasyonu: Riskin karakterizasyonu, risk değerlendirmesinin ilk üç basamağındaki verilerin, ilgili bileşiğe bağlı olarak, maruz kalan kişilerde herhangi bir tehlikenin gerçekleşme olasılığının kantitatif veya kalitatif olarak belirlenmesi için birleştirilmesidir. Bu basamak risk değerlendirme sonuçlarının ifade edildiği adımdır [18,19].

### 3. Deri İrritasyonu ve Korozyonu

#### 3.1 Deri İrritasyonu Nedir?

Deri irritasyonu, genel olarak test maddesinin uygulanmasından sonra 4 saate kadar deride oluşabilen geri dönüşlü hasar olarak tanımlanır [20,21]. Deri korozyonu ise, genellikle deride geri dönüşümsüz hasar oluşumu, daha açık bir ifadeyle ise test maddesinin uygulanmasını takiben 4 saate kadar epidermisten dermise doğru gözle görülebilir nekroz oluşumu olarak tanımlanmaktadır [22,23].

#### 3.2. Deri İrritasyon ve Korozyonunun Oluşum Mekanizmaları

Kozmetik ürünler, genellikle bir çözücü sıvının yanında, ürünün özelliğine göre emülsifiyan, kıvam verici, pH düzenleyici, renk ve koku tutucu (ftalatlar gibi), koruyucu (parabenler gibi), surfaktan (sodyum lauril sülfat, sodyum laureth sülfat gibi) ve aerosol gibi bileşenlerden bir kaçını/birçoğunu aynı anda içerir [24-26].

Bilindiği gibi, *Stratum corneum* birçok maddeye karşı bariyer görevini üstlenmiştir. Bunun yanında keratinositler, epidermisin immün takibi için kritik bir role sahiptir ve immün yanıtları tetikleyebilir. Birçok kimyasal maddenin, deri irritasyonuna ve farklı advers etkilere neden olabileceği belirtilmektedir [4,5].

İrritasyon potansiyeline sahip kimyasal maddeler farklı mekanizmalarla etkilerini gösterir [27]. Kozmetik ürün içeriğindeki sürfaktan ve emulsifiyanların hepsi deri irritasyonuna neden olabilir. Ancak, temizlik ve kozmetik ürünlerin bileşimindeki bazı maddeler (örneğin, anyonik surfaktanlar), hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş kısımlarından oluşur; yani hem polar hem de apolar gruplar taşır. Bu yapılar, derideki lipit tabakalarıyla etkileşime girer, zamanla lipit tabakasının azalmasına, takiben deri hücrelerinde membran hasarına ve hücre bütünlüğünün bozulmasına, derinin kurummasına, foliküllerin tıkanmasına, cilt pH'sının yükselmesine ve deri irritasyonuna neden olabilir [20]. İrritan maddeler, *Stratum corneum*da lipit dengesinin bozulmasına yol açabilir ve protein denatürasyonuna neden olarak bariyer fonksiyonunu zayıflatabilir. Oluşan bariyer hasarı sonucu transepidermal su kaybı artar. Ayrıca, iritan maddelerin deriden emilimi kolaylaşır ve bunun sonucu olarak bu maddeler epidermal tabakaların en alt tabakalarına kadar ilerleyerek bu tabakalardaki hücrelere zarar verir [5]. Aromatik ve alifatik hidrokabonlar, bunların türevleri ile asit, baz ve tuz gibi inorganik kimyasal maddelerin irritasyonu tetiklediği de bilinmektedir [5]. Keratinositlerin sitoplazması proinflatuar sitokin IL-1 $\alpha$  içerir. IL-1 $\alpha$  inflamasyon başlatıcı olarak tanımlanır [28-30]. IL-1 $\alpha$  yalnızca membran bütünlüğü bozuk ve hasar gören hücrelerden salgınmaktadır. Membran hasarına neden olmayan iritan maddeler ise, inflamatuvar cevabı başlatamaz ve IL-1 $\alpha$  salgınını gerçekleştirmez [31]. Yeniden yapılandırılmış insan epidermisi (Reconstructed Human Epidermis, RhE) modelleri ile, *in vivo* olarak dokularda gerçekleşen akut irritasyon *in vitro* olarak belirlenebilir ve benzer yanıtlar elde edilebilir [32].

Bazı iritan maddeler ise, keratinositlerin fizyolojisini değiştirir. En önemli etkileri oksidatif stresi tetiklemeleridir [33-35]. Oksidatif stres, nükleik asitler, protein ve membran lipitlerinde hasara yol açar. Bunun sonucunda, gen ekspresyonunda değişiklikler ve sitotoksite oluşur [36,37]. Diğer taraftan, kimyasal maddelerin hücre içi ya da membran-bağlı proteinlerle etkileşimi sonucu keratinositler etkilenebilir. Ayrıca, epidermal pH değişimi gibi değişiklikler sonucu, transmembran reseptörlere iritan maddeler bağlanabilir ve bu olay sinyal iletimini değiştirerek irritasyon cevaplarını oluşturur [35,38].

### 3.3. Deri İrritasyon Analiz Yöntemleri

Ürünlerin deri irritasyonuna neden olma potansiyelinin değerlendirilmesi güvenilirlik prosedürleri açısından önem taşımaktadır. Geçmişte bir ürünün ya da bileşenin deride irritasyon ya da korozyon oluşturma potansiyeli tavşan deri testlerinde değerlendirilmiştir [39]. Draize tarafından geliştirilen ve “Draize testi” olarak adlandırılan bu testin detayları OECD TG 404 kılavuzunda verilmiştir. Yarım yüzyıldır kullanılan test, tüketicileri, işçileri, üreticileri spesifik kimyasal maddelerin potansiyel tehlikelerinden koruma anlamında uyarı değeri sağlamıştır. Ancak bu test, uzun yıllar eleştirilere maruz kalmıştır [40,41]. Bu test, deri irritasyonu ve korozyonu açısından insanlarda tehlike oluşturabilecek kimyasal maddelerin tespit edilmesi için geliştirilmiştir. Bu yöntemde iritan maddelere karşı daha hassas olmaları, kolay elde edilebilir ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle albino tavşanlar kullanılmaktadır. Test edilecek maddenin deney hayvanının deri yüzeyine tek doz uygulanmasını takiben, uygulana bölge yama ile kapatılır; 4 saat beklenir. Sonrasında yama açılır; test maddesi yıkama yolu ile uzaklaştırılır ve deri reaksiyonları (eritem, ödem) 1, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla değerlendirilir ve hayvanlar 14 gün boyunca gözlemlenir. Oluşan reaksiyonlar 14 günün sonuna kadar devam ediyorsa, test maddesi iritan olarak kabul edilmelidir [39]. Bu test başlangıçta kimyasal madde ve kozmetiklerin iritan etkilerinin karşılaştırılması amacıyla geliştirilmemiştir; ancak sonrasında bu amaçla da kullanılmıştır. Daha sonrasında ise, gönüllü insanlar üzerinde 4 saatlik insan yama testleri (4h-HPT) prosedürü geliştirilmiş ve büyük ölçekli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır [41,42]. Bu testin prosedürü Draize testi metodolojisine benzer şekilde tasarlanmıştır; ancak OECD tarafından kılavuz olarak yayınlanmamıştır. 4h-HPT insanlarda deri reaksiyonlarının belirlenmesinde etik bir yoldur ve deri irritasyon potansiyelinini belirlenmesinde deney hayvanlarının kullanımının engelleme stratejisinin bir parçası olmuştur [41,42].

York ve ark.'nın 1994 yılında yaptığı çalışmada 15 test maddesi kullanılmış ve bunlardan %50 sinin iritan ve korozyon olarak sınıflandırılması Draize tavşan testi prosedürüne göre yapılmıştır. Ancak, aynı maddelere 4h-HPT uygulanarak yapılan çalışmalarda benzer sonuçlara ulaşılamamıştır [43]. Sonrasında, Robinson ve ark. (2000) Draize testi ile test ettikleri bir maddenin korozyona neden olduğu sonucuna ulaşmış; ancak yapılan 4h-HPT çalışmalarında bu test maddenin korozyon ya da irritasyona sebep olmadığı belirlenmiştir [44].

Draize tavşan testi ile *in vitro* yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar arasındaki tutarsızlıklar, bilimsel endişelerin doğmasına neden olmuştur [45,46]. Özellikle, Weil and Scala Draize testi ile elde edilen sonuçların laboratuvarlar arasında da değişken olduğunu göstermiştir [46]. 2010 yılında Jirova ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, test edilen 16 kimyasal madde tavşanlarda iritan olarak tespit edilirken, yalnızca 5 tanesi insanlarda iritan etki göstermiştir. Bu nedenle, tavşan testlerinin insanda iritan maddeleri doğru bir şekilde tanımlayabildiği; ancak iritan olmayan maddeleri ise, iritan olarak belirleyebildiği bildirilmiştir [47]. 1990'lı yıllarda gerçekleştirilen birçok klinik testte 4h-HPT yöntemi kullanılmıştır. 4h-HPT ile Draize testi karşılaştırıldığında ise, her iki test arasında ciddi tutarsızlıklar saptanmıştır [47-50]. Araştırmacılar Draize deri irritasyon testi sonuçlarının değişkenliğini, skorlamadaki subjektifliğe veya deney hayvanlarının yanıtlarındaki farklılığa ya da her iki nedene birden bağlamaktadır [51]. Etik açıdan düşünüldüğünde ise, deri irritasyon ve korozyon testlerinin laboratuvar hayvanları üzerinde yapılması, hayvanlara önemli derecede rahatsızlık ve acı verme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, birçok alternatif metot geliştirilmiş, valide edilmiş ve düzenleyici kuruluşlar tarafından kabul edilmiştir. Günümüzde, ciddi düzeyde deri irritasyonuna ve korozyonuna neden olabilen maddelerin tanımlanması *in vitro* alternatif yöntemlerle sağlanmaktadır ve son yıllarda bu yöntemler tamamen tavşan testlerinin yerini almıştır [52].



#### 4. Kozmetik Güvenlilik Testlerinde Deney Hayvanı Kullanımının Yasaklanması

Avrupa Birliği'nde 2004 yılından itibaren bitmiş kozmetik ürünlerin, 2009 yılında ise kozmetik ürün bileşenlerinin hayvan deneylerinde test edilmesi yasaklanmıştır [13]. Daha önce de belirtildiği üzere, 11 Mart 2013 itibarıyla ise, EC 1223/2009 sayılı "Kozmetik Direktifi" ile, hayvanlar üzerinde denenen her tür kozmetik ve kişisel bakım ürününün Avrupa Birliği'nde satışı yasaklanmıştır. Bu yasa, Avrupa Birliği'nin dışında yer alan ülkelerden ithal edilen ürünler için de geçerlidir [13, 53].

Bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunması konusunda yayımlanan 2010/63/EU direktifine göre, sonuca ulaşmada kullanılacak başka metot veya test stratejileri varsa, deneylerde canlı hayvan kullanılmamasının gerektiği belirtilmiştir [54]. Kozmetik direktifi ve yönetmeliğine göre, hayvan testlerine alternatif metotların olmadığı durumlarda bile test ve pazarlama yasakları uygulanmaktadır. Kozmetik ürün ve bileşenlerindeki kimyasal maddelerin dışında kalan maddelerin analizlerinde alternatif metotların olmadığı durumlarda, insan sağlığının ve çevrenin korunmasının sağlanması amacıyla deney hayvanlarının kullanımına ihtiyaç duyulduğunu belirtilmiştir. Bu testlerin mümkün olduğunca deney hayvanları açısından 3R kuralı gereklerine uygun olarak hayvan refahının sağlanması gerektiğini belirtilmiştir [13].

Hayvan deneyleri için alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar son 20 yılda hız kazanmıştır. Alternatif yöntemlerin öğrenilmesi ve kullanımı toksikoloji deneyleriyle ilişkili olması nedeniyle günümüz toksikologları için önemli hale gelmiştir. Araştırma-geliştirme amaçlı hayvan kullanımının azaltılması, mümkünse yerine daha düşük filogenetik sınıftan bir hayvan konması veya uygun bir *in vitro* test varsa onun kullanılması ve hayvanlara daha az acı verilmesi, verilen acının azaltılması ve refahının sağlanması ile ilgili kuram "3R kuramı (reduction, replacement, refinement)" olarak bilinir. 3R ilkelerinin yayınlanmasından bu yana kimyasal maddelerin potansiyel toksik etkilerinin değerlendirilmesi için farklı alternatif yöntemler geliştirilmiştir [54]. 1980 yılından beri yeniden yapılandırılmış birçok insan epidermis modeli geliştirilmiştir: Bunlar EpiSkin [55,56], CellSystems EST-1000 [57], EpiDerm [58], OS-Rep Phenion skin model Technologies [59] ve SkinEthic™ [60]. Sözü geçen üç boyutlu RhE modelleri, *Stratum corneum* tabakasını içerir ve gerçek insan epidermisini taklit eder. Ayrıca, çeşitli maddelere maruziyet sonrasında oluşabilecek hasarlarda biyolojik parametreleri değerlendirmek için kullanılabilir. Bu modeller, kimyasal veya bitmiş ürünlerin *Stratum corneum* üzerine lokal olarak uygulanmasına elverişlidir [61]. Son yıllarda, üç boyutlu RhE modellerin, yeniden yapılandırılmış insan epidermis modellerin ve tam katmanlı modellerin özellikle kozmetik ürünlerin dermal toksisitelerinin belirlenmesinde daha yoğun bir şekilde kullanıldıkları görülmektedir [62]. Araştırmacılar, deney kılavuzu OECD TG 431 ve OECD TG 439 çerçevesinde ticari olarak üretilen EpiSkin™, Epiderm™ SIT (EPI-200), SkinEthic™ RHE ve LabCyte EPI-MODEL24 SIT modellerini kullanılarak deri iritasyon ve korozyon testlerini gerçekleştirebilir [63].

##### 4.1. Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi Modelleri

###### 4.1.1. SkinEthic

SkinEthic Laboratuvarı'nın teknik veri ve güvenlik formlarına göre SkinEthic epidermal modeller 'normal insan keratinositleri ile yeniden yapılandırılmış epidermis modelleri' olarak tanımlanmıştır [63,64]. ISO 9001 Standartlarına göre üretilen bu doku modelinin her serisi kalite kontrol standartlarına göre kontrol edilir [63,64]. SkinEthic Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi Modeli

(RhE) test metodu, maddelerin deri irritasyonu ve korozyonu analizlerinde uygulanmasında resmi olarak onaylanmıştır [66-68]. SkinEthic modelin epidermal yapısı insan epidermis yapısına çok benzemektedir. *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* gibi epidermisin en önemli yapıları da SkinEthic modelinde bulunmaktadır [69]. Genel olarak değerlendirildiğinde, modelin lipid kompozisyonu normal insan dokusuna çok benzemektedir [70]. Ancak, bu modelde bulunan *Stratum corneum* tabakası, epidermal canlı hücre sayıları ve yağ damlacıklarının her tabakada bulunması ile insan dokusuna göre modelin farklı yönlerini oluşturur [70]. Seramitlerin alt sınıfı ve prekürsörleri olan glukosilseramitler SkinEthic modelinde bulunmasına karşın seramid2 (Cer[NS]) miktarı normal epidermisten daha fazladır ve seramid 7 ise, bu modelde mevcut değildir [71,72].

2014 yılında yapılan bir çalışmada, seçilen 84 test maddesinin SkinEthic doku modelleri üzerinde korozyif etkileri test edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, araştırmacılar SkinEthic RHE test metodunun korozyif ve korozyif olmayan maddelerin ayrımını yüksek hassasiyette sağladığını ve deri korozyon testleri için güvenilir bir test modeli olduğunu belirtmişlerdir [65].

#### 4.1.2. EpiSkin

EpiSkin modeli normal insan epidermisine oldukça yakındır. Fosfolipit ve seramit yapıları da insan epidermisine benzerdir. İnsan epidermisi gibi lanosterol içerir. Ancak normal insan epidermisi ve doku modeli arasında bazı farklılıklar da söz konusudur. EpiSkin modelindeki bazı hücreler normal insan epidermisine göre daha farklı bir şekilde organize edilmiştir. Suprabazal bölgedeki hücre şekillerinde de farklılıklar bulunmaktadır. Üst hücre tabakaları nispeten düz iken bazal hücreler, kübik şekilde olma eğilimindedir. Keratohiyalin ve granüler hücreler mevcuttur; ancak bu hücrelerin şekilleri düzensizdir [71,73,74]. Doku modeli, yüksek düzeyde Seramid 2; düşük düzeyde Seramid 5 ve Seramid 6 içerirken, yapısında seramid 7 bulunmamaktadır. Ayrıca, serbest yağ asitleri ve kolesterol esterleri daha düşük miktarlardadır [69-73, 75].

2012 yılında yayımlanan bir çalışmada *in vivo* deri irritasyon/korozyon testi ile OECD 431 *in vitro* deri korozyon yöntemleri kıyaslanmıştır. Bu doğrulama çalışmasında *in vitro* model olarak EpiSkin doku modeli tercih edilmiştir. Korozyif özellikte olduğu bilinen test maddeleri seçilmiş, bulunan sonuçların kimyasal maddelerin bilinen korozyif özelliklerine uygun olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar *in vitro* deri korozyonu test metodunun insan doku modelleriyle uygulanmasının test maddelerinin korozyif özelliklerini doğru ve kesin bir şekilde tanımlayabildiği sonucuna varmış, böylelikle test sistemini validasyonunu da sağlamışlardır [76].

#### 4.1.3. EpiDerm

EpiDerm modeli ilk olarak 1994 yılında Cannon ve ark. tarafından tanımlanmıştır. EpiDerm modeli “normal, çok tabakalı, insandan türetilmiş epidermis keratinositleri” olarak ifade edilmiştir [58]. *Epidermiste bulunan her tabaka bu modelde de yer almaktadır. Canlı hücre tabakası 7-14 arasında ve epidermal kalınlığı 83-100 µm'dir. Stratum corneum 16-25 hücre tabakası içerir ve kalınlığı 12-28 µm arasındadır. Stratum spinosum tabakasında insan epidermisinde olduğu gibi hücrelerin şekli yassıdır. İntraselüler lipidler bu modelde mevcuttur; ancak organizasyonu oldukça farklılık göstermektedir.* Normal epidermal tabakada bulunan en önemli ana lipid sınıfları da bu modelde bulunmaktadır. *Keratohiyalin granülleri ise yıldız şeklindedir* [70,73,74]. Bu modelde glukosilseramidler yüksek miktardadır. İnsan epidermisinde bulunan bütün seramitler bu modelde de bulunur. Ancak, miktar yönünden farklılıkları vardır. Seramid

2 miktarı normal epidermise göre daha fazla, Seramit 5 ve Seramit 6 ise düşük, Seramit 7 ise bulunmamaktadır. Diğer modellerde de olduğu gibi, kolesterol ve serbest yağ asitleri normal epidermiste olduğundan daha düşüktür [70].

22 kozmetik ürün bileşeni iritasyon oluşturma potansiyeli açısından insan derisinde *in vivo* olarak ve EpiDerm model üzerinde *in vitro* çalışmalarla test edilmiştir. Çalışma sonucunda *in vivo* ve *in vitro* sonuçlar arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur. Kozmetik ürün bileşenlerinin iritasyon potansiyeli açısından değerlendirilmesinde bu doku modelinin kullanılmasının yararlı olabileceği belirtilmiştir [77].

Genel bir değerlendirme yapıldığında SkinEthic, EpiDerm ve EpiSkin modelleri insan doku-sunu taklit etmek üzere tasarlanan modellerdir. Genel yapıları, kompozisyonları, biyokimyasal yönleri insan derisine benzerlik taşır. Bu modeller fototoksikite testleri dahil olmak üzere birçok toksisite çalışmaları için uygundur [78].

#### 4.2. *In vitro* Deri İritasyon Testi Test Prensi

RhE modeller kullanılarak uygulanan *in vitro* deri iritasyon testleri OECD TG 439 kılavuzuna göre gerçekleştirilmektedir. Test maddesi, normal, insan keratinositlerinden oluşan, çok katmanlı bir yapıya sahip olan 3 boyutlu yeniden yapılandırılmış insan epidermis modele topikal olarak uygulanır. RhE modeller kullanılarak uygulanan test yöntemlerinin esası, iritan maddelerin *Stratum corneum*u difüzyonla geçmesi sonucu derinin alt katmanlardaki hücrelerinde sitotoksik etki oluşturma prensibine dayanmaktadır. Her maruziyet süresi için 3 doku kullanılarak, dokular 1 saatten 42 saate kadar ileri inkübasyona tabi tutulur. Doku hasarı maruziyet bitiminde kolorimetrik test kullanılarak metabolik aktivite tayini ile belirlenir. MTT ile inkübe edildikten sonra hücre canlılığı değerlendirilir. Steril fosfat salin tamponu negatif kontrol, %5 sodyum dodesil sülfat (SDS) ise, pozitif kontrol olarak kullanılır. Negatif kontrol dokularının canlılığı ile karşılaştırılarak, doku canlılığı %50 ve ya daha düşük ise test materyali “irritan” olarak kabul edilir [79].

#### 4.3. *In vitro* Deri Korozyonu Test Prensi

RhE modeller kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* deri korozyon testleri OECD TG 431 kılavuzuna göre gerçekleştirilir. RhE test metodunun prensibi, korozif kimyasalların difüzyon yolu ile *Stratum corneum*dan penetre olabilmesi ve derinin alt katmanlarında sitotoksik etkiler göstermesine dayanır. Kısaca, deri korozyonuna neden olabilecek kimyasal madde doku modeli üzerine topikal olarak uygulanır. Testte 3 dakika ve 1 saatlik maruziyet süreleri kullanılır. Bu amaçla MTT ile inkübe edilerek mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi ölçülür. Amaç hücre canlılığının kolorimetrik olarak ölçülmesi ve canlı hücre yüzdesinin belirlenmesidir. Test materyaline maruz kalmış dokuların formazan üretimi negatif kontrol olarak kullanılan dokularla karşılaştırılır. Steril deiyonize su negatif kontrol, 8 N potasyum hidroksit çözeltisi ise pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Test materyalinin korozif olma potansiyeli, 3 dakikalık maruziyet sonunda negatif kontrol ile karşılaştırılarak belirlenir. Doku canlılığı %50'nin altına düştüğü durumlarda test materyali korozif olarak kabul edilir. Bir saatlik maruziyet sonunda ise doku canlılığı %15 ve daha az ise, test materyali korozif olarak tanımlanmaktadır [80].

#### 4.4. *EpiSkin, Epiderm SkinEthic Modelleri için Validasyon Çalışmaları*

Validasyon; “geçerli kılma” anlamında kullanılan bir terimdir ve kullanılan yöntemin doğru ve kesin olarak sürekli bir şekilde bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken

işlemleri kapsar. Validasyon tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Kapsamlı geçerli kılma, rutin kullanım öncesi yöntem performans kriterlerinden tümünün veya belirli bir kısmının incelenip, dökümanete edilmesi anlamına gelirken; tam iç geçerli kılma yöntemin tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir. Doğrulama yani verifikasyon, laboratuvarlararası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir metodun laboratuvar şartlarında onaylanmasıdır. Valide edilmiş yöntemle çalışıldığında yapılan işlemin kesin, doğru, özgün, tutarlı, geçerli, sağlam ve güvenilir olduğu garanti edilmiş olur. Yöntemin tespit limiti düşük, doğrusallığının ve değerlendirme aralığının geniş olması istenir [81].

Bugün uygulanan yeni toksikolojik test yöntemlerinin validasyon kriterleri, 1980'lerin başında yetkili düzenleme kuruluşlarında görev alan bilim adamlarının ve uzmanların ortak çabaları sayesinde geliştirilmiştir. Bu süreç 4 farklı kuruluşun gözetiminde yürütülmüştür. Bu kuruluşlar OECD, Alternatif Metotların Validasyonu için Avrupa Merkezi (The European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), Alternatif Metotların Validasyonu için Japon Merkezi, (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JACVAM) ve Alternatif Yöntemlerin Validasyonu Üzerine Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM)'dir. OECD, teşkilata üye tüm ülkelerde; ECVAM Avrupa'da; JECVAM Japonya'da; ICCVAM ise Amerika Bileşik Devletleri'nde alternatif testler ve validasyonları ile ilgili çalışmaları yürütür. Bu uluslararası kuruluşlar dış uzmanlar ve Tıbbi Deneylede Alternatif Deneysel Hayvanları Fonu (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments – FRAME), Hayvan Deneyleleri İçin Alternatif Yöntemler Merkezi (Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments-ZEBET) ve Hayvan Testi Alternatifleri Merkezi (The Center for Alternatives to Animal Testing- CAAT) gibi ulusal kuruluşlarla birlikte çalışarak farklı ülkeler ve kıtalar arasında validasyon kriterlerinin uyumluluğu konusunda önemli farklılıklar olmadığını belirlemektedir [82-87].

EpiSkin ve EpiDerm Testlerinin Validasyonu (2007) [66]: ECVAM, Deri İritasyon Validasyon Çalışmaları'nı (The ECVAM Skin Irritation Validation Study, SIVS) 2003 ve 2007 yılları arasında yapmıştır. SIVS, kimyasal işlevselliği geniş bir yelpazede olan deri iritasyon çalışmalarında kullanılacak 58 test maddesini içeren prospektif bir validasyon çalışmasıdır. İki fazlı olan bu çalışmada, Faz I aşamasında EpiDerm, EpiSkin ve deri bütünlüğü fonksiyon testi (Skin Integrity Function Test, SIFT) değerlendirilmiştir. Faz 2 aşamasına yalnızca EpiDerm ve EpiSkin geçmiştir. Bu çalışmada test maddelerinin seçimi Birleşmiş Milletler (UN) tarafından yayımlanan UN GHS (United Nations *Globally Harmonized System*) kılavuzu göz önüne alınarak planlanmıştır. Ayrıca, hücre canlılığının analizi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, [MTT yöntemi kullanarak) ile birlikte, inflamatuvar aracı madde olan IL-1 $\alpha$  salınımı da incelenmiştir. ECVAM, SIVS sonrasında EpiSkin test metodunun iritan ve iritan olmayan maddelerin ayrımını sağlamada güvenilir bir yöntem olduğu belirtmiştir; ancak EpiDerm test yönteminin sadece iritan maddelerin tanımlanmasında güvenilir olduğunu, iritan olmayan maddeler için bazen yanlış pozitif cevaplar verebildiğini ifade etmiştir. EpiDerm yöntemi için ECVAM Bilimsel Danışma Kurulu (ECVAM's Scientific Advisory Committee-E-SAC) tarafından 2007 ve 2008 yılları arasında daha ileri optimizasyon çalışmalarının yapılması önerilmiş ve EpiDerm metodunun validasyonunun güncellenmesine izin verilmiştir.

EpiDerm ve SkinEthic Testlerinin Validasyonu (2008) [64,69]: ECVAM deri iritasyon performans standartlarına dayanarak ve EpiDerm ve SkinEthic testlerini kullanarak, endüstrinin iki

eşdeğer validasyon çalışması yapmasına onay vermiş ve endüstri testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi için ECVAM'a sunmuştur. Valide EpiSkin yöntemi ile karşılaştırıldığında, SkinEthic testi ECVAM tarafından benzer bir yöntem olarak kabul edilmiştir. ECVAM, EpiDerm yönteminde ise, protokoldeki maruziyet süresinin 15 dakikadan 60 dakikaya uzatılmasını önermiştir.

UN GHS kapsamında üç metodun performansı (2009) [67]: 2009 yılı Nisan ayında sözü edilen bu üç *in vitro* test yönteminin (EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic) performansları ECVAM tarafından valide edilmiştir. Üç yöntemin de, "Avrupa Birliği Tehlikeli Madde Direktifi" ile ilişkilendirilmiş olan AB sınıflandırma sistemine göre, iritan maddeleri herhangi bir etikete sahip olmayan maddelerden ayırmasını yapabildiği sonucuna varılmıştır.

#### 4.5. Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi Modellerinden Elde Edilen Sonuçların *In vivo* Yöntem ile Karşılaştırılması

Literatürde tavşanlar üzerinde test edilen kimyasal maddelerin, "irritan" ve "irritan olmayan" şeklinde sınıflandırmalarıyla ilgili tanımlamalar eksiktir ve bu nedenle, elde edilen veriler bu kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki etkisini tahmin etmek için yeterli değildir. Ayrıca, kimyasal maddelerin *in vivo* irritasyon testlerinden elde edilen sonuçları gerçek irritasyon potansiyelleri ile karşılaştırıldığında, çelişkili verilerin elde edildiği belirtilmiştir [46,49]. Tavşan derisi, insan derisine göre daha hassastır ve bu nedenle bazı kimyasal maddelerin irritasyon yapma etkilerine daha duyarlıdır [50,88-91]. Morfolojik olarak insan epidermisiyle karşılaştırıldığında *in vitro* yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli tavşan derisine kıyasla insan epidermisine daha yakın bir yapı gösterir. *In vitro* yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli, *in vivo* yöntemlerdeki saç folikülleri, yağ bezleri, deri irritasyonunda rolü olduğu bilinen sinir ve immün hücreler gibi tüm işlevsel öğeleri içermese de, 4h-HPT ile anlamlı derecede korele sonuçlar vermiştir [5,46,49].

Test yöntemleri karşılaştırıldığında ise, *in vitro* yöntemde maruziyet süresi (15-60 dakika) *in vivo* yöntemdekine göre (4 saat) daha kısadır. Bu farklılık *in vitro* modellerin deri irritasyon reaksiyonlarında rol alan bileşenlerin *in vivo* yöntemde göre daha basit bir yapıdan oluşması ile açıklanabilir. Diğer taraftan uygulanan test maddelerinin hacimleri *in vivo* yöntemde kıyasla daha düşük miktardadır [80]. Renkli maddelerin kullanılması ise, *in vivo* yöntemde tavşanların deri ve deri kızarıklığının skorlanmasını zorlaştıran bir diğer etmendir [92]. *In vivo* yöntemin aksine *in vitro* yöntemde test metodunun fonksiyonel kontrolü için negatif ve pozitif kontroller kullanılmaktadır. Aynı zamanda OECD kılavuzu, *in vitro* yöntemi uygulanmadan önce laboratuvarların teknik yeterliliklerinden emin olmaları için sınıflandırılması tamamlanmış kimyasal maddeleri bu yöntemle doğrulama önerisinde de bulunmaktadır [80].

EpiDerm ve EpiSkin metotları *in vivo* 4h-HPT ile karşılaştırıldığında, bu modellerin iritan maddelerin sınıflandırılmasında daha duyarlı olduğu ve doğru sonuçlar verdiği bulunmuştur [52]. EpiSkin model Draize testi ile karşılaştırıldığında yalnızca %56 paralellik göstermiş olmasına rağmen, *in vivo* 4h-HPT ile %76 paralellik göstermiştir. Epiderm model Draize test sonuçları ile %56 oranında uyumlu sonuçlar verirken, 4h-HPT ile %70 oranında paralellik göstermiştir [93].

### 5. Türkiye'de Kozmetik Ürün Güvenliliğinin Değerlendirilmesi

Ülkemizdeki ekonomik gelişmeye bağlı olarak, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri pazarı her yıl ortalama %10 büyümektedir. Bu durum dünya pazarıyla paralellik göstermektedir. Türkiye'de pazarlanan ürünlerin sadece %10'unu Türkiye'de üretilen ürünler oluşturmaktadır. Saç bakım

ürünleri, sektör ürünleri içinde en büyük paya sahiptir ve bu ürünler arasında şampuanlar saç bakım ürünlerinin yaklaşık %59'unu oluşturmaktadır. Traş ürünleri, tüy dökücüler, banyo ve duş ürünleri, el sabunları, dudak ve göz makyaj malzemeleri, deodorantlar, ter önleyici ürünler, parfümler, kolonyalar ve bebek bakım ürünleri başlıca tüketilen ürünlerdir. Ülkemizde son yıllarda sektörde doğal sabunlar, şampuanlar, diğer saç bakım ürünleri ve saç boyaları, cilt bakım ürünleri, vücut bakım ürünleri ve diğer doğal kozmetikler üretilmeye başlanmıştır. Pazarda doğal kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin payının %5 civarında olduğu tahmin edilmektedir [94].

“Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz”, “üretici tanımı” vasfıyla piyasaya kozmetik ürün arz eden üreticiler için hazırlanmıştır. Bu kılavuzda kozmetik ürünün güvenlilik raporunun nasıl ve kimler tarafından hazırlanabileceği açıklanmış ve bu raporda yer alması gereken bölüm ve hesaplamaların neler olduğu belirtilmiştir [14]. “Kısım B- Kozmetik Ürün Güvenlilik Değerlendirmesi” bölümünde kozmetik ürünlerinin deri iritasyonu, korozyonu ve duyarlanması oluşturma risklerinin ve fototoksik ve genotoksik etkilerin güvenlilik dosyasında değerlendirilmesi istenmiştir. Ayrıca güvenlilik raporunda kozmetik ürünlerin sistemik toksisiteyi, kozmetik ürünlerde istenmeyen etkiler, kozmetovijilans ve toksikolojik analizlerde kullanılan alternatif test yöntemleri hakkında bilgi verilmesi istenmiştir. “Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürün Bilgi Dosyasının İçermesi Gerekenlere İlişkin Kılavuz”da ise, ürün bilgi dosyasında yer alması gerekenler, kozmetik ürünlerin kullanımı sonucu oluşan istenmeyen etkiler/ciddi istenmeyen etkiler hakkında mevcut veriler, kozmetik ürün iddiaları, kozmetik ürün iddialarına yönelik çalışmaların nitelikleri, ürün bilgi dosyasının dili, ürün bilgi dosyasının güncellenmesi ve muhafaza edilmesi, ürün bilgi dosyasının güncellenmesi ve muhafaza edilmesi ve ürün bilgi dosyası ile ilgili diğer hükümlere dair bilgiler verilmiştir [95]. TİTCK Yayınladığı “Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi Ve Güvenlilik Değerlendiricisi Hakkında Kılavuz”da ise, Kozmetik Yönetmeliğinin 12. maddesinde yer alan güvenlilik değerlendirme yapan kişiler olan güvenlilik değerlendirme sorumluları için bilgiler vermektedir [96].

## 6. Sonuç

Avrupa Birliği Kozmetik Direktifine göre kozmetik ürünlerin güvenlilik değerlendirmelerinin deney hayvanları kullanılarak yapılması 11 Mart 2013 tarihinde yasaklanmıştır [53]. Avrupa’da, kozmetik amaçlı kullanılan koroziv, iritan ve iritan olmayan maddeleri belirlemede hayvan testlerinin yerini valide *in vitro* metotlar almıştır [74]. Alternatif metotların geliştirilmesi son yıllarda geleceğe yönelik umut vermekte, ancak bazı toksisite testleri için tam olarak deney hayvanlarının yerini tutması henüz mümkün görünmemektedir. Komisyon yine de geleceğe yönelik en uygun yol olarak pazarlama yasaklarının devam ettirilmesi görüşündedir. Özellikle 2013 pazarlama yasasının tutarlı uygulanmasının sağlanması ve bunun etkilerinin gözlemlenmesi, yeni alternatif metotların geliştirilmesi ve valide edilmesi, uluslararası işbirliğinin ayrılmaz bir parçası olmuştur. Pazarlama yasağı, insan güvenlilik değerlendirmesine ilişkin köklü bir değişiklik getirmiştir [52,53].

Bugün uygulanan yeni toksikolojik test yöntemlerinin validasyon kriterleri ECVAM, JECVAM ve ICCVAM’ın çalışmalarıyla ortaya konmaktadır ve OECD bu yöntemleri kılavuz haline getirmektedir. Bu büyük kuruluşların ulusal fon, merkez veya kuruluşlarla birlikte çalışması ile farklı ülkeler ve kıtalar arasında validasyon kriterlerinin uyumluluğu sağlanmıştır. Yeni kozmetik ürünlerin toksikolojik çalışmaları *in vitro* test yöntemleri kullanılarak yapılmalıdır. Avrupa Birliği’nin

yasağından önce güvenilirlik değerlendirmeleri *in vivo* şartlarda yapılırsa da, bugün uygulanan *in vitro* alışmaların toplam sayısı deney hayvanlarıyla yapılan çalışmaların küçük bir kısmını karşılayabilmektedir. Yakın gelecekte *in vitro* yöntemlerin kullanımında artış olacağına inanılmaktadır. Halen uygulanmakta olan valide yöntemler mevcut olsa da, daha ileri çalışmalar için yeni metotların geçerliliği ve validasyonu sağlanmalıdır [97].

## Kaynaklar

1. Monterio-Riviere N. In: Riviere, J. (ed), Structure and Function of Skin. Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, NY. 2009:1-19.
2. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL, Khavari, PA: Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. Trends in Genetics 2013;29(1):31-40.
3. Eskes C: Application of alternative methods in the regulatory assessment of chemical safety related to human skin corrosion & irritation current status and future prospects, Swiss Federal Office of Public Health – FOPH. 2010.
4. Lavker RM, Sun TT: Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. Science 1982;215(4537):1239-1241.
5. Lavker RM, Sun TT: Epidermal stem cells. J Invest Dermatol 1983;81(1 Suppl):121s-127s.
6. Steinhoff M, Brzoska T, Luger TA: Keratinocytes in epidermal immune responses. Current Opinions in Allergy and Clinical Immunology 2001;1(5):469-476.
7. Basketter DA, Whittle E, Griffiths HA, York M: The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. Food and Chemical Toxicology. 1994;32(8):769-775.
8. Basketter D, Pease C, Kasting G, Kimber I, Casati S, Cronin M, Diembeck W, Gerberick F, Hadgraft J, Hartung T, Marty JP, Nikolaidis E, Patlewicz G, Roberts D, Roggen E, Rovida C, van de Sandt J: Skin sensitisation and epidermal disposition: the relevance of epidermal disposition for sensitisation hazard identification and risk assessment. Alternatives to laboratory animals (ALTA) 2007;35(1):137-154.
9. Sithamparanadarajah R. Diseases caused by dermal exposure to chemicals. In: Evans, PG. (eds), Controlling skin exposure to chemicals and Wet-working: a practical book. RMS Publishing, UK. 2008:15-24.
10. European Commision (EC) Cosmetics Directive: Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. (76/768/EEC). 1976. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31976L0768>.
11. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP): THE SCCP’S Notes of Guidance For The Testing of Cosmetic Ingredients And Their Safety Evaluation. 6th Revision. 2006. Available from: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_03j.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_03j.pdf)
12. Stitzel KA. Tiered testing strategies--acute local toxicity. ILAR J. 2002;43Suppl:S21-6.
13. European Commision (EC): Regulation (EC) No 1223/2009 of The European Parliament and of The Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products, Official Journal of the European Union. 2009. Available from: [http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/cosmetic\\_1223\\_2009\\_regulation\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf)

14. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi ve Güvenlilik Değerlendiricisi Hakkında Kılavuz. Available from: <https://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/Uploads/UnitPageAttachment/tYDCLux5.pdf>
15. 24/3/2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanunu. Yayımlandığı Resmi Gazete Tarihi: 30/3/2005, Sayı:25771, Tertip: 5, Cilt : 44. 2005.
16. İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri, Test Birimlerinin Uyumlaştırılması, İyi Laboratuvar Uygulamalarının Ve Çalışmaların Denetlenmesi Hakkında Yönetmelik, Resmi Gazete Tarihi: 09.03.2010 Resmi Gazete Sayısı: 27516. 2010.
17. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Descriptions of selected key generic terms used in chemical hazard/risk assessment: ENV/JM/MONO(2003)15— OECD Series on Testing And Assessment Number 44, OECD, Paris. 2003. Available from: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2003\)15&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2003)15&docLanguage=En).
18. Rice RH, Mauro TM. Toxic Responses of the Skin. (Klaassen CD, ed) Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Eighth Edition. 2012; 839-860.
19. Pauwels M, Rogiers V: Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010;243(2):260-274.
20. Berardesca E, Distant F: The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis* 1994;31(5): 281–287.
21. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris, France. 2002.
22. Robinson MK, Cohen C, de Fraissinette Ade B, Ponc M, Whittle E, Fentem JH: Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and Chemical Toxicology* 2002;40(5):573-592.
23. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 430: In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. 12pp.
24. Lores M, Llompart M, Alvarez-Rivera G, Guerra E, Vila M, Celeiro M, Lamas JP, Garcia-Jares C: Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls - A review. *Analytica Chimica Acta* 2016;915:1-26.
25. Natsch A: What Makes Us Smell: The Biochemistry of Body Odour and the Design of New Deodorant Ingredients. *Chimia (Aarau)* 2015;69(7-8):414-420.
26. Chiu CH, Huang SH, Wang HM: A Review: Hair Health, Concerns of Shampoo Ingredients and Scalp Nourishing Treatments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2015;16(12):1045-1052.
27. Welss T, Basketter DA, Schröder KR: In vitro skin irritation: facts and future State of the art review of mechanisms and models, *Toxicology in Vitro* 2004;18(3):231-243.
28. Osborne R, Perkins M.A: An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology* 1994;32(2):133–142.
29. Luger TA: Epidermal cytokines, *Acta Dermatologica Venereologica Suppl (Stockholm)* 1989;151: 61–76.
30. Nickoloff BJ, Naidu Y: Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin, *Journal of American Academy of Dermatology* 1994;30(4):535–546.
31. Corsini E, Galli CL: Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicology Letters* 1998;102-103, 277–282 (1998)
32. Dinarello CA: Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist, *International Reviewa of Immunology* 1998;16(5-6):57-99.



33. Stylianou E, Saklatvala J: Interleukin-1, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1998;30(10):1075–1079.
34. Camera E, Jensen C, Stab S, Scala G, Baadsgaard O, Picardo M: Correlation between antioxidant levels and skin reactivity to irritants, *Journal of Dermatological Science* 2003;16(1): 49-54.
35. Willis CM, Reiche L, Wilkinson JD: Immunocytochemical demonstration of reduced Cu,Zn-superoxide dismutase levels following topical application of dithranol and sodium lauryl sulphate: an indication of the role of oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *European Journal of Dermatology* 1998;8 (1):8–12
36. Rogers JV, Gunasekar PG, Garrett CM, Kabbur MB, McDougal JN: Detection of oxidative species and lowmolecular-weight DNA in skin following dermal exposure with JP-8 jet fuel. *Journal of Applied Toxicology* 2001;21 (6):521–525.
37. Camhi SL, Lee P, Choi AM: The oxidative stress response. *New Horizon* 1995;3(2):170–182.
38. Allen RG, Tresini M: Oxidative stress and gene regulation, *Free Radical Biology and Medicine* 2000;28(3):463–499.
39. Draize JH, Woodard G, Calvery HO: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1944;82, 377–390.
40. Basketter DA, Whittle E, Griffiths HA, York M: The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. *Food and Chemical Toxicology* 1994;32(8):769–775.
41. Basketter DA, Chamberlain M, Griffiths HA, Rowson M, Whittle E, York M: The classification of irritants by human patch test. *Food and Chemical Toxicology* 1997;35(8):845-852.
42. Basketter DA, York M, McFadden JP, Robinson MK: Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 2004;51(1): 1–4.
43. York M, Griffiths HA, Whittle E, Basketter DA: Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 1996;34:204-212.
44. Robinson MK, McFadden JP, Basketter DA: Validity and ethics of the human 4-h patch test as an alternative method to assess acute skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 2001;45(1):1-12.
45. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34.2005.
46. Weil CS, Scala RA: Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1971;19 (2):276-360.
47. Jirova D, Basketter D, Liebsch M, Bendova H, Kejllova K, Marriott M, Kandarova H: Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis* 2010;62(2):109-116.
48. Nixon GA, Tyson CA, Wertz WC: Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1975;31(3):481–490.
49. Phillips L, Steinberg M, Maibach HI, Akers A: A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 21, 369–382 (1972)
50. Benassi L, Bertazzoni G, Seidenari S: In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermatitis* 1999;40(1):38-44.

51. Zuang V, Balls M, Botham PA, Coquette A, Corsini E, Curren RD, Elliott GR, Fentem JH, Heylings JR, Liebsch M, Medina J, Roguet R, van de Sandt JJ, Wiemann C, Worth AP: Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *Alternatives to laboratory animals (ALTA)* 2002;30(1):109-129.
52. Eskes C, Detappe V, Koëter H, Kreysa J, Liebsch M, Zuang V, Amcoff P, Barroso J, Cotovio J, Guest R, Hermann M, Hoffmann S, Masson P, Alépée N, Arce LA, Brüscheweiler B, Catone T, Cihak R, Clouzeau J, D'Abrosca F, Delveaux C, Derouette JP, Engelking O, Facchini D, Fröhlicher M, Hofmann M, Hopf N, Molinari J, Oberli A, Ott M, Peter R, Sá-Rocha VM, Schenk D, Tomicic C, Vanparys P, Verdon B, Wallenhorst T, Winkler GC, Depallens O: Regulatory assessment of in vitro skin corrosion and irritation data within the European framework: Workshop recommendations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2011;62(2):393-403.
53. European Commission. Communication from the commission to the European Parliament and the council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics. 2013. Available from: [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/com\\_at\\_2013\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/com_at_2013_en.pdf)
54. European Commission. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* 2010; 276:33–79.
55. Kandárová H, Letašiová S: Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods, *Interdisciplinary Toxicology* 2011;4(3):107–113.
56. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J: In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research* 1991;193(2):310-319.
57. Niwa M, Nagai K, Oike H, Kobori M: Evaluation of the skin irritation using a DNA microarray on a reconstructed human epidermal model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009 ;32(2):203-208.
58. Hoffmann J, Heisler E, Karpinski S, Losse J, Thomas D, Siefken W, Ahr HJ, Vohr HW, Fuchs HW: Epidermal-skin-test 1,000 (EST-1,000)--a new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing. *Toxicol In Vitro* 2005;19(7):925-9.
59. De Wever B, Goldberg A, Eskes C, Roggen E, Vanparys P, Schröder K, Le Varlet B, Maibach H, Beken S, De Wilde B, Turchina C, Bogaert G, Bogaert J-P. Open Source"-Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through Openness, Transparency, and Collaboration, Promoted by the ALEXANDRA Association *Applied In Vitro Toxicology*. 2015;1:5-9.
60. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Hérin M, Coquette A: A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Archives of Dermatological Research* 2004;296(5):203-211.
61. Kandárová H, Liebsch M, Spielmann H, Genschow E, Schmidt E, Traue D, Guest R, Whittingham A, Warren N, Gamer AO, Remmele M, Kaufmann T, Wittmer E, De Wever B, Rosdy M: Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicology in Vitro*.2006;20(5):547-559.
62. Borlon C, Godard P, Eskes C, Hartung T, Zuang V, Toussaint O: The usefulness of toxicogenomics for predicting acute skin irritation on in vitro reconstructed human epidermis. *Toxicology* 2007;241(3):157-166.
63. Dumont C, Prieto P, Asturiol D, Worth A: Review of the Availability of In Vitro and In Silico Methods for Assessing Dermal Bioavailability. *Applied In Vitro Toxicology* 2015;1(2):147-164

64. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC). Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing. 2010.
65. Rosdy M: Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemical according to new OECD TG 431. *Toxicology in Vitro*. 2006;20:547–559.
66. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Performance Standards for In-Vitro Skin Irritation Test Methods 5 based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). 2009. Available from: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC8-updated\\_ECVAM\\_PS\\_2009.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC8-updated_ECVAM_PS_2009.pdf)
67. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC). Statement on the Performance under UN GHS of three in vitro assays for Skin Irritation testing and the Adaptation of the Reference chemicals and defined accuracy values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards. 2009.
68. Alépée N, Robert C, Tornier C, Cotovio J: The usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories. *Toxicology in Vitro*. 2014;28:616-625.
69. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC). Statement on the application of the SkinEthic™ human skin model for skin corrosivity testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee. 2006.
70. Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM: The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997;109(3):348-355.
71. Ponc M, Boelsma E, Gibbs S, Mommaas M: Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 2002;15 Suppl 1:4-17.
72. Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT: 6-Hydroxy-4-sphinganine in human epidermal ceramides. *Journal of Lipid Research* 1994;35(11):2060-2068.
73. Stewart, ME, Downing DT: A new 6-hydroxy-4-sphinganine-containing ceramide in human skin, *Journal of Lipid Research* 1999;40(8):1434–1439.
74. Ponc M, Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J, Mommaas M: Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmacy* 2000;203(1-2):211-225.
75. Boelsma E, Gibbs S, Faller C, Ponc M: Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Dermatologica Venereologica* 2000;80(2):82-88.
76. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R: Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993;1182(2):147-151.
77. Deshmukh GR, Kumar KH, Reddy PV, Rao BS: In vitro skin corrosion: Human skin model test - A validation study, *Toxicology in Vitro* 2012;26(6):1072-1074.
78. Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicology in Vitro* 2002;16(5):557-572.
79. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 439. Paris, France. 2010.

80. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Publishing, Paris. Available from: [http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716161e.pdf?expires= 1481878451&id=id&accname= guest&checksum= 7D973C344F4B0598966A14F512F519D7](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716161e.pdf?expires=1481878451&id=id&accname=guest&checksum=7D973C344F4B0598966A14F512F519D7).
81. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Validation & regulatory acceptance. Available from: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance>
82. Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JACVAM) Homepage. Available from: <http://www.jacvam.jp/en/index.html>
83. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM) Homepage. Available from: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu>
84. National Toxicology Program. About ICCVAM. Available from: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/index.html>
85. German Centre for the Protection of Laboratory Animals (Bf3R) ZEBET Homepage. Available from: <http://www.bfr.bund.de/en/zebet-58194.html>
86. Johns Hopkins University Center for Alternatives to Animal Testing Homepage. Available from: <http://caat.jhsph.edu/>
87. FRAME Homepage. Available from: <http://www.frame.org.uk/>
88. Wilhelmus KR: The Draize eye test. *Surveys in Ophthalmology* 2001;45(6):493-515.
89. Fentem JH, Briggs D, Chesné C, Elliott GR, Harbell JW, Heylings JR, Portes P, Roguet R, van de Sandt JJ, Botham PA: A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 2001;15(1):57-93.
90. Heylings JR, Diot S, Esdaile DJ, Fasano WJ, Manning LA, Owen HM: A prevalidation study on the in vitro skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation in vivo: results and evaluation of ECVAM Phase III. *Toxicology in Vitro*. 2003;17(2):123-38.
91. Kandárová H, Liebsch M, Genschow E, Gerner I, Traue D, Slawik B, Spielmann H: Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests. *Alternatives to animal experimentation (ALTEX)* 2004;21(3):107-14.
92. Portes P, Grandidier MH, Cohen C, Roguet R. Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 2002;16(6):765-770.
93. Worth AP, Cronin MTD: The use of bootstrap resampling to assess the variability of Draize tissue scores. *Alternatives to laboratory animals (ALTA)* 2001;29(5):557-573.
94. Kozmetik Sektörü. TC Ekonomi Bakanlığı. [http://www.ekonomi.gov.tr/portal/content/ conn/UCM/uuid/dDocName:EK-051185](http://www.ekonomi.gov.tr/portal/content/conn/UCM/uuid/dDocName:EK-051185)
95. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürün Bilgi Dosyasının İçermesi Gerekenlere İlişkin Kılavuz. Available from: [https://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/ Uploads/UnitPageAttachment/ ynVWPID3.pdf](https://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/Uploads/UnitPageAttachment/ynVWPID3.pdf)
96. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi ve Güvenlilik Değerlendiricisi Hakkında Kılavuz. Available from: [https://www.titck.gov.tr/ PortalAdmin/Uploads/ UnitPageAttachment/tYDCLux5.pdf](https://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/Uploads/UnitPageAttachment/tYDCLux5.pdf).
97. Worth AP, Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. *Alternatives to laboratory animals (ALTA)* 2004;32 Suppl 1B:623-629.