

## KOZMETİKLER İÇİN KULLANILAN TOKSİSİTE TESTLERİ

**Her gün binlerce kimyasala maruz kalıyoruz**

### **İSTEYEREK :**

İlaçlar  
Gıdalardaki doğal kimyasallar  
Gıda katkı maddeleri  
**Kozmetikler**

### **İSTEMEDEN :**

Gıdalardaki kimyasal  
kirleticiler  
Çevre kirleticileri  
Mesleki kimyasallar

**1 gün ~ 15 farklı ürün 200 farklı kimyasal**

**% 60'ı vücut tarafından emilme**

**Bir bayan her yıl yaklaşık 2.25 kilo kozmetik tüketiyor !!!**

### **Geçmişten günümüze...**

Bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı kozmetik ürünler, teknolojinin ilerlemesiyle sentetik ürünleri de içermeye başlamışlardır.

İlk bakışta zararsız oldukları düşünülen kozmetiklerin;

- İnsanoğlunun vazgeçilmezleri olmaya başlamaları,
- Yaşam sürecinin oldukça büyük bir diliminde kullanılmaları nedeniyle,

Kozmetik ürünlerin ve bileşenlerinin gerek üretim ve gerekse tüketimi sırasında güvenli(li)ğinin ve zararsızlıklarının belirlenmesinde toksikolojik profili önem kazanmaktadır.

### **1976 KOZMETİK ÜRÜNLER DİREKTİFİ (76/768/EEC)**

Topluluk içinde pazara sürülen bir kozmetik ürünü, normal ya da makul şekilde öngörülebilir kullanım koşulları altında tatbik edildiğinde insan sağlığına zarar vermemelidir (Madde 2)

#### **Kaygılanmalıyız, çünkü;**

- \* Sandığınızdan daha fazla kozmetik ürün kullanıyorsunuz
- \* Kozmetik etiketleri, tüm içerik listesini taşıyor
- \* Parfümlerde toksik maddelerin listesi ise hiç bulunmuyor...

### **Toksosite profilinin belirlenmesi için:**

Fiziksel ve kimyasal özellikleri  
Toksikokinetik özellikleri  
(Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon)  
Toksosite test verileri

## TOKSİSİTE TESTLERİ

### Kimyasal maddenin;

Biyolojik sistemlerde meydana getirdiği zararlı etkilerini ve Doz-cevap ilişkisini saptamak için yapılır.

### DOZ & MARUZ KALMA SÜRESİ ÖNEMLİ

Fare, sıçan ve kobay gibi kemirici deney hayvanlarına farklı dozlarda ve sürelerde kimyasal madde uygulanır.

### GENEL TOKSİSİTE TESTLERİ

Kimyasal maddenin kısa, orta ve uzun süreli etkilerini belirlemek için uygulanır.

1. Akut toksisite (oral, dermal, inhalasyon) testleri
2. Subakut toksisite testleri
3. Subkronik toksisite testleri
4. Kronik toksisite testleri

### ÖZEL TOKSİSİTE TESTLERİ

Kimyasal maddenin genel toksisite testleri ile saptanamayan özel toksik etkilerini belirlemek için uygulanır.

1. Karsinojenite testleri
2. Mutajenite testleri
3. Teratojenite testleri
4. İmmunotoksisite testleri
5. Nörotoksisite testleri
6. Transplasental karsinojenite testleri
7. Üreme ve gelişim toksisite testleri

### Toksisite testleri

#### Epidemiyolojik arařtırmalar

- *In vitro* testler
- QSAR çalışmaları (Yapı-aktivite)

Toksisite testleri çalışmaları sonucunda kimyasal maddenin güvenli kullanımı için sayısal veriler elde edilir.

Deney hayvanlarından elde edilen verilerle insandaki etkilerinin tahmini öngörülür.

**Kozmetik Ürünleri Direktifi (76/768/EEC)1976 SSCNFP-Scientific Committee on Cosmetics and Non Food Products (Kozmetikler ve Gıda Dışı Ürünler Bilimsel Komitesi)**

### Güven(li)lik

Bir etkenin belirli koşullarda advers etki (toksik etki) gösterMEmesi

## İKİNCİ BÖLÜM

### Kozmetik Ürünlerin Nitelikleri

**Madde 6** — Piyasaya arz edilen bir kozmetik ürün, normal ve üretici tarafından

öngörülebilir şartlar altında uygulandığında veya ürünün sunumu, etiketlenmesi, kullanımına dair açıklamalara veya üretici tarafından sağlanan bilgiler dikkate alınarak önerilen kullanım şartlarına göre uygulandığında, insan sağlığına zarar vermeyecek nitelikte olmalıdır.

Her ülkede tüketici sağlığını koruma adına üreticilere büyük sorumluluklar getiren yasal düzenlemeler bulunmaktadır.

ABD, AB, Japonya 'da **Kozmetik Ürün Güvenliliğinin değerlendirilmesi** konusunda farklı yaklaşımlar bulunmaktadır.

Ülkemizde de 2005 yılında yürürlüğe giren Kozmetik Kanunu ve yönetmeliği AB ile uyumlu hale getirildi

### **Kozmetik Yönetmeliği: 07.06.2005**

#### **ÜÇÜNCÜ BÖLÜM**

Sorumluluk, Denetim ve Bildirim

.....**Denetim Esasları,**

**Madde 12.**

d) Bitmiş üründe **insan sağlığı için güvenlik değerlendirmesi**; bunun için üretici, ürün bileşenlerinin toksikolojik karakteri, kimyasal yapısı ve maruz kalma seviyelerini göz önüne alır. ....

**Güvenlilik (Risk Değerlendirme) değerlendirmesi gerekiyor.....**

Kozmetik ürün bileşenlerinde yapılan toksisite testlerinin kapsamı;

- Kimyasal maddenin üretim miktarı
- Kozmetik ürün tipine göre değişir.

UV filtreleri  
Saç boyaları  
Parfümler...

Güvenlilik profilleri için daha kapsamlı toksisite testleri gerekiyor!!!!!!

### **KOZMETİK ÜRÜNLERDE YAPILAN TESTLER**

Dayanıklılık testleri  
Kullanılış testleri  
Fizyolojik testler  
Kalite kontrol testleri

## Dayanıklılık Testleri

Hazırlanan ürünün kullanılma ve depo edilme süresince, istenilen özelliğini koruyup koruyamayacağını kontrolüdür.

## Kullanılış testleri

Ürünün istenilen amaca erişip erişmediğini, çoğunluğun isteklerine cevap verecek özellikte olup olmadığını, aynı tür ürünler arasındaki durumunu saptamak amacı ile yapılır.

## Fizyolojik testler

İki grup olarak incelenebilir:

- 1) Tıbbi etkisi olan preparatların istenilen özelliklerinin “**linik testler**” ile saptanması,
- 2) Preparatın herhangi bir biçimde zararlı olup olmadığı, fizyolojik bir etki yapıp yapmadığının incelendiği “**toksiste testleri**”dir.

## Kalite kontrol testleri

Preparatın istenilen standartlara uyup uymadığı, imalatın uygun şartlarda yapılıp yapılmadığının kontrol edildiği ve imalat serileri arasındaki farkları ortaya koyan testlerdir.

### *Kozmetik endüstrisi*

**AB: 2000 firma Her yıl 5000 yeni ürün**

**2003: AB Kozmetik Yönetmeliğinin 7nci maddesinde değişiklik  
⇒ Alternatif yöntemler için ciddi bir ihtiyaç oluşumu**

### Alternatif yöntemler

**ÇIKIŞ NOKTASI:**

### 3 R YAKLAŞIMI

- 1) **REPLACEMENT (Değiştirme)**
- 2) **REDUCEMENT (Azaltma)**
- 3) **REFINEMENT (Arındırma)**

**TEMEL AMAÇ:**

**HAYVANLARIN KULLANILMADIĞI YÖNTEMLER BULMAK, BU MÜMKÜN DEĞİLSE  
EN AZ SAYIDA HAYVANIN KULLANILMASI VE MÜMKÜN OLAN EN RAHAT  
ORTAMIN SAĞLANMASI (DENEY HAYVANI REFAHI)**

Avrupadaki Düzenleyici Uygulamalar  
Avrupadaki Düzenleyici Uygulamalar (devamı)

- AB Kozmetik Yönetmeliği 76/768/EEC
- Konsey Yönetmeliği 86/609/EEC (hayvanlar ile ilgili yönetmelik)

• Yeni AB Kimyasallar Mukavelesi (REACH)\*

\* Kaydetmek (Registration), değerlendirmek (Evaluation), ruhsatlandırmak (Authorization), kimyasalların sınırlandırılması (Chemical limitations)

AB Kozmetik Yönetmeliği

76/768/EEC yönetmeliği 15 madde ve 8 ekten oluşmaktadır.

Ekler üzerinde, SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetics and Non Food Products) Komitesi tarafından gerektiğinde değişiklikler yapılmaktadır

**Son 27 senede 30 değişiklik !**

**En önemli değişiklikler**

1993 teki 6. değişiklik (93/35/EEC, 1993)

2003 teki 7. değişiklik (03/15/EEC, 2003)

**6. Değişiklik (1993)**

- Kozmetik ürün bileşenlerinin tanımlayıcı bir envanterinin oluşturulması
- Güvenlik gereksinimlerinde daha katı bir yaklaşım
- Son ürün hakkında bilgi gereksinimleri
- 1 Ocak 1998'den itibaren kozmetik içeriklerinin hayvan deneyleri ile test edilmesinin yasaklanması bunun yerine alternatif yöntemlerin uygulanması kararlaştırılmıştır

**7. Değişiklik (2003)**

Kozmetik ürünlerde hayvan çalışmalarının yasaklanmasını desteklemek amacı ile çıkarılmıştır. Bu değişiklikte; kozmetik ürün bileşenleri için 11 Mart 2009'dan itibaren, tekrarlanan doz toksisitesi, toksikokinetik ve üreme toksisitesi deneyleri hariç, *in vivo* hayvan çalışmalarını yasaklarken belirtilen bu deneylerin de 11 Mart 2013 tarihinden itibaren kısıtlanacağını öngörmüştür.

**Validasyon için Anahtar kuruluşlar**

Avrupa:

ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)

Amerika:

ICCVAM (Interagency Co-ordinating Committee for the Validation of Alternative Methods)

**Alternatif yöntemlerin avantajları**

Hayvanlara daha az bağımlılık

Objektif sonuçlar

Toksikolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılması

Kısa sürede daha fazla test imkanı

Uzun vadede daha az gider

## **Alternatif yöntemlerin dezavantajları**

Geçiş için süre kısa

Oturmuş yöntemlerin yerine yenisini koymak zaman alıcı

Küçük ve orta sermayeli şirketlerin yeni deneylere geçişi ekonomik açıdan önemli

Bu testler ile güvenilirlik sağlanabilecek mi????

## **70'lerden sonra hayvan kullanımında azalma**

*in vitro* metodların geliştirilmesi

Laboratuvar Hayvanı Bilimi

Uluslararası anlaşmalar- *toksosite çalışmaları*

Pahalı

Protestolar -*planlamada daha dikkatli, alternatif metodlar*

Transjenik hayvanlar- *kullanım artacak mı?*

SCCNFP

SCCNFP

DG Sanco olarak bilinen komisyonun bir parçası olup, üye ülkelerden gelen uzman yetkili bilim adamlarından oluşur. 6. ve 7. değişiklikten sorumlu olan tavsiye komisyonudur.

## **Kozmetik ürün ve bileşenleri için öngörülen alternatif kozmetik testleri**

- Dermal irritasyon
- Göz irritasyonu
- Dermal duyarlılık
- Akut fototoksosite
- Fotogenotoksosite

## **ECVAM**

Alternatif yöntemlerin geçerlenmesi (validasyonu) Avrupa Birliği seviyesinde ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) tarafından yürütülmektedir.

## **Alternatif *In vitro* Yöntemler**

### **TER Testi**

TER (Transcutaneous Electrical Resistance Assay):

Deri korrozivitesi için kullanılan bir *in vitro* yöntemdir. Sıçanların dorsal bölgelerinden alınan deri diskleri üzerinde 24 saat boyunca elektriksel direnç ölçümleri yapılır.

5 Kiloohmdan az olan bir direnç pozitif sonuç olarak kabul edilir.

### **SIFT Testi**

SIFT (Skin Integrity Function Test), fare derisindeki irritasyonu ölçen bir test olup EPIDERM® ve EPISKIN® ile birlikte Faz I ve Faz II çalışmalarında başarılı olmuş bir testtir. Faz III çalışmaları uygulanmaktadır.

Fare derisi bütünlük işlev testi

Kimyasala maruziyeti takiben fare derisinin bütünlüğünün değerlendirilmesine dayanmaktadır. Trans-epidermal su kaybı (TEWL) ve elektrik direnci (ERA) ölçülerek değerlendirme yapılır. Kimyasalların cilt irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik bir ön tarama yöntemi olarak geliştirilmiştir.

TEWL ya da ERA için uygulama öncesi ve sonrası değerlerin oranı beş kattan daha büyük ya da daha küçükse, bu durumda kimyasal “irritan” ya da “irritan değil” olarak değerlendirilir

### **İnsan modeline dayanan deri irritasyon/korrozyon testleri (EPIDERM<sup>®</sup>, EPISKIN<sup>®</sup>, CORROSITEX<sup>®</sup>)**

Model olarak insan epidermal keratinositlerinden elde edilen 3 boyutlu dokular kullanılır.

Bu model;

- Çok tabakalı ve farklılıklar içermeli
- *In vivo* ortamdakine benzer olmalı
- MTT Testi ile sonuçlar değerlendirilir.

### **MTT Testi**

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir.

Deneyin amacı, MTT testi ile formazan oluşumuna bağlı olarak mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin azaltılmasıyla hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesidir

MTT, **sarı** renkli olup hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile suda çözünmeyen mor renkli **formazan**'a indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltinin miktarı 500-600 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak hesaplanır. Bu olay sadece canlı hücrelerde gerçekleşebileceği için bu test, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır.

### ***Ex vivo* test:**

- Draize tavşan gözü testi

### **Alternatif *in vitro* testler:**

- BCOP
- IRE
- ICE / CEET
- HET - CAM

### **Draize Testi**

Draize göz tahriş testleri, ilk olarak 1944 de, ABD Gıda ve İlaç İdaresi çalışanlarından J.H. Draize'in, tavşanların gözlerine sıkılan bir maddenin ne kadar irritan olduğunu belirleyen bir derece geliştirmesiyle kullanılmaya başlandı.

Test maddesi, tavşanın tek gözüne damlatılır veya sürülür. Hayvanın alt göz kapağı dışarı çekilir ve madde konarak göz kapatılır. Tavşan, her gün gözlenerek, gözlerinde şişme, çıban, enfeksiyon ve kanama olup olmadığı saptanır.

### BCOP testi

BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test):

İzole edilmiş sığır korneasında opasiteyi indükleyen ve geçirgenliği arttıran oküler irritasyon ölçümü yapılır. Test maddesine maruziyetten sonra opasite ölçülür.

Daha sonra korneaya sodyum floresan uygulanır ve 90 dakika maruz bırakılır, optik dansite (OD) ölçümü ile geçirgenlik hesaplanır ve oküler irritasyon saptanır.

Sonuçların değerlendirilmesi

*In vitro* değer = ortalama opasite değeri x (15 x ortalama OD<sub>490</sub> değeri)

### IRE Testi

IRE (İzole edilmiş tavşan gözü) testi

(Burton ve ark., 1981), (Guerrero ve ark., 2004)

Test maddeleri katı veya sıvı halde izole gözün ön kısmına konur.

0.5, 1, 2, 3, 4 saat içinde ölçümler yapılır ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak **korneal opasite**, **korneal şişlik**, **fluoresan geçişi** ve **epitel bütünlük** açısından incelenir ve değerlendirilir.

- Korneal opasite  $\geq 3$  (0 ile 4 arasında değerler verilir)

- Korneal şişlik  $\geq \%25$

- Fluoresan geçişi  $\geq 4$  (0 ile 4 arasında değerler verilir)

- Epitel üzerinde gözle görülür bir hasar varsa

Bu kriterlerden en az birini oluşturan madde oküler korroziv/şiddetli irritant madde olarak değerlendirilir.

### ICE Testi

İzole edilmiş tavuk gözü testi

Test kimyasalı, izole tavuk korneasına uygulandıktan sonra şişlik veya opasite tarzındaki **korneal tepkiler** ve **fluoresan alıkonması** çeşitli zaman aralıklarında ölçülür. Her bir son nokta için maksimum ortalama değer cevap olarak kabul edilir ve bu verilere göre değerlendirme yapılır.

### HET-CAM Testi

Tavuk yumurtası koryoallantoik zar testi:

Amaç, test maddesinin oküler irritan özelliğinin, tavuk yumurtasının koryoallantoik zarının içindeki advers olayları indüklemeye yeteneğinin ölçülmesidir. 300 saniyelik periyotlarda oluşan olaylar kaydedilir.

IS: Irritasyon değeri (total etkiye göre)

A= ((301- Hemoraji zamanı) / 300) x 5

B= ((301- Lizis zamanı) / 300) x 7

C= ((301- koagülasyon zamanı) / 300) x 9

IS= A+B+C

### Alternatif dermal hassasiyet testleri

*In vivo* yöntemler (LLNA)

QSAR sistemleri (Bilgisayar destekli sistemler) Ör: DEREK<sup>®</sup> bilgi sistemi (*In silico* modeller)

Hücre kültürü sisteminin kimyasal kaynaklı tepkilerine dayalı olan *in vitro* modeller



**Lokal Lenf Dügümü Testi**  
**LLNA ve Son Nokta Mekanizması**  
LLNA Yönteminin Dezavantajları (ICCVAM Raporu)

➤ LLNA, [<sup>3</sup>H] metil timidin kullanılarak yapılan radyoaktif bir yöntemdir.

➤ Antijen spesifik immün cevabın veya non-spesifik enflamatuvar cevabın hücre proliferasyonuna neden olmasından dolayı irritasyon ve alerjinin tam olarak ayrılamamasıdır.

**QSAR Sistemleri**

İnsan sağlığı üzerindeki etkilerin ve ilişkili toksisitelerin tahminine yönelik bilgisayar destekli bir dizi yazılım paketi bulunmaktadır. Bu sistemler, toksisitenin doğrudan kimyasal yapıdan hareketle tahmin edilebilmesine olanak sağlarlar ve kullanım kolaylıkları ve hızla tatbik edilebilmelerinden ötürü kullanılmaktadırlar.

Ör: DEREK<sup>®</sup> bilgi sistemi

**DEREK<sup>®</sup> Bilgi Sistemi**

WINDOWS için LHASA Ltd. tarafından üretilmiş bir bilgi sistemidir. Modeller normal olarak toksikolojik bilgi ile ilgili genelde literatürden erişilen geniş veri gruplarının analizinin ardından çıkarılırlar. Moleküller, çok sayıda yapısal, topolojik ve elektropolojik indeksten herhangi biri ile karakterize edilirler. Modeller, devamlı uç noktalar için regresyon analizi ve toksisite verilerinin kategorize edilmesi için geliştirilirler.

Bu sistemle:

- Bir kimyasalın dermal hassasiyet oluşturup oluşturmadığı tahmin edilebilir.
- Bir kimyasalın genotoksik, mutajenik ve karsinojenik olup olmadığı tahmin edilebilir.
- İritasyondan hepatotoksisiteye kadar çok geniş bir yelpazedeki toksikolojik tehlikeler hakkında aydınlatıcı bilgiler alınabilir.

**3T3 NRU PT**

**3T3 NRU Fototoksisite testi**

**3T3 NRU (3T3 Neutral Red Uptake) testi:**

Balb/c fare 3T3 fibroblast hücre kültüründe uygulanan ve UV A maruziyeti ile kimyasalların fototoksisite potansiyelini ölçen bir yöntemdir. Hücre yaşayabilirliği nötr kırmızı (Neutral red) boyasını tutabilme kapasitelerinin inhibisyonunu ile ölçülür ve % inhibisyon EC50 değeri olarak ifade edilir.

Foto iritasyon faktörü (PIF)

Ortalama foto etki (MPE)

PIF < 5 ya da MPE < 0.1 = "fototoksisite yok"

PIF > 5 ya da MPE > 0.1 = "fototoksisite".

**RBC Fototoksisite Testi**

Eritrositlerdeki fototoksisitenin önemli uç noktaları serbest radikal üretimi ve hemoglobin

oksidasyonudur. Eritrositler ile yapılan fototoksisite testlerinde methemoglobin oluşumu sıklıkla gözlemlendiği için, hem fotohemoliz hem de hemoglobin oksidasyonu RBC-PT ile test edilebilir. Bu yaklaşım, insan üzerine fototoksik maddelerin taranmasına ve mekanizmalarının hücreseel düzeyde incelenmesine olanak sağlar.

### **3-D İnsan Cildi Modeli *In Vitro* Fototoksisite Testi (H3D PT)**

İnsan cildi modelleri (3-D Cilt Modelleri), *Dermal* Modeller (fibroblastlar), *epidermal* modeller (keratinositler ve stratum korneum) ve *tam cilt* modelleri (fibroblastlar, keratinositler ve stratum korneum) olmak üzere üç farklı tiptir. Son iki tip yaşayabilir, metabolize olan birincil cilt hücrelerini ve bir cilt bariyerini içerdiğinden, her ikisinden de sıklıkla “3-D cilt modelleri” olarak söz edilir.

### **3D İnsan Cildi Modeli *In Vitro* Fototoksisite Testi (H3D PT) (devamı)**

Korneum engeli nedeniyle, H3D PT testinin önemli bir rolü de 3T3 NRU PT testinde elde edilen sonuçları doğrulamaktır. H3D PT, kimyasalların için fototoksik potansiyelinin değerlendirilmesi için tek başına kullanılacak bir test değildir.

RBC PT ve H3D PT, ECVAM tarafından 3T3 NRU PT’de pozitif sonuçlar veren kimyasalların daha ayrıntılı şekilde araştırılmasında kullanılacak ek testler olarak ön-validasyondan geçmişlerdir.

Rutin kullanımlarına rağmen, bugüne kadar yeni foto-genotoksisite testlerinden hiçbiri resmi validasyonu tamamlamamıştır. Ancak Foto-MN ve Foto-COMET için şu anda laboratuvarlar arası validasyon çalışması devam etmektedir.

Fotosensitizasyon için şu an için gelecek vaat eden bir *in vitro* yöntem yoktur. Şu anda geliştirilmekte olan tek alternatif, Lokal Lenf düğümü (LLNA) *in vivo* yönteminin modifikasyonu olan Foto-LLNA üzerinedir.