

TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU
KOZMETİK ÜRÜNLER VEYA HAMMADDELERİ İLE YAPILAN
PERKÜTAN ABSORPSİYON/PENETRASYON TESTLERİNE İLİŞKİN
KILAVUZ

Amaç

MADDE 1- Bu kılavuz, kozmetik ürünler veya hammaddeleri ile yapılacak olan perkütan absorpsiyon/penetrasyon testlerinde yol göstermek amacıyla hazırlanmıştır.

Kapsam

MADDE 2- Bu Kılavuz, Kozmetik Yönetmeliğinin 4 üncü maddesinde yer alan üretici tanımı vasfıyla piyasaya kozmetik ürün arz eden üreticileri ve kozmetik ürünlere ilişkin test hizmeti sunan müesseseleri kapsar.

Dayanak

MADDE 3- Bu Kılavuz; 30/03/2005 tarihli, 5324 sayılı Kozmetik Kanununun 4 üncü maddesinin (d) bendi ve 23/05/2005 tarihli, 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliğinin 6 ncı maddesine dayanılarak hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 4- (1) Bu Kılavuzda geçen;

- a) *In vitro*: Laboratuvar ortamında ya da yapay koşulları,
- b) *In vivo*: Yaşayan organizmadaki ,
- c) *Ex vivo*: Canlı organizmadan çıkarılan organ, doku veya hücrenin canlı ortamını taklit eden yapay laboratuvar koşullarını,
- d) Perkütan penetrasyon: Test materyalinin derinin *stratum corneum* tabakasının yüzeyinden sistemik dolaşıma geçmesini,
- ç) Perkütan absorpsiyon: Topikal olarak uygulanmış materyalin derinin içine geçmesini,
- d) *Stratum corneum*: Epidermisin ölü hücrelerden oluşan en üst tabakasını, ifade eder.

Absorpsiyon/penetrasyon testlerine ilişkin genel bilgiler

MADDE 5- (1) Kozmetik Yönetmeliğinde yapılan son değişiklikler hayvan testleri hususunda yasaklar içermektedir. Bu nedenle maddelerin perkütan absorpsiyon/penetrasyon özelliklerinin değerlendirilmesi için etik sebepler ve uygulanabilirlik koşulları da göz önünde bulundurulduğunda *in vitro* (üç boyutlu yapılandırılmış deri modelleri) veya *ex vivo* (canlıdan çıkarılmış deri örnekleri) yöntemler tavsiye edilmektedir. Perkütan absorpsiyon/penetrasyonu canlılarda etkileyen parametreler: biyolojik faktörler, derinin fizyolojik durumu, deriye uygulanan madde veya karışımın fizikokimyasal özellikleri, deriye uygulanan formülasyonun yapısı olarak özetlenebilir. Kozmetik amaçlı testler için kesilmiş ve standardize edilmiş deri, çeşitli türlerden (kesim hayvanları) elde edilebilmektedir.

(2) Genellikle, penetrasyon testleri için derinin canlılığı bir ön koşul değildir, süreç pasif difüzyona dayalı olarak yürür. Ayrıca çoğunlukla metabolizma düşük öneme sahip olup istisnai durumlarda metabolizma izlenebilir.

(3) Bu kılavuz, kesilmiş memeli derisi (kesim hayvanlarından elde edilen) kullanılarak yapay koşullarda maddelerin deriden geçişini ölçme amaçlı yöntemlere ilişkin genel hususlara değinmektedir. Perkütan absorpsiyon veya penetrasyonun araştırılması amacıyla kullanılacak yöntemlerin standardize edilmiş ve geçerliliği kanıtlanmış yöntemler olması ve bu amaçla güncel bilimsel yöntemler olması gerekmektedir. Bu doğrultuda, referans kaynaklar veya kılavuzlara başvurulabilir (farmakope ve/veya İktisadi İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı-OECD kılavuzları).

(4) Derinin bariyer özellikleri genelde vücuttan çıkarıldıktan sonra da devam eder ve derin dondurucuda 3 aya kadar uygun koşullarda (-20 °C, -30°C) saklanması ile devam edebilir. Çünkü bütünlüğü kontrol edilecek temel difüzyon bariyeri olarak *stratum corneum* tanımlanmıştır.

(5) Perkütan absorpsiyon/penetrasyon kozmetik bileşenlerin ve bu bileşenleri içeren kozmetik ürünlerin güvenilirlik değerlendirmesi için önemli bir parametredir. Absorpsiyon/penetrasyonun tespit edilmesi topikal uygulama ile maruziyet sonucu sistemik toksisitenin değerlendirilmesini mümkün kılar. Güvenlilik değerlendirmesinde benzer deneylerden elde edilen çıktılara dayanarak genel güvenilirlik değerlendirmesi kapsamında olan hayvanda toksisite çalışmaları, bu kılavuzda değinilen yöntemlerin kullanımı ile en aza indirgenebilir. Benzer çalışmaların sonuçları diğer gerekli test tasarımlarının optimizasyonu için yol gösterici olacaktır.

(6) Bu kılavuzda değinilen yöntemler, *stratum corneumun* perkütan absorpsiyonda hız sınırlayıcı bariyer olduğu durumlar hakkında bilgi verir ve bu nedenle hedeflenen reseptör sıvısında yeterli çözünürlüğe sahip olan bileşenlere uygulanabilir. *In vivo* durumu tahmin etmek için yapılacak *in vitro/ex vivo* perkütan absorpsiyon/penetrasyon yöntemlerinin kullanılabilmesi için *in vivo* ile korelasyonu hususunun değerlendirilmesi ve çalışılması önem kazanır. Uygun şekilde hazırlanmış (tam kalınlıkta, kısmi kalınlıkta veya izole edilmiş epidermis) deri membranlarının kullanımı sistemik dolaşıma geçen ve epidermis veya dermise geçen bileşen miktarının ölçülmesine imkân sağlar.

(7) *Ex vivo* yöntemin avantajları uygun türlerden alınan derilerin kullanılabilmesi, canlı hayvana ihtiyaç duyulmaması ve vücutta metabolize edilen bileşikler için de uygun olmasıdır.

(8) *Ex vivo* yöntemde test edilecek madde doğrudan ya da uygun bir çözücüde veya bir formülasyonda çözünmüş halde, durgun ya da sürekli akış durumunda çalıştırılabilen difüzyon hücresinin (Franz tipi difüzyon hücresi kullanılabilir) alt ve üst odacıklarını/kompartmanlarını ayıran deri diskinin verici/donör kompartman tarafında bozulmamış yüzeyine uygulanır. Test örneği belli bir süre (durulanan veya durulanmayan, amaçlanan kullanım koşullarına göre) deri ile temasta kalır. Reseptör kompartmanda yer alan reseptör sıvıdan testin sonunda veya belirli

zaman aralıklarında örnek alınır. Deri örnekleri ve/veya sıvı örnekler uygun bir yöntem ile (örn: Sıvı Sintilasyon Sayıcı- Liquid Scintillation Counter-LSC, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-High Performance Liquid Chromatography-HPLC veya Gaz Kromatografisi-Gas Chromatography-GC) analiz edilir. Bariyerin bütünlüğü uygun bir yöntemle kontrol edilmelidir.

(9) Penetrasyon hücresi deri membran ile ayrılmış üstte donör kompartman ve altta reseptör kompartmandan oluşur. Derinin epidermis kısmı donör kompartman tarafına bakar ve alt yüzeyi reseptör kompartman tarafındadır. Deney süresince sıcaklık kontrolü oldukça önemlidir. Reseptör sıvının deney boyunca iyi karışıyor olmasına dikkat edilmelidir. Örnekleme ise uygun hücre tasarımı ile yapılmalıdır.

(10) Reseptör sıvının kompozisyonu test maddesinin penetrasyonunu sınırlamamalıdır (örn: teorik toplam çözünürlüğü garanti etmelidir). Reseptör sıvı derinin bütünlüğünü ve permeabilitesini değiştirmemelidir. Hidrofilik bileşenler için tuz veya tamponlanmış tuz çözeltisi önerilebilir. Lipofilik bileşenler için ise serum albumin veya non-iyonik sürfaktanlar gibi diğer uygun çözücüler kullanılabilir. Uygun reseptör sıvı hacmi test maddesinin çözünürlüğü ve analitik olarak saptanabilirliğine göre belirlenir. Bu miktar uygun hacimde reseptör haznesi seçilerek (statik deneyde) veya pompanın ayarlarını değiştirerek (kinetik deneyde) ayarlanabilir.

(11) Deney tasarımlarında ve değerlendirmelerinde istatistiki olarak geçerli olmasını temin edecek kriterler dikkate alınmalıdır.

(12) Deri ile çalışmalarda benzer bütünlükteki, uygun sayıdaki (örn: en az altı) deri disklerinin seçimine dikkat edilmelidir. Kısmi kalınlıktaki deri (dermatomizasyon ile alınmış epidermis ve üst dermis veya ısı, enzimler veya kimyasallar yolu ile alınmış epidermis) kullanılabilir. Tam kalınlıktaki deri, tüm deri kompartmanlarının analiz edileceği durumda kullanılabilir. Hazırlık ile ilgili detaylı bilgi standart protokol kısmından elde edilebilir. Lipofilik bileşenler olması durumunda kısmi kalınlıktaki deri ($\leq 1\text{mm}$) veya epidermal preparatlar *in vitro* dermal retansiyonu sınırlamak açısından tercih edilebilir. Membranları hazırlamadan önce deri tutturulmalıdır. Deri kalınlığı uygun bir yöntem ile ölçülmelidir.

(13) Deney açısından deri bütünlüğü, geçmiş verileri bulunan bir maddenin (örn: trityumlu su) deri penetrasyonu ile kontrol edilmelidir. Alternatif olarak deri bütünlüğü kafein gibi radyoaktif-olmayan prob ile veya transepidermal su kaybı (Transepidermal water loss-TEWL) veya transkütanöz elektrik rezistansı (Transcutaneous Electrical Resistance-TER) gibi fiziksel metotlarla ölçülebilir.

(14) Test maddesi için toksikolojik ve fizikokimyasal veriler olarak saflık, çözünürlük, stabilite, oktanol-su partiyon katsayısı, analitik metotlar ve bunların saptanabilirlik limitleri bilinmelidir. Test maddesinin kullanılacağı formülasyon hakkında ilgili bilgiler mevcut olmalıdır.

(15) Deneyin amacına bağlı olarak test maddesi doğrudan çözelti içinde veya bir formülasyon içinde deri ile iyi temas edecek şekilde veya amaçlanan kullanım koşullarını taklit edecek şekilde kullanılabilir. Uygulama ve kullanım için önerilen koşullarda test örneğinin stabilitesi bilinmelidir.

(16) Uygulanacak formülasyonun deriyle temas süresi kadar konsantrasyonu da amaçlanan kullanım koşullarına mümkün olduğu kadar yakın olmalıdır, ilaveten abartılmış/aşırılaştırılmış kullanım koşullarındaki (öngörülebilir yanlış kullanım değerlendirmesi için) güvenlik verilerini elde etmek için amaçlanan kullanım koşullarından biraz fazla olmalıdır. Uygulanacak formülasyon miktarı tüketim için önerilen verilerine göre belirlenmelidir.

(17) Tercihen gazı alınmış (sonikasyon ile) reseptör sıvısı iyice karıştırılmalıdır veya sürekli akış ile yenilenmelidir. Reseptör hücrede statik veya sürekli akış koşulları madde bazında, absorpsiyon özelliklerine göre ve çalışmanın amacına göre tercih edilmelidir. Reseptör sıvıya penetre olan madde miktarının, absorpsiyonun daha düşük saptanmasını engellemek amacıyla geri penetrasyonunun önlenmesi için doğgunluk seviyesinin % 10'undan az olduğundan emin olunmalıdır.

(18) Deri absorpsiyon hızı ve derecesi sıcaklığa bağlı olduğu için penetrasyon hücrelerinin su ceketleri ile birlikte veya sıcaklık kontrollü inkübatörler ile birlikte kullanılması yoluyla sıcaklık $30-32 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmalıdır.

(19) Çalışma zamanı absorpsiyon profillerinin ve amaçlanan kullanım koşullarının uygun karakterizasyonu ile belirlenir. Maruziyet süresi ve örnekleme periyodu protokolde belirtilmelidir. Normal çalışma zamanı olarak 24 saat önerilir.

(20) Örnekleme sıklığı, dermal penetrasyon hızı ve derecesine bağlıdır fakat penetrasyon hızı veya derecesi ve/veya profilini saptamak için yeterli olmalıdır.

(21) Uygun olduğunda deri örneklerinden, yıkamalarından ve hücre yıkamalarından penetre olmamış madde artığı da saptanmalıdır. Test maddesinin toplam geri dönüşü en az %85 olmalıdır. Eğer daha düşük miktarlarda test maddesi toplanırsa proteinlere bağlanma, hücre yüzeyine ve kanallara penetrasyon, buharlaşma veya kimyasal reaksiyon yoluyla kayıp gibi sebepler araştırılmalıdır.

(22) Reseptör sıvı analiz edilmelidir ve eğer mümkünse her bir deri tabakasında deri yüzeyindeki miktarlar da analiz edilmelidir. LSC, HPLC veya GC gibi uygun bir analiz metodu kullanılmalıdır.

(23) Absorpsiyon profili normalde 24 saatte, uygulama sonrasında 24 saate kadar saptanır (araştırılacak madde ve/veya içinde yer aldığı formülasyonun yapısı bu sürenin uzatılması hususunda değerlendirmeyi gerektirir).

(24) Deney/test/çalışmanın bir protokolü olmalı, spesifik Standart Operasyonel Prosedür'e göre yürütülmeli ve gerekliliklere uygun olarak arşivlenmelidir.

Yürürlük

MADDE 5- Bu Kılavuz Kurum Başkanı Onayı ile yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 6- Bu Kılavuz hükümleri Kurum Başkanı tarafından yürütülür.