

TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU
KOZMETİK ÜRÜNLER ÜZERİNDE YAPILAN HAYVAN DENEYLERİNE
ALTERNATİF TEST METOTLARINA İLİŞKİN KILAVUZ SÜRÜM 1.0

Amaç

MADDE 1- (1) 23/05/2005 tarihli ve 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliğinin Ek 2 nci maddesi;

a) Bir kozmetik ürünün güvenliliğine ilişkin yasal yükümlülükler saklı kalmak üzere, bilimsel ve teknolojik gelişmeler ile ilgili mevzuattaki güncellemeler göz önünde bulundurularak alternatif bir yöntemin validasyonunun (geçerliliğinin kanıtlanması) yapılması ve kabul edilmesinin ardından söz konusu alternatif yöntem haricindeki bir yöntemin kullanıldığı hayvan testlerine tabi tutulmuş olan;

1) Nihai bir formülasyon içeren kozmetik ürünlerin piyasaya arzı,

2) Ürün bileşenleri veya ürün bileşenleri kombinasyonlarını içeren kozmetik ürünlerin piyasaya arzı,

3) Ürün bileşenleri veya ürün bileşenleri kombinasyonlarına yönelik testlerin yapılması yasaktır.

b) Ayrıca, bir kozmetik ürünün güvenliliğine ilişkin genel yükümlülükler saklı kalmak üzere, bitmiş kozmetik ürünler için hayvan testlerinin yapılması yasaktır.

c) Mevcut bir kozmetik ürün bileşeninin güvenliliğine ilişkin ciddi kaygıların ortaya çıktığı istisnai durumlarda Kozmetik Yönetmeliğinin ilgili hükümleri geçerli olur.

İşbu Kılavuz kozmetik ürünlerde, hayvan deneylerine alternatif olarak yapılabilecek test metotları hakkında yol göstermek amacıyla hazırlanmıştır.

Kapsam

MADDE 2- (1) Bu Kılavuz, Kozmetik Yönetmeliğinin 4 üncü maddesinde yer alan üretici tanımı vasfıyla piyasaya kozmetik ürün arz eden üreticiler ve kozmetik ürünlere ilişkin test hizmeti sunan müesseseler için hazırlanmıştır.

Dayanak

MADDE 3- (1) Bu Kılavuz 24/03/2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanunu ile 23/05/2005 tarihli ve 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliğinin 20 nci ve Ek 2 nci maddelerine dayanılarak hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 4- (1) Bu Kılavuzda geçen;

a) Akut toksisite: Bir maddeye bir kere veya 24 saatten az bir süre içinde birçok kere maruz kalma sonrasında kısa sürede meydana gelebilecek ani istenmeyen etkileri,

b) ECVAM: Avrupa Birliği Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi'ni (European Centre for the Validation of Alternative Methods),

- c) EURL ECVAM: Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatif Testler Referans Laboratuvarı'nı (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing),
- ç) *In vitro* testler: Canlı organizma dışında laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda yapılan testleri,
- d) *In vivo* testler: Canlı organizma üzerinde yapılan testleri,
- e) İritan madde: Tahriř edici maddeyi,
- f) İstenmeyen etki: Bir kozmetik ürünün normal ya da öngörülebilir kullanımı sonrasında, insan sağlığını olumsuz etkileyen, beklenmeyen bir etkiyi,
- g) Kronik toksisite: Bir maddeye 3 ay veya daha uzun sürede (süre) maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek istenmeyen etkileri,
- ğ) LD50 değerı: Bir kimyasal maddenin solunum yolu haricinde bir yolla uygulanması halinde tek seferde deney hayvanlarının %50'sini öldüren dozu,
- h) OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü'nü (Organization for Economic Co-operation and Development),
- ı) SCCNFP: Kozmetik Ürünler ve Gıda Dışı Tüketim Ürünleri Bilimsel Komitesi'ni (the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers),
- i) SCCS: Tüketici Güvenliđi Bilimsel Komitesini (Scientific Committee on Consumer Safety),
- j) Subakut toksisite: Bir maddeye bir ay veya daha az sürede maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek ve 14 veya 28 günlük tekrarlanan temas testleri ile belirlenebilecek istenmeyen etkileri,
- k) Subkronik toksisite: Bir maddeye 1-3 ay arasında maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek ve 90 günlük temas testleri ile belirlenebilecek istenmeyen etkileri,
- l) Toksisite: Bir maddenin toksik etki gösterme derecesini, ifade eder.

Genel gereklilikler

MADDE 5- (1) Kozmetik ürünler üzerinde, hayvan deneylerine alternatif olarak kullanılabilir test metodlarının OECD ve ECVAM tarafından onaylanmış, valide edilmiş güncel test metodları olması gerekmektedir.

Alternatif testler

MADDE 6- (1) Hayvan deneyleri arasında yer alan; akut oral toksisite, deri iritasyon, deri korozyon, mukoz membran (göz) iritasyon/korozyon, deri duyarlılığı, deriden emilim, tekrarlanan doz toksisitesi, mutajenisite/genotoksisite, karsinojenisite, üreme toksisitesi testleri gibi testlerin yerine kozmetik ürünler üzerinde yapılması amaçlanan testlerin OECD ve ECVAM tarafından onaylanmış valide edilmiş güncel test metodları olması gerekmektedir.

(2) Alternatif akut oral toksisite

In vivo akut oral toksisite testi, araştırılan bileşenin oral yoldan verildiği durumdaki LD50 değerini tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Her biri 5-10 hayvandan oluşan, 3 ve 5 dozaj grubunu kapsayan orijinal test metodu [EC B.1, OECD 401] silinmiş olup [2001/59/EC]

bunun yerine, bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

(3) *Alternatif deri iritasyon testleri*

Deri iritasyon testleri kaşıntı, şişlik ve yangı gibi ciltte meydana gelen geri dönüşlü hasarın seviyesini saptar. Alternatif deri iritasyon testi olarak valide edilmiş aşağıdaki metotlar kullanılabilir:

(a) EpiSkin™ [EC B.46, OECD 439],

(b) Değiştirilmiş Epiderm™ Deri İritasyon Testi (SIT) [EC B.46, OECD 439]

(c) SkinEthic™ Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi (RhE) [EC B.46, OECD 439].

(4) *Alternatif deri korozyon testleri*

Deri korozyon (aşınma) testleri, bir test maddesinin 3 dakikadan 4 saate kadar değişen bir süre boyunca uygulanmasını müteakip cilt üzerinde geri döndürülemez hasar yaratma potansiyelini değerlendirir. Alternatif deri korozyon testleri olarak onaylanmış, valide edilmiş aşağıdaki metotlar kullanılabilir:

(a) EpiSkin™ [EC B.40bis, OECD 431],

(b) EpiDerm™ [EC B.40bis, OECD 431],

(c) SkinEthic™ [EC B.40bis, OECD 431],

(ç) EST-1000(epidermal skin test-1000) [EC B.40bis, OECD 431],

EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ ve EST-1000 testleri iritasyon testinde olduğu gibi üç boyutlu insan epidermis (RhE) modeli üzerine uygulama ve hücre canlılığının MTT testi [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür kolorimetrik testi] ile ölçülmesi esasına dayanan testlerdir. Burada 3 dakikalık ve 60 dakikalık uygulama süresi kullanılmaktadır.

(d) Corrositex™ [OECD 435]: ECVAM'dan geçmiş; ancak, henüz yasal düzenlemelerde yer almamıştır. Hidrojenli kolajen biyomembran ve destekleyici filtre membranı kullanılmaktadır. Sadece asitler ve bazlar için faydalı olduğu düşünülmüştür [ESAC 2000].

(e) Sıçan Derisi Transkütanöz Elektrik Direnç Testi (TER: The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance) [EC B.40, OECD 430]: Bu testte, korozif maddelerin deri bütünlüğünü bozucu etkisi test edilir. Madde uygulanmış derinin, maruz kaldığı elektrik akımına gösterdiği dirençteki azalma ölçülür.

(5) *Alternatif mukoz membran (göz) iritasyon/korozyon testleri*

Göz iritasyon testleri, test maddesinin gözün ön yüzeyine uygulanmasını takip eden 21 gün içerisinde tamamen geri dönüşümlü hasar yaratma potansiyelini değerlendirir. Göz korozyonu ise test maddesinin uygulanmasını takip eden 21 gün içerisinde gözde meydana gelen geri dönüşümsüz doku hasarı veya görme bozukluğudur. Mukoz membran iritasyonu için tek başına hayvan testi yerine geçecek *in vitro* yöntem henüz geliştirilmemiş olup aşağıdaki metotlar kullanılabilir. Ayrıca bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

(a) Sığır korneası opasite ve geçirgenlik testi (BCOP: Bovine Cornea Opacity Permeability) [EC B.47, OECD 437]: Bu testte test edilen madde izole edilmiş canlı sığır korneasının epitel yüzeyine uygulanır. Test sonunda opasitometre cihazı ile korneanın ışık geçirgenliğindeki azalma ve görünür ışık spektrofotometresi ile de test maddesinin iritasyon potansiyeli ölçülür. Ölçümler sonunda *in vitro* iritasyon skoru (IVIS) hesaplanır. IVIS değerine göre test maddesi korozif veya ciddi iritan olarak değerlendirilir. Kuvvetli iritan maddelerin değerlendirilmesinde kullanılır, ancak orta derecedeki iritan maddelerin değerlendirilmesinde başarısızdır.

(b) İzole tavuk gözü testi (ICE: Isolated Chicken Eye Test) [OECD 438, EC B.48]: Bu testte izole edilmiş tavuk gözleri üzerine test maddeleri *in vitro* olarak uygulanarak iritasyon potansiyeli belirlenir. Biyomikroskopla kornea opasitesi, şişmesi, floresin tutulumu ve morfolojik etkiler değerlendirilmektedir. Test maddesi uygulanmış kornea işlem öncesi ve işlemden sonraki 30, 75, 120, 180 ve 240 ncı dakikalarda değerlendirilir. Ölçüm sonuçlarına göre test edilen maddeler sınıflandırılır. Kuvvetli iritan maddelerin değerlendirilmesinde kullanılır, ancak orta derecedeki iritan maddelerin değerlendirilmesinde başarısızdır.

(c) İzole Tavşan Gözü Testi (IRE: Isolated Rabbit Eye) ve Tavuk Yumurtası – Koryoallantoik Membran Testi (HET-CAM: Hen's Egg Test- Chorio Allantoic Membrane) testleri sadece ciddi göz hasarını tanımlamak amacıyla destekleyici kanıt olarak kullanılabilir.

(ç) Yeniden Yapılandırılmış İnsan Kornea Benzeri Epiteli (RhCE: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium) test yöntemi (OECD 492): Test edilen kimyasalın sitotoksikite oluşturma kabiliyetinin MTT testi aracılığıyla değerlendirildiği bir yöntemdir. Göz iritasyonu ya da ciddi göz hasarı açısından sınıflandırma ve etiketleme gerektirmeyen kimyasalların tanımlanması amacıyla kullanılabilir. EpiOcular™ EIT modeli kullanılarak yapılabilir.

Sitotoksikite ve hücre fonksiyonu temelli yöntemler olan Sitosensör Mikrofizyometre (CM), Floresin Sızması, Nötral Kırmızı Salımı ve Kırmızı Kan Hücresi (RBC) testleri [ESAC 2009b] göz üzerine iritan/korozif etkinin değerlendirilmesinde kullanılan tarama testleri olup, iritasyon/korozyon potansiyelini tespit etmek için uygun değildir.

(6) *Alternatif deri duyarlılığı testleri*

Alerjik temas dermatiti oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla yapılan testlerdir. Henüz deri duyarlılığı için valide edilmiş bir *in vitro* test metodu geliştirilmemiş olup

aşağıdaki metotlar kullanılabilir. Bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

a) Doğrudan Peptid Reaktivite Ölçümü (DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay): Bu yöntemle, cilt duyarlılığının tetiklenmesinde belirleyici bir basamak olan kimyasalların proteinlerle tepkime verme kabiliyeti ölçülür. Bu yöntem, incelenen bileşenin lizin ve sistein kalıntılarıyla olan kimyasal reaktivitesine dayanmaktadır.

b) KeratinoSens™ - *In vitro* Cilt Duyarlılığı ARE-Nrf2 Lusiferaz Testi (OECD 442D *In vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test): Keratinositlerin aktivasyonu ölçülerek bir Nrf2 regülatörü olan Keap1'e ait sistein kalıntılarıyla duyarlılaştırıcı maddenin direkt reaktivitesi belirlenir. Nrf2-Keap1-ARE regülasyon yolağı potansiyel deri duyarlılaştırıcılarının tanımlanması için en uygun yollardan biri olarak kabul edilir.

c) İnsan Hücre Dizisi Aktivasyon Testi (hCLAT: Human Cell Line Activation Test): THP-1 hücrelerinde CD86 ve/veya CD54 ekspresyonunun artırılmasına dayalı bir yöntemdir. EURL-ECVAM (JRC, 2015b) değerlendirmesinden geçmiştir ve hâlihazırda OECD tarafından değerlendirilmektedir. U-SENS™ Testi aynı temele dayanmaktadır.

(7) Alternatif deriden emilim testleri

Emilim, deri yüzeyine uygulanan maddenin deriden geçerek kan dolaşımına veya lenf dolaşımına karışmasını ifade eden bir terimdir. Alternatif olarak *in vitro* [EC B.45, OECD 428] metot mevcuttur. *In vitro* çalışma yetersizse veya deriden absorpsiyon verisi yoksa maddenin %100 absorbe olduğu kabul edilir. Bununla birlikte molekül ağırlığı MW > 500 Da ve log Po/w değeri -1'den küçük veya 4'den büyükse deriden emilimin %10 olduğu kabul edilebilir.

(8) Alternatif tekrarlanan doz toksisitesi testleri

Tekrarlanan doz toksisite deneyleri aracılığıyla sistemik risklerin değerlendirilmesi, yeni ve mevcut kozmetik bileşenlerinin güvenliklerinin değerlendirilmesinde anahtar rol oynar. *In vivo* tekrarlanan doz toksisite testlerinin yerini alabilecek bir *in vitro* test metodu geliştirilmemiş olup bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

(9) Alternatif mutajenisite/genotoksisite testleri

Kozmetik bileşenlerin mutajenite ve genotoksisite potansiyeli değerlendirilmesi için valide edilmiş tek bir yöntem bulunmamakta olup bir grup testin birlikte yapılması önerilmektedir. Kozmetik bileşenlerin mutajenite ve genotoksisite potansiyelini değerlendirebilmek için temelde üç parametrenin elde edilmesine ihtiyaç duyulur. Bu amaçla aşağıdaki metotlar uygulanabilmektedir:

a) Gen mutasyonu

1) Bakteriyel ters mutasyon testi (Ames testi) [EC B.13/14, OECD 471].

2) *In vitro* memeli hücresi gen mutasyon testi [EC B.17, OECD 476].

İki testin de yapılması gerekmektedir.

b) Klastojenisite ve Anojenisite (Kromozom kırıkları ve kromozomlarda sayısal bozukluklar):

1) *In vitro* memeli hücresi kromozom aberasyon testi [EC B.10, OECD 473].

2) *In vitro* memeli hücresi mikronukleus testi [EC B.49, OECD 487].

İki testten birinin yapılması gerekmektedir.

(10) *Alternatif karsinojenisite testleri*

Özellikle mutajenite ve genotoksisite testlerinde pozitif sonuç veren kimyasal maddeler için karsinojenisite testleri gerekir. *In vivo* karsinojenisite testlerinin yerini alabilecek *in vitro* bir test metodu geliştirilmemiş olup aşağıdaki metotlar kullanılabilir. Bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

a) Bileşik kronik toksisite/karsinojenite testi [EC B.33, OECD 453]: Genotoksik olan ve olmayan karsinojenler tespit edilir.

b) Hücre Transformasyon Testi (CTA: Cell Transformation Assay): Çok aşamalı kanser sürecinde bir aşama olan hücre morfolojisindeki değişiklik ölçülür. *In vitro* genotoksisite testlerinden elde edilen pozitif sonuçların kesinleştirilmesi için tamamlayıcı test olarak da kullanılabilir.

(11) *Alternatif üreme toksisitesi testleri*

Üreme toksisitesi, erkek ya da kadın üreme fonksiyonunun veya kapasitesinin zarar görmesi; sonraki kuşakta ölüm, büyüme geriliği, yapısal ve fonksiyonel etkiler gibi istenmeyen etkilere sebep olma ve üreme döngüsünün tüm aşamalarını kapsar [ECB 2003]. Bir canlının tüm üreme ve gelişme dönemini kapsayacak alternatif bir *in vitro* test metodu geliştirilmemiş olup bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

Üreme toksisitesi alanı karmaşık bir alan olup çeşitli aşamaların bir alternatif yöntem kullanılarak taklit edilmesi mümkün olmamakla birlikte embriyotoksisiteye yönelik aşağıdaki metotlar alternatif metot olarak kullanılabilir.

(a) Tam embriyo kültürü (WEC) testi,

(b) MicroMass (MM) testi,

(c) Embriyotoksik kök hücre testi (EST).

MicroMass ve Embriyonik kök hücre testi, ESAC tarafından bilimsel olarak geçerli kabul edilmiştir. Bu teste göre maddeler: “embriyotoksik olmayan, zayıf-orta-embriyotoksik veya güçlü-embriyotoksik” olarak sınıflandırılabilir. Tam embriyo kültürü testi bilimsel

olarak sadece güçlü embriyotoksik maddelerin tespit edilmesinde geçerli kabul edilir [ESAC 2001].

(12) *Alternatif toksikokinetik çalışmalar*

Toksikokinetik terimi, bir maddenin vücut içinde geçirdiği süreci tanımlamak için kullanılır. Bu süreç absorpsiyon/emilim, dağılım, metabolizma ve/veya eliminasyon/atılım (ADME) içerir. Toksikokinetik için protokoller [EC B.36, OECD 417] test edilen maddenin toksisitesinin belirli yönlerini aydınlatmak için tasarlanmıştır. Sadece emilim için bir alternatif *in vitro* test mevcut [EC B.45, OECD 428] olup bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

(13) *Alternatif ışıkla indüklenmiş toksisite testleri*

(a) Fototoksisite (fotoiritasyon) ve fotoduyarlılık: 3T3 nötral kırmızı alım fototoksisite testi (3T3 NRU PT) [EC B.41, OECD 432] test edilen bir kimyasalın UV/görülebilir ışığın sitotoksik olmayan dozuna maruziyet söz konusuken veya değilken sitotoksitesinin karşılaştırmasına dayalı valide edilmiş bir *in vitro* test metodudur. Fare 3T3 fibroblast hücre kültürüne uygulanan ve UV ışığa maruziyet ile kimyasalların fototoksisite derecelerini ölçen bir testtir. Hücre canlılığı, nötral kırmızı boyasını tutma kapasitelerinin inhibisyonu ile ölçülür ve % inhibisyon değeri olarak verilir. UV ışığı absorblayan kimyasal maddeler veya kozmetiklerdeki UV filtreleri için yapılabilecek bir testtir.

Fotoduyarlılığın tespiti için valide edilmiş alternatif bir test metodu henüz mevcut değildir. Bununla birlikte fotoalerjik özellik gösteren bir kimyasal maddenin de 3T3 NRU PT testinde pozitif reaksiyon vermesi olasıdır [EC B.41]. Bu alanda OECD ve ECVAM'ın onaylayıp valide edeceği güncel test metotları takip edilmelidir.

b) Fotomutajenite/Fotoklastojenisite: OECD fotomutajenite esaslarını 1999'da ele almaya başlamıştır, ancak günümüzde bununla ilgili bir sonuca ulaşamamıştır.

Tablo. Valide edilmiş, alternatifleri mümkün olan ve olmayan testler.

Valide edilmiş, alternatifleri mümkün olan	Valide edilmiş, alternatifleri mümkün olmayan	
Avrupa Birliği test ve satış yasağından etkilenmeyen noktalar	Avrupa Birliği test yasağından (2009) ve AB satış yasağından (2009) etkilenen noktalar	Avrupa Birliği test yasağından (2009) ve AB satış yasağından (2013) etkilenen noktalar
<ul style="list-style-type: none">• Deri korozivitesi• Deri iritasyonu• Deriden emilim• Mutajenite/genotoksisite	<ul style="list-style-type: none">• Akut toksisite• Göz iritasyon	<ul style="list-style-type: none">• Tekrarlanan doz toksisitesi• Deri duyarlılığı• Karsinojenite

(14) *Ek çalışmalar*

Endokrin bozucu aktivite: Endokrin bozucusu, endokrin sistemin fonksiyonlarını değiştirerek sağlıklı organizmada ya da onun neslinde veya (alt) popülasyonlarında istenmeyen sağlık etkilerine sebep olan harici bir madde ya da karışımdır. OECD tarafından hazırlanan ilgili kılavuzda iki adet yöntem bulunmaktadır. Bunlar:

a) Östrojenik Agonist (ve Antagonist) Aktivite (OECD 455)

b) LUMI-CELL östrojen reseptör transkripsiyonel aktivite çalışması (OECD 457).

Yürürlük

MADDE 7- (1) Bu Kılavuz Kurum Başkanı Onayı ile yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 8- (1) Bu Kılavuz hükümleri Kurum Başkanı tarafından yürütülür.