

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

Amaç

MADDE 1- Ülkemiz ile Avrupa Birliği arasında malların serbest dolaşımını tesis eden Gümrük Birliği Anlaşması doğrultusunda kozmetik alanında uyumlaştırılmakta olan mevzuat kapsamında kozmetik ürünlerde yapılacak hayvan testlerine ilişkin getirilen yasaklar doğrultusunda kozmetik ürünlerde yapılacak hayvan deneylerine alternatif test metotları hakkında kozmetik üreticilerini bilgilendirmek amacıyla “Kozmetik Ürünler Üzerinde Yapılan Hayvan Deneylerine Alternatif Test Metotlarına İlişkin Kılavuz” hazırlanmıştır.

Kapsam

MADDE 2- Bu Kılavuz, Kozmetik Yönetmeliği'nin 4 üncü maddesinde yer alan üretici tanımı vasfıyla piyasaya kozmetik ürün arz eden üreticiler için hazırlanmıştır.

Dayanak

MADDE 3- Bu Kılavuz 24/03/2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanunu ile 23/05/2005 tarihli ve 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliği'nin 6 ncı maddesine dayanılarak hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 4- (1) Bu Kılavuzda geçen;

(a) **3 R kuramı:** - İngilizce “**R**eplacement (yerine koyma), **R**eduction (azaltma), **R**efinement (iyileştirme)” kelimelerinin baş harflerinden oluşmakta olup,

Yerine koyma: Hayvan testleri yerine alternatif metotların uygulanmasını,

Azaltma: Deneylerde mutlaka hayvan kullanılması gerekiyorsa, kesin bilginin ve sonucun elde edilebileceği en az sayıda hayvanın kullanılmasını,

İyileştirme: Hayvanlara yönelik ağrı ve acı verici uygulamaların şiddetinin ya da miktarının olabildiğince azaltılmasını,

(b) **OECD:** Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütünü (Organization for Economic Co-operation and Development),

(c) **ECVAM:** Alternatif metotların validasyonu için Avrupa Merkezini (European Centre for the Validation of Alternative Methods),

(ç) **EURL ECVAM:** Hayvan testlerine alternatif testler için Avrupa Birliği referans laboratuvarını (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing),

(d) **SCCS:** Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesini (Scientific Committee on Consumer Safety),

(e) **SCCNFP:** Tüketiciler için kozmetik ürünler ve gıda olmayan ürünler üzerine bilimsel komiteyi (the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers),

(f) **İstenmeyen etki:** Bir kozmetik ürünün normal ya da öngörülebilir kullanımı sonrasında, insan sağlığını olumsuz etkileyen, beklenmeyen bir etkiyi,

(g) **LD₅₀ değeri:** Bir kimyasal maddenin deney hayvanlarının %50'sini öldüren dozu,

(ğ) **In vitro testler:** Laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda yapılan testleri,

(h) **In vivo testler:** Yaşayan organizma içinde yapılan testleri,

(i) **Toksisite:** Bir maddenin oluşturduğu toksik etkiyi,

(i) **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,

(j) **Subakut toksisite:** Bir maddeye bir ay veya daha az sürede maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek ve 14 veya 28 günlük 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) **Kronik toksisite:** Bir maddeye 3 ay veya daha uzun sürede maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek istenmeyen etkileri,

(m) **İrritan madde:** Tahriş edici maddeyi, ifade eder.

Alternatif Testler

MADDE 5- (1) Alternatif akut toksisite testleri:

(a) Akut oral toksisite: *In vivo* akut oral toksisite testi, araştırılan bileşenin 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 [2001/59/EC] ve bunun yerine aşağıdaki metotlar gelmiştir:

1) Sabit doz yöntemi [EC B.1 bis, OECD 420]

2) Akut toksik sınıf yöntemi [EC B.1 tris, OECD 423]

3) Yukarı ve aşağı işlem yöntemi [OECD 425]

(b) Akut solunum toksisitesi: Akut solunum toksisitesinde solunum yoluyla akut maruziyet durumu akut toksik sınıf yöntemi kullanılarak tespit edilir [OECD 436].

(c) Akut dermal toksisite: Dermal yoldan akut toksisite için valide edilmiş alternatif yöntemler henüz yoktur [EC B.3, OECD 402].

(2) Alternatif deri iritasyon testleri: Deri iritasyon testleri kaşıntı, şişlik ve yangı gibi ciltte meydana gelen geri dönüşlü hasarın seviyesini saptar. *In vitro* iritasyon için valide edilmiş üç adet doku kültürü yöntemi mevcuttur:

(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].

(3) 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. Onaylanmış, valide edilmiş 5 adet *in vitro* korozyon testi mevcuttur:

(a) TER test (sıçan derisi transkütanöz elektrik direnç testi) [EC B.40, OECD 430]: Bu testte, korozif maddelerin deri bütünlüğünü bozucu etkisi test edilir. Madde uygulanmış derinin uygulanan elektrik akımına gösterdiği dirençteki azalma ölçülür.

(b) EpiSkin™ [EC B.40bis, OECD 431],

(c) EpiDerm™ [EC B.40bis, OECD 431],

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

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

EpiSkin™ , EpiDerm™, SkinEthic™ ve EST-1000 testleri irritasyon testinde olduğu gibi üç boyutlu insan epidermis (RhE) modeli üzerine uygulama ve hücre canlılığının MTT testi (3-(4,5-dimetillthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide colorimetric assay testi) ile ölçülmesi esasına dayanan testlerdir. Burada 3 dakikalık ve 60 dakikalık uygulama süresi kullanılmaktadır.

(e) Corrositex™ [OECD 435]: ECVAM'dan geçmiş; ancak, henüz Avrupa Birliği mevzuatına girmemiştir. Hidrojenli kollajen biyomembran ve destekleyici filtre membranı kullanılmaktadır. Sadece asitler ve bazlar için faydalı olduğu düşünülmüştür [ESAC 2000].

(4) Alternatif mukoz membran (göz) irritasyon/korozyon testleri: Göz irritasyon testleri, test maddesinin gözün ön yüzeyine uygulanmasını müteakip 21 gün içerisinde tamamen geri dönüşümlü hasar yaratma potansiyelini değerlendirir. Göz korozyonu ise test maddesinin uygulanmasını müteakip 21 gün içerisinde tamamı geri dönüşümlü olmayan gözde doku hasarı veya görme bozukluğudur. Mukoz membran irritasyonu için tek başına hayvan testi yerine geçecek *in vitro* yöntem henüz yoktur. Bilimsel olarak valide olmuş ikili bir tarama testi alternatif olarak geliştirilmiştir:

(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 ışık geçirgenliğindeki azalma ve görünür ışık spektrofotometresi ile de sodyum floresin boyasının geçişindeki artış incelenir. Ölçümler sonunda *in vitro* iritan 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 yöntemde izole edilmiş tavuk gözleri üzerine test maddeleri *in vitro* olarak uygulanarak irritasyon 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.

İzole tavşan gözü testi (IRE: Isolated Rabbit Eye Test-Draize Test), HET-CAM (Tavuk Yumurtası – Koryoallantoik Membran Testi/Hen's Egg Test- Chorio Allantoic Membrane) testleri kozmetik bileşenin güvenliliğinin kanıtlanması noktasında destekleyici olarak kullanılan testlerdir [SCCS/1294/10].

Sitotoksisite 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, irritasyonun/korozyonun potansiyelini tespit etmek için uygun değildir.

Klasik Draize *in vivo* göz testinin öngördüğü sonuçları karşılayabilecek alternatif *in vitro* bir test henüz valide edilmediğinden hayvan sayısının azaltılması ve hayvan refahının iyileştirilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla ürünün göz üzerine iritan/korozif etkisinin değerlendirilmesinde “karar ağacı” oluşturulması faydalı olacaktır [EC B.5, OECD 405].

(5) 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 3 adet *in vivo* test uygulanmaktadır. Bu testlerde hayvan sayısını azaltma ve hayvan refahını iyileştirme yoluna gidilmiştir.

- (a) Lokal lenf nodu testi (LLNA) [EC B.42, OECD 429],
- (b) Kobay maksimizasyon testi (GPMT) [EC B.6, OECD 406],
- (c) Buehler testi [EC B.6, OECD 406]

(6) Alternatif deriden emilim testleri: Emilim, deri yüzeyine uygulanan maddenin deriden geçerek kan dolaşımına veya lenf dolaşımına karışmasını ifade eden bir terimdir. *In vitro* [EC B.45, OECD 428] metod mevcuttur. *In vitro* çalışma yetersizse veya deriden absorpsiyon verisi yoksa maddenin %100 absorbe olduğu kabul edilir. Bununla birlikte molekül büyüklüğü MW > 500 Da ve log Pow değeri -1'den küçük veya 4'den büyükse deriden emilimin %10 olduğu kabul edilir.

(7) Alternatif tekrarlanan doz toksisitesi testleri: Tekrarlanan doz toksisite deneyleri aracılığıyla sistemik risklerin değerlendirilmesi, yeni ve mevcut kozmetik bileşenlerinin güvenliliklerinin değerlendirilmesinde anahtar elementtir. *In vivo* tekrarlanan doz toksisite deneylerinin yerini alabilecek *in vitro* alternatif bir yöntem henüz yoktur. *In vivo* tekrarlanan doz toksisite testleri şunlardır:

- (a) Tekrarlanan doz (subakut, 28 gün) toksisitesi (oral) (EC B.7, OECD 407),
- (b) Tekrarlanan doz (subakut, 28 gün) toksisitesi (dermal) (EC B.9, OECD 410),
- (c) Tekrarlanan doz (subakut, 28 gün) toksisitesi (inhaler) (EC B.8, OECD 412),
- (ç) Tekrarlanan doz (subkronik, 90 gün) toksisitesi (oral, kemirgenlerde) (EC B.26, OECD 408),
- (d) Tekrarlanan doz (subkronik, 90 gün) toksisitesi (oral, kemirgen olmayanlarda) (EC B.27, OECD 409),
- (e) Tekrarlanan doz (subkronik, 90 gün) toksisitesi (dermal, kemirgenlerde) (EC B.28, OECD 411),
- (f) Tekrarlanan doz (subkronik, 90 gün) toksisitesi (inhaler, kemirgenlerde) (EC B.29, OECD 413),
- (g) Kronik toksisite testi (EC B.30, OECD 452).

(8) Alternatif mutajenite/genotoksisite testleri: Kozmetik bileşenlerin mutajenite ve genotoksisite potansiyeli değerlendirmesi için temelde üç parametreye ait veri istenir:

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.

(9) Alternatif karsinogenisite testleri: Özellikle mutajenite ve genotoksisite testlerinde pozitif sonuç veren kimyasal maddeler için karsinogenisite testleri gerekir. *In vivo*

karsinojenisite testlerinin yerini alabilecek valide edilmiş alternatif bir yöntem henüz yoktur. En yaygın kullanılan karsinojenite testleri şunlardır:

(a) Karsinojenite testi [EC B.32, OECD 451],

(b) Bileşik kronik toksisite/karsinojenite testi [EC B.33, OECD 453].

(10) 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 *in vitro* bir test henüz yoktur. En yaygın olarak kullanılan üreme toksisitesi çalışmaları şunlardır:

(a) İki nesilli üreme toksisitesi Testi [EC B.35, OECD 416],

(b) Kemirgen ve kemirgen olmayanlarda yapılan teratojenisite testi, [EC B.31, OECD 414].

Üreme sistemi yanı sıra gelişim üzerine toksik etki potansiyelinin değerlendirildiği üreme/ gelişimsel toksisite tarama testi de mevcuttur (OECD 421).

Üreme toksisite alanı çok karmaşık olduğu için çeşitli aşamaların bir alternatif yöntem kullanılarak taktili edilmesi beklenilmemektedir. Embriyotoksisite alanıyla sınırlı üç alternatif yöntem geliştirilmiştir:

(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. Embriyotoksik olmayan, zayıf-orta-embriyotoksik veya güçlü-embriyotoksik. tam embriyo kültürü testi bilimsel olarak sadece güçlü embriyotoksik maddelerin tespit edilmesinde geçerli kabul edilir [ESAC 2001].

(11) Alternatif toksikokinetik çalışmalar: Toksikokinetik çalışmalar terimi, bir maddenin vücut içindeki süreye bağlı ömrünü tanımlamak için kullanılır. Bu süreç emilim, dağılım, metabolizma ve/veya eliminasyon-atılımı içerir. Toksikokinetik için protokoller [EC B.36, OECD 417] test edilen maddenin toksisitesinin belirli yönlerini aydınlatmak için tasarlanmıştır. Sonuçlar ileride yapılacak toksisite çalışmalarının hazırlanması ve bunların yorumlanmasında yardımcı olabilir. Sadece emilim için bir alternatif *in vitro* testi mevcuttur [EC B.45, OECD 428].

(12) Alternatif ışıkla indüklenmiş toksisite testleri:

(a) Fototoksisite (fotoirritasyon) ve fotoduyarlılık: 3T3 nötral kırmızı alım fototoksisite testi (3T3 NRU PT) [EC B.41, OECD 432] UV/görülebilir ışığın sitotoksik olmayan dozuna maruziyet söz konusuysen veya değilken test edilen bir kimyasalın 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 yapılması gereken bir testtir.

Fotoduyarlılığın tespiti için valide edilmiş alternatif bir test metodu henüz mevcut değildir. Bununla birlikte fotoalerjik özellikleri gösteren bir kimyasal madde, 3T3 NRU PT testinde pozitif reaksiyon vermesi olasıdır [EC B.41].

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

Tablo. Valide edilmiş yerine koyma alternatifleri mümkün olan ve olmayan testler.

Valide edilmiş yerine koyma alternatifleri mümkün olan	Valide edilmiş yerine koyma 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 irritasyonu• Deriden emilim• Mutajenite/genotoksisite• Fototoksisite	<ul style="list-style-type: none">• Akut toksisite• Göz iritasyon	<ul style="list-style-type: none">• Tekrarlanan doz toksisitesi• Deri duyarlılığı• Karsinojenite• Üreme toksisitesi• Toksikokinetik (emilim hariç)

Yürürlük

MADDE 6- Bu Kılavuz Kurum Başkanı Onayı ile yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 7- Bu Kılavuz hükümleri Kurum Başkanı tarafından yürütülür.