

İlaçlar ve Kimyasal Maddelerin Oküler Toksisitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Güncel Yöntemler

Recent Methods Used in the Determination of Ocular Toxicity of Drugs and Chemicals

^{id} Hülya TEZEL^a, ^{id} Suna SABUNCUOĞLU^a, ^{id} Pınar ERKEKOĞLU^a

^aHacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET İnsan gözü, fizyolojik yapısı itibarıyla tehlikeli çevresel koşullara ve maddelere maruz kalan hassas bir organdır. Endüstriyel maddeler, çevresel kimyasallar, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri ve yanlış uygulandığı takdirde bazı ilaçlar korneada irritasyona, inflamasyona ve hatta görme kaybına bile neden olabilir. Bu nedenle tehlikeli maddelere maruz kalma riskini azaltmak için ilaçların, kozmetiklerin ve bu ürünlerin içerisinde yer alan bileşenlerin test edilerek, göz irritasyon potansiyellerinin değerlendirilmesi gerekir. Günümüzde birçok ilaç ve kimyasal maddenin göz üzerindeki etkilerini araştırmak için birçok in vitro yöntem geliştirilmektedir. Bu yöntemlerin en sık kullanılanları “yeniden yapılandırılmış insan korneası (RhCE)” modelleridir. RhCE modellerinde, insan kornea hücreleri veya insan derisi keratinositleri gibi hücreler kullanılabilir. RhCE epitel hücrelerinin kullanıldığı sistemlerle ilgili Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü’nün Test Kılavuzu, 492 kılavuz yayımlanmıştır. Ayrıca birçok yeni oküler toksisite doku modelinin, gelecekte kullanıma girmesi için çalışmalar devam etmektedir. Ancak ilaç ve biyomedikal sektörlerinde göz irritasyonunu değerlendirmek için hâlâ hayvan deneyleri yapılmaktadır. Diğer taraftan, Avrupa Birliği Kozmetik Komitesi tarafından onaylanan Kozmetik Direktifi (76/768/EEC) ile 2013’ten itibaren kozmetik bileşenler ve bitmiş ürünler için hayvanlar üzerinde test edilmesi tamamen yasaklanmıştır. Kozmetik sektöründe hayvan deneylerinin yasaklanmasıyla birlikte, oküler toksisiteyi değerlendirmek için ex vivo ve in vitro birçok alternatif yöntem geliştirilmiştir. Bu derlemede, oküler toksisite test yöntemlerindeki en son gelişmeler hakkındaki bilgiler özetlenecek, yöntemlerin avantajları ve dezavantajları tartışılacaktır.

ABSTRACT Human eye is exposed to dangerous environmental conditions and substances due to its physiological structure. Industrial substances, chemicals, cosmetics, personal care products and some medications when wrongly used can cause ocular irritation, inflammation, or even loss of sight. Therefore, in order to reduce the risk of exposure to hazardous substances, drugs, cosmetics and their ingredients should be tested and evaluated for their eye irritation potentials. Today, several in vitro methods are being developed for the determination of several drugs and chemical substances on eye. The most widely used methods are “reconstructed human eye cornea (RhCE) models”. In RhCE models, cells of cornea or non-cornea origin human cornea cells or human skin keratinocytes can be used. Concerning RhCE epithelial cell systems, Organisation for Economic Co-operation and Development has published Test Guideline 492. Moreover, there is ongoing research on for the future use of several new ocular toxicity tissue models. However, animal experiments are still carried out in the pharmaceutical and biomedical industry for the evaluation of ocular irritation. On the other hand, animal experiments for cosmetic ingredients and end products have been banned in the European Union, since 2013. With the prohibition of animal experiments in the cosmetics industry, many alternative ex vivo and in vitro methods have been developed to assess ocular toxicity. In this review, information on the latest developments in ocular toxicity test methods will be summarized and the advantages and disadvantages of these methods will be discussed.

Anahtar Kelimeler: Oküler irritasyon; Draize testi; alternatif yöntemler; hücre kültürü

Keywords: Ocular irritation; draize test; alternative methods; cell culture

Toksikolojik çalışmaların temel amacı, ilaç, kozmetik, ev ürünleri, endüstriyel kimyasallar ve zirai kimyasallar dâhil olmak üzere tüm ksenobiyotiklerin canlı sistemler üzerindeki ters etkilerinin doğasını incelemek, bu ters etkilerin ortaya çıkma olasılıklarını

öngörmek ve yarar/zarar oranını ortaya koymak ve risk değerlendirmesini yapmaktır. Sağlığımızı korumak veya düzeltmek, besinlerin saklanması, tarımsal verimi artırmak, yaşantımızı sürdürmek için kimyasal maddelere maruz kalmak kaçınılmazdır. Kimyasal

Correspondence: Pınar ERKEKOĞLU

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: erkekp@yahoo.com

Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 03 Jun 2020

Received in revised form: 06 Aug 2020

Accepted: 07 Sep 2020

Available online: 03 Feb 2021

2630-5569 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



maddelere, özellikle yüksek doz maruziyet sonrası farklı organ ve sistemelerde toksik etkiler görülebilmektedir.¹

İnsan gözü, ev kimyasalları da dâhil pek çok madde için oldukça hassas bir yapıya sahiptir. Göz, anatomik yerleşimi ve fizyolojik yapısı nedeniyle, tehlikeli çevresel maddelerin maruziyetine oldukça açıktır. Kimyasal maddelere oküler maruziyet, kozmetiklerde ve bazı ilaçlarda olduğu gibi kasıtlı olabileceği gibi kazara da gerçekleşebilir. Toksikolojik açıdan tehlikeli maddelere maruz kalma riskini azaltmak için üretilen tüm tüketici ürünleri ve bileşenleri test edilmeli ve tüketici güvenliği açısından göz iritasyon potansiyellerini belirlemek için oküler toksisite testleri yapılmalıdır.¹

Geçmişte, kimyasal maddelerin prelinik güvenlik değerlendirmeleri büyük ölçüde hayvan deneyleriyle yapılmıştır. İlerleyen dönemlerde etik kaygılar, daha verimli ve uygun maliyetli prelinik validasyon yöntemlerine duyulan ihtiyaçlar ve “Replacement-Reduction-Refinement (3R)” kuralının benimsenmesiyle alternatif toksisite testlerinin geliştirilmesi önem kazanmış ve pek çok model oluşturulmuştur. Dolayısıyla oküler iritasyonu değerlendirmek için de laboratuvar hayvanlarının kullanımı yerine alternatif yöntemlerin geliştirilmesi teşvik edilmiştir. Özellikle kozmetik ürünlerin toksisite potansiyellerinin değerlendirilmesinde, Avrupa Birliğinde yayımlanan “Kozmetik Regülasyonu” ile 11 Mart 2013 itibarıyla in vivo yöntemlerin kullanımı kaldırılmıştır.²

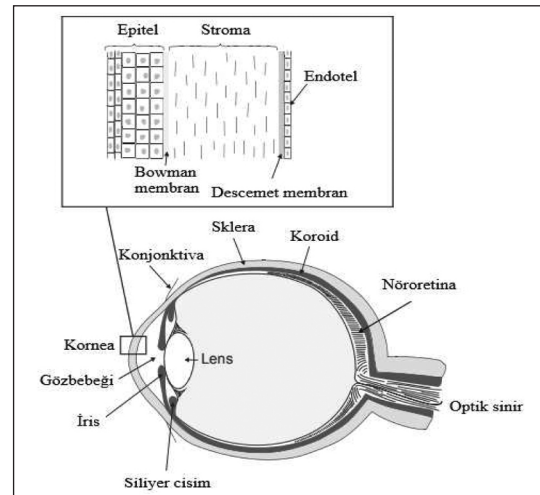
GÖZÜN ANATOMİSİ

Göz, insan vücudunun hem işlevsel hem de fizyolojik yapı olarak en karmaşık organlarından biridir. İnsan gözü, temel olarak 3 tabakadan oluşur. *Tunica Fibrosa Bulbi* (Corneo-Scleral tabaka), gözün en dış tabakasını oluşturur. Bir başka deyişle gözün penceresi olan kornea, göze gelen ışığın kırılmasını sağlayarak, lense ve retina iletilmesinde rol oynar. Aynı zamanda gözü, enfeksiyöz ajanlara ve dışarıdan gelebilecek hasarlara karşı korur. Kornea epitel, Bowman membran, stroma, Descemet membran ve endotel olmak üzere 5 tabakadan oluşur. Sklera, gözün şeklini korumasını sağlayan bağ dokudur.³

Gözün orta tabakası olan *Tunica Vasculosa Bulbi* (vasküler tabaka) iris, silier cisim ve koroidden oluşur. İris, retinaya ulaşan ışık miktarını ayarlayan göz bebeğinin büyüklüğünü belirlerken, silier cisim lensin gücünü ve şeklini kontrol eder. Koroid ise yapısını oluşturan vasküler doku sayesinde retinanın dışında yer alan tabakalara oksijen ve besin iletilmesinde görev alır.⁴ Gözün en iç tabakası olan *Tunica Interna Bulbi* (nöral tabaka), ışığın görüntü olarak beynimize iletilmesini sağlayan nöronları içeren retinadan oluşur.⁵ Gözün tabakaları Şekil 1’de gösterilmiştir.

KİMYASAL MADDELERİN VE İLAÇLARIN GÖZDE İRRİTASYON VE KOROZYON OLUŞTURMA MEKANİZMALARI

Kimyasalların zarar verme potansiyellerinin belirlenebilmesi için göz iritasyon testleri kullanılmaktadır.⁶ Kornea, asit mukopolisakkarit bir ortamda hücrelerin ve kollajen fibrillerin özel bir şekilde düzenlenmesiyle oluşan şeffaf yapıda bir tabakadır. İlaçların, kozmetiklerin ve diğer kimyasal ürünlerin korneadan penetrasyonu çözünürlüklerine göre gerçekleşir. Yağda çözünen maddeler, epitel ve endotelten rahatlıkla geçebilirken, suda çözünür maddeler stromadan geçer. Topikal olarak göze kolayca uygulanan ilaçlar, iyonize ve iyonize olmayan formlar hâlinde çözelti içinde dengede bulunma yeteneğine sahiptir. İyonize olmayan formlar endotel ve epiteli geçerken, iyonize formların penetrasyonları ise stromadan gerçekleşir.³ Fizikokimyasal özelliklerine göre

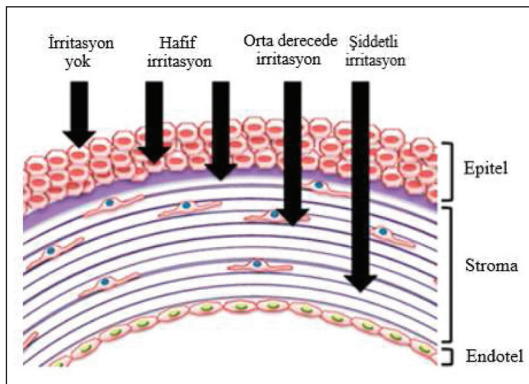


ŞEKİL 1: Gözün tabakaları.⁵

epitelden, endotelden veya stromadan geçen kimyasal maddelerin irritasyon oluşturma mekanizmaları farklı yollarla gerçekleşir. İlaçların, kozmetiklerin ve diğer kimyasal ürünlerin içerisinde yer alan yüzey aktif maddeler, ketonlar ve alkoller gibi bileşenler gözdeki toksik etkilerini, lipid çift tabakanın bozulması sonucunda hücrede meydana gelen membran lizis ile gösterirken, asit ve bazlar özellikle proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin denatürasyonuna ve koagülasyona neden olarak, toksik etkilerini gösterir. Peroksitler, ağartıcılar ve organik çözümler gibi bazı kimyasallar ise hücresel bileşenlerle etkileşerek, hücre içinde meydana gelen alkilasyon ve oksidasyon gibi tepkimelerle hücresel strese, koagülasyona ve lizise neden olabilir. Alkali maddeler lipidlerin parçalanmasına neden olarak, membran lizise ve koagülasyona benzer etkiler göstererek saponifikasyona neden olurlar. Ancak saponifikasyon sonucunda oluşan toksik etki, zamanla dokuda ilerleyici olma eğilimindedir.^{6,7} Kornea tabakaları ve kimyasal maruziyetle oluşabilecek irritasyon şiddeti Şekil 2’de gösterilmiştir.

KİMYASAL MADDELERİN POTANSİYEL ZARARLARINA GÖRE KÜRESEL UYUM SİSTEMİ SINIFLANDIRILMALARI

Kimyasalların sağlık, fiziksel ve çevresel tehlikelerinin tanımlanarak ürünlerin zarar verme potansiyellerinin belirlenmesi, kimyasalların sınıflandırılması ve etiketlenmesini standartlaştırmak ve uyumlu hâle getirmek için Küresel Uyum Sistemi (Globally Harmonized System (GHS)] geliştirilmiştir. GHS sisteminde kimyasallar, tüketici güvenliğini sağlamak için insan



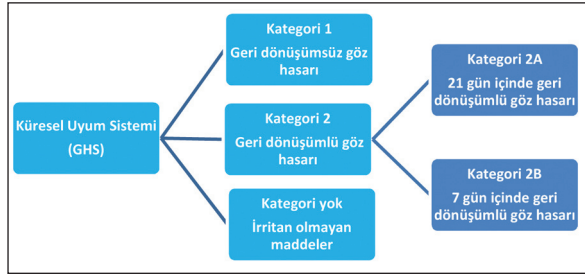
ŞEKİL 2: Kornea tabakaları ve kimyasal maruziyetle oluşabilecek irritasyon şiddeti.²

gözüne zarar verme potansiyellerine göre irritan olmayan maddeler (Kategorisi yok), Kategori 1 (gözlerde geri dönüşümsüz hasar oluşturan maddeler) ve Kategori 2 (gözlerde geri dönüşümlü hasar oluşturan maddeler) olmak üzere 3 kategoriye ayrılmıştır. Kategori 2 ise Kategori 2a ve Kategori 2b olmak üzere 2 alt kategoriye ayrılır. Kimyasalın oluşturduğu hasar 21 gün içinde tersine çevrilirse kimyasal, 2a (gözlerde irritan), 7 gün içinde tersine çevrilirse 2b (gözlerde hafif derecede irritan) kategorisinde sınıflandırılır. Bir kimyasalın, hangi kategoride yer aldığı irritasyon testleriyle belirlenir. Göz irritasyon testlerinde referans göz testi olarak kabul edilen, Draize teste alternatif birçok in vivo, ex-vivo ve in vitro yöntem geliştirilmiştir.⁸ Kimyasalların GHS sınıflandırılmaları Şekil 3’te verilmiştir.

İLAÇLAR VE KİMYASAL MADDELER İÇİN HANGİ TİP GÖZ İRRİTASYON/KOROZYON TESTLERİ UYGUNDUR?

İrritasyon testlerinde, genellikle gözün en dış kısmında yer alan ve ilk bariyeri oluşturan kornea kullanılır. Korneada yer alan epitel doku, mekanik ve kimyasal yaralanmalara daha yatkındır. Bu nedenle uygulandıklarında ilk olarak kornea ile temas eden göz damlaları, göz jelleri, göz merhemleri gibi dozaj formlarının, kornea ile uyumlu olmaları ve oküler dokuya herhangi bir zarar vermemeleri gerekmektedir. Oftalmik formülasyonlar, hayvan modeli kullanılarak oküler toksisite açısından değerlendirilebilir. Ancak bu çalışmalarda, kullanılan hayvan sayısının azaltılması ve hayvan refahının artırılması ön plana çıkmaktadır.²

Göz çevresi için kullanılan kozmetik ürünlere (maskara, göz kalemleri, göz çevresi kremleri vb.), normal kullanım sırasında göze seyreltilmiş biçimde girebilecek ürünlere veya gözle temas etmesi amaçlanmayan ürünlere (şampuanlar vb.), kazara maruziyet nedeniyle gözlerde toksik etkiler meydana gelebilir. Kozmetik ürünler ve bileşenleri için göz irritasyon potansiyellerinin değerlendirilmesi, ürünün güvenli olduğuna dair güvence sağlamak için gereklidir. Önceden kozmetik bileşenlerin ve bitmiş ürünlerin oküler toksisitelerinin belirlenmesi için ilaçlarda olduğu gibi Draize göz testi kullanılmıştır, ancak bunun yasaklanmasıyla Draize teste alternatif olabi-



ŞEKİL 3: Kimyasalların küresel uyum sisteme sınıflandırılmaları.⁶

lecek yöntemlerin araştırması hız kazanmıştır. Oküler iritasyon için tek başına hayvan testi yerine geçecek in vitro yöntem henüz geliştirilmemiştir. Ancak Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü'nün [Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)] ve Avrupa Birliği Alternatif Metotlar Validasyon Merkezinin [European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)] onaylayıp, valide ettiği yöntemler bu amaçla kullanılabilir. ⁹⁻¹¹ İlaçlar ve kimyasallar için kullanılan göz iritasyon/korozyon testleri aşağıda detaylandırılmıştır.

DRAİZE GÖZ TESTİ

Kimya endüstrisinin büyümesiyle yeni ilaçların ve kozmetik ürünlerin üretimi hız kazanmıştır. Bu ürünlerin kullanımının artmasıyla birlikte, gözlerde istenmeyen etkiler görülmüş ve 1930'lu yıllarda kozmetik kullanımı nedeniyle meydana gelen kalıcı göz hasarıyla ilgili yeni yasalar uygulanmaya başlanmıştır. Aslında göze zararlı olabilecek ürünleri değerlendirmek için XVIII. yüzyıldan beri hayvan deneyleri yapılmaktadır.² Ancak akut oküler toksisiteyi belirlemek için uluslararası standart in vivo tavşan testi XX. yüzyılda geliştirilmiştir. 1944 yılında, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesinde toksikolog olarak görev yapan John H. Draize ve ark., test materyallerinin cilt, penis ve gözlerle temas etmesi sonucunda oluşan toksik reaksiyonların tanımlanması ve değerlendirilmesi için Draize tavşan testinin kullanılabilmesini öne sürmüşlerdir. Draize testi, her ne kadar kozmetik ürünlerin güvenliğini değerlendirmek için geliştirilmiş olsa da sonrasında insektisitler ve antiseptiklerin oküler iritasyon potansiyelleri de bu yöntemle test edilmeye başlanmıştır. Sonuç olarak bu test, akut göz iritasyonu ve korozyonu için uluslararası standart test hâline gelmiştir.⁹

Draize testinde; iyi tanımlanmış bir anatomiye, fizyolojiye, geniş gözlere sahip olmaları, ucuz ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle yaygın olarak Yeni Zelanda tavşanları kullanılır. 0,1 mL (ya da katı maddeler için 0,1 g) test materyali, tavşanın gözlerinden birinin konjonktival kesesine uygulanır. Negatif kontrolü sağlayabilmek için diğer göze herhangi bir uygulama yapılmaz. Değerlendirmeler, maruziyetten 1, 24, 48 ve 72 saat sonra yapılır ve bu süre 21 güne kadar uzatılabilir.⁶ Tavşanların gözlerinde kızarıklık, şişme, bulanıklık, ödem, kanama, korneal opasite ve görme kaybı gibi iritasyon ve korozyon belirtileri gözlemlenir ve skorlanır. Draize testi için farklı puanlama sistemleri geliştirilmiştir.^{9,12} Göz iritasyon belirtileri ve Draize skorları **Tablo 1**'de verilmiştir.

Draize testi yapılarak, hem “geri dönüşlü” hem de “geri dönüşsüz” oküler toksik etkiler tanımlanabilir.¹⁴ Bu test, tüm iritasyon şiddetini değerlendirmek için resmî olarak kabul edilen ve onaylanan tek test olması nedeniyle önem kazanmaktadır. Orijinal Draize testinde test başına en az 6 tavşan kullanılır. Ancak uygulanan maddenin, ciddi oküler hasar vermesi bekleniyorsa bu sayı 3 veya tek 1 tavşana indirgenebilir. Güncellenen Draize test kılavuzlarında da W.M.S Russell ve R.L. Burch tarafından 1959 yılında geliştirilen ve baş harflerinden dolayı 3R prensibi olarak anılan “Replacement” (yerine koyma), “Reduction” (azaltma) ve “Refinement” (iyileştirme) kuralları doğrultusunda, test sırasında hayvanlarda oluşabilecek ağrıların ve acıların azaltılabilmesi için analjeziklerin ve anesteziğin uygulanması gerektiği belirtilmektedir.⁹

Bu kapsamda, Draize göz testinin bir çeşidi olan “düşük hacimli göz testi” geliştirilmiştir. Düşük hacimli göz testinde [low volume eye test (LVET)], Draize testinden farklı olarak 0,1 mL yerine 0,01 mL test materyali konjonktival kese yerine doğrudan korneaya uygulanır. İnsan maruziyetinden elde edilen li-

TABLO 1: Göz iritasyon belirtileri ve Draize skorları.¹³

Gözün bölümü	Tanımlama	Aralık
Kornea	Opaklık derecesi ve ülserasyon	0-4
İris	Şişme ve hiperemi	0-2
Konjonktiva	Kızarıklık, damarların belirginliği	0-3

teratür verileri, gönüllüler ve tavşanlardaki yanıtlar ve LVET verileri karşılaştırıldığında, insanlardaki oküler yanıtın, LVET ile Draize testine göre daha doğru tahmin edildiği görülmüştür. Bu test, LVET'nin tavşanların gözlerinde daha az tahriş oluşturması ve bu sayede daha kısa sürede iyileşme görülmesi açısından önem taşır. LVET testi ECVAM tarafından Draize testinin yerine kullanılabilir bir yöntem olarak değerlendirilmiştir, ancak göz irritasyonunun/korozyonunun belirlenebilmesi için Draize testinin yerini alabilecek bir yöntem olarak kabul edilmemiştir. Sonuç olarak LVET, herhangi bir düzenleyici kuruluş tarafından alternatif test olarak henüz onaylanmamıştır.^{8,15,16}

DRAİZE GÖZ TESTİNE ALTERNATİF TEST YÖNTEMLERİ

Etik ve yasal kaygılar, bilimsel ilerlemeler, zaman ve maliyet gibi koşullar hayvan deneylerine alternatif olacak test modellerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Alternatif modellerin geliştirilmesi, düzenli veya sürekli bir şekilde ilerlemese de hayvan deneylerinin yasaklanmasıyla alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır.^{10,14,17}

ORGANOTİPİK YÖNTEMLER

EX VİVO OKÜLER ORGANOTİPİK MODELLER

Ex vivo oküler organotipik testlerde, hayvanların sadece göz irritasyon ve korozyon testi için öldürülmesini önlemek için mezbahalardan veya ötenazi sonrası tavşan, tavuk, sığır veya domuzdan izole edilmiş göz küreleri ve kornealar kullanılır.¹²

İZOLE TAVŞAN GÖZÜ

İzole tavşan gözü (IRE) testinde diseksiyon ile elde edilen gözler, kontrollü sıcaklık ve neme sahip bir süperfüzyon odasında dikey bir konumda monte edilir. Gözün, nemli kalmasını sağlamak için serum fizyolojik çözeltisi düzenli aralıklarla doğrudan korneaya damla damla uygulanır. Test materyali uygulanmadan önce floresin penetrasyonu ve korneanın şişmesi kontrol edilir. Test aşamasında göz, 10 sn boyunca iritan maddeye maruz bırakılır. Sonrasında yıkayıp kimyasal maddeden arındırılarak, kornea opaklaşması ve korneanın kalınlığındaki artış (korneanın şişmesi) skorlanır ve floresin penetrasyonu kaydedilir.

Daha sonraki değerlendirmeler, iritan maddenin uygulanmasından 30 dk, 1, 2, 3 ve 4 saat sonra yapılır. Her test örneği için 3 gözün ortalama kornea şişmesi yüzdesi ve floresin penetrasyonu hesaplanır ve sonuçlar, kontrol grubundaki sonuçlarla karşılaştırılır.⁸ IRE testiyle Draize testine benzer şekilde kornea yüzeyindeki irritasyon veya korozyon tespit edilebilir.¹²

İZOLE TAVUK GÖZÜ TESTİ

Hayvanların, sadece göz irritasyon ve korozyon testleri için feda edilmesini önlemek için tavuk gözle-riyle de bu testlerin yapılabileceği düşünülmüş ve izole tavuk gözü (ICE) testi geliştirilmiştir. ICE testinde, IRE testine benzer şekilde kimyasalların kornea ve konjonktiva üzerine etkileri incelenir. Değerlendirmeler, kimyasal maddenin uygulanmasından 30, 75, 120, 180 ve 240 dk sonra yapılır. Floresin penetrasyonu, maruziyetten 30 dk sonra sadece bir kez kontrol edilir. Sonuçlar, kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak maddelerin iritan olup olmadıkları belirlenir. Bu testin avantajı aynı suş, yaş ve ağırlıktaki tavukların bulunmasının kolay olması ve tavuk gözlerinin kullanılabilirliğinin ve kalitesinin iyi olmasıdır.¹⁸ ICE testiyle iritan olmayan maddeler ve GHS Kategori 1'de yer alan maddeler belirlenebilir. ICE testi, ECVAM tarafından alternatif test yöntemi olarak valide edilmiştir ve 2009 yılında ICE ile ilgili OECD TG438 kılavuzu yayımlanmıştır. Kılavuz, 2013 ve 2018 yıllarında güncellenmiştir.^{8,12,19}

SİĞİR KORNEASI OPASİTE VE GEÇİRGENLİK TESTİ

Sığır korneası opasite ve geçirgenlik (BCOP) testinde sığırgözleri kullanılır. Göz, özel olarak modifiye edilmiş bir opasitometrenin içinde yer alan kornea tutucuya yatay olarak yerleştirilir. Sıvılar ve katı yüzey aktif maddeler 10 dk, yüzey aktif madde olmayan katı maddeler ise 4 saat boyunca korneanın epitel yüzeyine uygulanır. Test sonunda opasitometre ile kornea opasitesi ve görünür ışık spektrofotometresi ile geçirgenliğin ölçüsü olarak, floresein boya miktarı ölçülür.^{2,8,12} BCOP testi, GHS Kategori 1'de yer alan maddeleri ve iritan olmayan maddeleri taramak için uygundur. Bu test, ECVAM tarafından alternatif test yöntemi olarak valide edilmiştir ve 2009 yılında BCOP ile ilgili OECD TG437 kılavuzu yayımlanmıştır. 2013 ve 2017 yıllarında ise kılavuz güncellenmiştir.²⁰

DOMUZ KORNEASI OKÜLER TERSİNİRLİK TESTİ

Domuz korneaları, kalınlık ve yapı açısından insan korneasına daha çok benzediği için Piehl ve ark., sığır korneaları yerine domuz korneasını kullanarak, “domuz korneası oküler tersinirlik (PorCORA) testi geliştirmişlerdir. Domuz korneasının test materyaline maruziyetinin ardından sodyum floresin boyası ile kornea hasarının geri dönüşlü olup olmadığı ölçülür. Bu test sayesinde geri dönüşümlü etkiler saptanabildiğinden, GHS'nin tüm kategorilerinde yer alan kimyasal maddelerin değerlendirilmesi için kullanılabilir. PorCORA, risk değerlendirmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak bu test, düzenleyici otoriteler tarafından henüz kabul edilmemiştir ve herhangi bir kılavuzda yer almamaktadır.^{6,21}

OKÜLER OLMAYAN EX VİVO ORGANOTİPİK YÖNTEMLER

Ex vivo oküler organotipik modeller, konjonktival ve iridial yanıtlarda, inflamasyonda ve korneada iyileşmeyi tanımlamakta henüz yeterli sonuçlar veren testler değildir.²² Bu nedenle tavuk yumurtası testi-koryoallantoik membran testi (HET-CAM), koryoallantoik membran-tripan mavisi boyama testi (CAM-TB) ve koryoallantoik membran vasküler testi (CAMVA) gibi döllenen yumurtaları kullanan göz irritasyon testleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, insan gözlerinin vasküler mukozal dokularına benzeyen koryoallantoik membran kullanılır ve test maddelerinin konjonktiva üzerindeki etkileri incelenir.¹²

TAVUK YUMURTASI KORYOALLANTOİK MEMBRAN TESTİ

Kimyasalların koryoallantoik membran üzerinde oluşturduğu etkilerin, gözde oluşturduğu etkilere benzer olduğu düşünüldüğünden HET-CAM testinde, kornea dokusu yerine döllenen tavuk yumurtasının koryoallantoik membranı kullanılır. Embriyonik sinir sisteminin gelişimi 10 günden önce tamamlanmadığından, yumurtalar döllenenmeden sonraki 10. güne kadar kullanılabilir. Test materyali, koryoallantoik membrana uygulanır ve membrandaki hemoraji, lizis ve koagülasyon HET-CAM skalasına göre değerlendirilir. Bu nedenle HET-CAM testinin, konjonktival etkileri doğrudan ele alan tek organotipik yöntem olduğu söylenebilir. Luepke ve ark., tarafından geliştirilen test, hafif iritan ve iritan olmayan test maddeleri için uygundur.¹⁸

rilen test, hafif iritan ve iritan olmayan test maddeleri için uygundur.¹⁸

KORYOALLANTOİK MEMBRAN TRİPAN MAVİSİ BOYAMA

HET-CAM ile ilişkili objektif bir değerlendirme ve nicelik eksikliğinden kaynaklanan dezavantajların üstesinden gelmek amacıyla CAM-TB yöntemi geliştirilmiştir. Hücre canlılığını ölçmek için yaygın olarak kullanılan tripan mavisi boyası ile membranın tahribatı ve denatürasyonu tespit edilir. CAM-TB yöntemiyle membran tarafından adsorbe edilen tripan mavisi miktarı ölçülerek, maddelerin toksik etkileri incelenebilir.²³

KORYOALLANTOİK MEMBRAN VASKÜLER TESTİ

CAMVA, koryoallantoik membranı temel alan 2. analiz yöntemidir. HET-CAM testinin aksine, CAMVA'da sadece membran üzerindeki vasküler etkiler kaydedilir. Test materyaline maruziyetten 30 dk sonra koryoallantoik membranda hemoraji, hiperemi gibi herhangi bir vasküler değişiklik olup olmadığı kontrol edilir. Takiben, yumurtaların %50'sinde bu tür zararlı etkileri ortaya çıkaran test materyallerinin konsantrasyonu hesaplanır.^{8,24}

HÜCRE TESTLERİ

Fluorescein Sızıntısı Testi

Tchao tarafından 1988 yılında geliştirilen fluoreskein sızıntısı (FL) testinde, iritan maddelere maruz kalan Madin-Darby köpek böbreği (MDCK) hücrelerindeki transepitelyal geçirmezliğin kaybı, FL derecesinin belirlenmesiyle ölçülür. FL testinde MDCK hücreleri, hücre kültüründeki mikrogözenekli filtrelerde büyütülür. Hücreler, 1 dk boyunca test materyaline maruz bırakılır ve FL spektrofotometrik olarak ölçülür. Sonuçlar, sodyum fluoreskeinin sırasıyla %20 ya da %50 sızıntıya neden olan test materyali dozunu yansıtan FL₂₀ ya da FL₅₀ değerleri olarak ifade edilir. FL₂₀ ve FL₅₀ değerleri, test edilen kimyasalların toksisitelerini değerlendirmek için kullanılır. FL₂₀ veya FL₅₀ değeri, ne kadar düşük olursa kimyasal madde göz için o kadar iritandır.²⁴

Bu test, GHS Kategori 1'de yer alan kimyasalları tanımlamak için kullanılabilir, ancak iritan olmayan maddeler (GHS kategorisi yok) ve GHS

Kategori 2'de yer alan maddeler için kullanılmamaktadır.⁶ FL testi, ECVAM tarafından alternatif test yöntemi olarak valide edilmiştir ve FL ile ilgili OECD TG460 kılavuzu yayımlanmıştır.²⁵

Sitosensör Mikrofizyometre Testi

Sitosensör mikrofizyometre (CM) ya da silikon mikrofizyometre testi, hücrel metabolizmaya bağlı olarak, asit metabolit üretim hızının mikrofizyometre cihazı yardımıyla ölçülmesi esasına dayanır. CM testinde fare L929 fibroblastları, artan konsantrasyonlardaki test maddesine doz başına yaklaşık 810 saniye boyunca maruz bırakılır. Maruziyetin ardından asidite oranı ölçülür. Test sonuçları, asidite oranında temel kontrol seviyelerinin %50'sine düşürmek için gerekli test maddesi dozu olan metabolik hızı %50 düşüren doz (MRD₅₀) MRD₅₀ değeri ile ifade edilir. MRD₅₀ değeri, test maddesi konsantrasyonu ile ilgili doz-cevap eğrilerinden belirlenir.²⁴ CM, şiddetli iritan (GHS Kategori 1) ile iritan olmayan maddelerin tanımlanması için önerilmektedir. Bu test sistemiyle ilgili taslak bir OECD kılavuzu inceleme altındadır.²⁶

Kısa Süreli Maruziyet Testi

Kısa süreli maruziyet (STE) testinde, Statens Serum Enstitüsü tavşan kornea [Statens Serum Institut rabbit cornea (SIRC)] hücreleri, 5 dk boyunca %5 ve %0,05'lik konsantrasyonda test materyallerini içeren serum fizyolojik çözeltisine maruz bırakılır. Sitotoksiste, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) deneyi ile 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu test, iritan olmayan maddeleri (GHS kategorisi yok) ve GHS Kategori 1'de yer alan maddeleri tanımlamak için önerilir. STE ile ilgili OECD TG491 kılavuzu yayımlanmıştır.^{6,27}

Nötral Kırmızı Alımı Testi

Nötral kırmızı alımı (NRU) testi, en sık kullanılan sitotoksiste testlerinden biridir. Canlı hücreler, nötral kırmızı ile boyandıklarında, boyayı lizozomlarına alırlar. Hücre ölümü başladığında, kırmızı boyayı alma kapasiteleri azalır. Yani hücrelerin nötral kırmızı boya ile boyanmaları, hücre canlılığını temsil eder. Bu testte, Çin hamsteri V79, Çin hamsteri yumurtalık hücresi, 3T3 ve SIRC gibi hücreleri içeren çeşitli

hücre hatları kullanılabilir. Hücreler, nötral kırmızı boyası ile boyanır ve yıkama aşamasından sonra 540 nm'de optik yoğunluk ölçülür. Bu test, özellikle düşük göz tahrişi potansiyeli olan ürünleri ve sürfaktanları değerlendirmek için yararlıdır.¹²

Nötral Kırmızı Salımı Testi

Nötral kırmızı salımı (NRR) testi, yaygın olarak kullanılan NRU testinin farklı bir çeşididir. Nötral kırmızısı katyonik bir boyadır, canlı ve sağlıklı hücrelerde lizozomlarda birikir. NRR testi de primer hücre kültürleri veya hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilir. Hücre kültürleri, 3 saat boyunca nötral kırmızısı ile inkübe edilir. Ortam değiştirildikten sonra hücreler, 1 ile 5 dk süreyle test materyaline maruz bırakılır. Sonrasında hücreler, uygun bir çözücü ile yıkanır. Bu sayede lizozomlarda bulunan nötral kırmızı boyanın salımı gerçekleşir. Elde edilen çözeltinin optik yoğunluğu 540 nm'de ölçülür. NRR esas olarak, sürfaktan bazlı formülasyonları değerlendirmek için kozmetik endüstrisi tarafından kullanılmaktadır.⁸

Kırmızı Kan Hücresi Testi

Pape ve ark. tarafından 1987 yılında geliştirilen kırmızı kan hücresi (RBC) testinde amaç, standart koşullar altında test materyaliyle inkübe edilen, kırmızı kan hücrelerinde meydana gelen hemoglobin sızıntısının ölçülmesidir. RBC testinin orijinal protokolünde, insan eritrositleri kullanılmıştır.²⁸ Ancak Lewis ve ark. tarafından yapılan çalışmayla bu testin, tavşanlardan alınan RBC ile de yapılabileceği gösterilmiştir. Protein denatürasyonu, test maddesinin konsantrasyonunun artmasına karşılık, 541 nm'de (maksimum oksihemoglobin absorbanın olduğu dalga boyu) ölçülen absorbanın azalmasının saptanmasıyla ölçülür.²⁹ Diğer sitotoksiste testlerine kıyasla RBC testi, açık ve basittir ve ayrıca memeli eritrositlerinin elde edilmesi kolaydır. Şu ana kadar bu test, sadece sürfaktanların test edilmesi için kullanılmıştır.²⁴

YENİDEN YAPILANDIRILMIŞ İNSAN KORNEA BENZERİ EPİTEL MODELLERİ

Yeniden yapılandırılmış insan kornea benzeri epitel (RhCE) modelleri, kullanılan hücre tipine göre fark-

lılık gösterir. RhCE modellerinde insan derisi keratinositleri, insan kornea hücreleri gibi kornea veya kornea dışı hücreler kullanılabilir. RhCE hücrelerinin kullanıldığı sistemlerle ilgili OECD TG492 kılavuzu yayımlanmıştır.^{6,30}

EPIOCULAR™ GÖZ İRRİTASYON TESTİ

EpiOcular™ (MatTek Corporation, Ashland, MA, ABD) göz irritasyon testi (EIT), geçirgen bir polikarbonat memb-n üzerinde yer alan, insandan türetilen epidermal keratinositlerden oluşur. Bu 3 boyutlu yapı, korneaya benzer yassı, çok katmanlı bir epitel oluşturur. Doku, bir hava-sıvı ara yüzüne sahiptir ve insan gözüne benzer bir morfolojik yapıdadır. Bu modelde kimyasallar, potansiyel göz irritasyonunu tahmin etmek için doğrudan doku yüzeyine uygulanabilir.¹

Dokudaki hücrelerin canlılığı, hücrelerin oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimini devam ettirmesiyle ölçülür. Bazı boyalar, bu oksidatif fosforilasyon sırasında elektronları yakalayıp indirgenir. Bu boyalardan biri olan MTT sayesinde hücre popülasyonunun sürekli redoks döngüsü ölçülerek, hücre canlılığı belirlenebilir. MTT deneyi ile ölçülen doku canlılığı, negatif kontrole kıyasla \leq %60 ise test materyali irritan olarak sınıflandırılır. Daha yüksek bir doku canlılığı varsa bu durum, test materyalinin irritan olmayan bir madde olduğunu gösterir.⁶ EpiOcular™ EIT, GHS Kategori 1 ve GHS Kategori 2 arasında ayırım yapmamaktadır. Mevcut testle irritan olmayan maddelerle irritan maddelerin ayrılması amaçlanmıştır. EpiOcular™ EIT, 2014 yılında alternatif test metodu olarak ECVAM tarafından valide edilmiştir.³⁰

SKİNETHIC™ İNSAN KORNEA EPİTEL MODELİ

SkinEthic™ (Episkin, Lyon Cedex, Fransa) insan kornea epitel (HCE) modeli, yapısal olarak insan gözünün korneal mukozasına çok benzeyen insan kornea epitel mukozası hücrelerinden standartlaştırılmış 3 boyutlu bir modeldir. Bu modelde test maddeleri, 2 farklı maruz kalma süresi kullanılarak test edilir: 1) Kısa süreli: HCE 10 dk boyunca kimyasal maddeye maruz bırakılır; 2) Uzun süreli: HCE 60 dk boyunca kimyasal maddeye maruz bırakılır ve ardından 16

saat inkübe edilir.² Testin sonunda MTT boyası veya laktat dehidrogenaz salımı kullanılarak, doku canlılığı ölçülebilir. Bu yöntem kullanılarak histolojik incelemeler yapılabilir. Ayrıca sitokin salımı (örneğin interlökin (IL)-1 α , IL-6, IL-8, prostaglandin E2) ölçülebilir veya gen ekspresyonları değerlendirilebilir.⁸ Kimyasal maddeye maruz kalan hücrelerin canlılığı, maruziyet sonrasında %50'den daha fazla ise kimyasal madde, irritan olmayan madde olarak değerlendirilir. SkinEthic™ HCE modeli, ECVAM tarafından alternatif test metodu olarak valide edilmiştir.²

LABCYTE KORNEA MODELİ (LABCYTE CORNEA MODEL, J-TEC, JAPAN)

Labcyte kornea modeli (LabCyte, San Jose, CA, ABD), normal insan kornea epitel hücreleri kullanılarak Japonya menşeli bir ticari firma tarafından geliştirilmiştir. Labcyte kornea modeli morfoloji, histoloji ve biyogösterge ekspresyonu (sitokeratin-3, müsin-1, müsin-16, klaudin-1, desmoglein-3 gibi) yönünden insan kornea epiteline benzerdir. Bu modelde test materyalinin uygulanmasının ardından, doku canlılığı MTT ile 570 nm'de veya suda çözünen formazan 8 [tetrazolyum (WST)-8] ile 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu modelle yapılan çalışmalarda, yüksek kesinlik derecesiyle umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak Labcyte kornea modeli, henüz resmî olarak valide edilmiştir.^{2,30,31}

MCTT İNSAN KORNEA BENZERİ EPİTEL MODELİ

MCTT insan kornea benzeri epitel (HCE™) (Biosolution, Korea) modelinde kornea transplantasyonundan sonra insan limbal dokularından izole edilmiş limbal epitel hücreleri kullanılır. MCTT HCE™ modelinde hücreler, sıvı maddelere 10 dk, katı maddelere ise 1 saat maruz bırakılır. Test materyalinin uygulanmasının ardından aynı dokuda histolojik analiz yapılmasını da sağlayan suda çözünür formazan 1 (WST-1) ile doku canlılığı 440 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.¹²

VİTRİGEL® (KANTO CHEMICAL CO., INC., TOKYO, JAPONYA) GÖZ İRRİTASYON TESTİ

RhCE hücreleri ile yapılan testlerin çoğunda, polikarbonat membran gibi sentetik iskeleler kullanılır.

Takezawa ve ark., “kollajen vitrigel membran” adı verilen yüksek yoğunluklu kollajen fibrillerden oluşan özel bir kollajen membran üzerinde yeniden yapılandırılmış hCE içeren bir model geliştirmiştir.^{6,32} Bu test, kimyasal maddenin Vitrigel® göz iritasyon testi yönteminde kullanılan hücrelerin, bariyer işlevine zarar verme yeteneğine dayanarak göz iritasyon potansiyelini ölçer. Göz iritasyonuna neden olan kimyasalların önce gözyaşı filmini ve epitel bariyer fonksiyonunu tahrip ettiği, daha sonra epitel hücre ölümüne yol açtığı ve nihayetinde korneal opaklığa neden olan stromal dejenerasyon ve endotel hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Vitrigel® yönteminde transepitelyal elektrik direnci değerlerindeki zamana bağlı ortaya çıkan değişiklikler, bir test kimyasalına maruz kaldıktan sonra kornea epitelinin bariyer fonksiyonunda meydana gelen zararın göstergesidir.^{6,33}

Vitrigel® yöntemi, iritan olmayan kimyasalların tanımlanmasını sağlayan bir in vitro test yöntemidir. Bu yöntemle ilgili OECD tarafından 2019 yılında TG494 kılavuzu yayımlanmıştır. Bu kılavuzda OECD, test kimyasallarının sınırlı uygulanabilirlik alanı içinde kullanıldığında (pH>5,0 olan ve katı olmayan kimyasallar), iritan olmayan kimyasallarının tanımlanması için uygun olduğu sonucuna varmıştır.^{6,33}

VALİDE EDİLMİŞ ALTERNATİF YÖNTEMLERİN UYGULAMA ALANLARI, AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

İn vivo Draize testine alternatif olarak geliştirilip, valide edilen yöntemler sayesinde GHS Kategori 1’de yer alan kimyasallar (gözlerde geri dönüşümsüz hasar oluşturan kimyasallar) ve/veya iritan olmayan (kategorisi bulunmayan) kimyasallar belirlenebilir. Ancak Kategori 2’de (gözlerde geri dönüşümlü hasar oluşturan kimyasallar) yer alan kimyasalları belirlemek için tek başına uygulanabilen bir alternatif yöntem bulunmamaktadır.⁶

SİĞİR KORNEASI OPASİTE VE GEÇİRGENLİK TESTİ
BCOP, geri dönüşümsüz göz hasarına neden olan kimyasalları (Kategori 1) ve iritan olmayan (kategorisi bulunmayan) kimyasalları tanımlamak için önerilir. Oküler maruziyetle ilişkili sistemik toksisite potansiyelinin değerlendirilmesi için uygun değildir. Bu yöntemle gaz ve aerosoller test edilemez. Alkoller ve ketonlar için yanlış pozitif tahminlere ve katılar için yanlış negatif tahminlere neden olabilir.³⁴

TABLO 2: Kimyasal maddelerin küresel uyum sistemi kategorilerini belirlemek için kullanılan alternatif yöntemler. ⁶		
GHS kategori yok	GHS kategori 2	GHS kategori 1
BCOP	Onaylanmış	BCOP
ICE	bağımsız	ICE
CM	alternatif yöntem	CM
EIT	mevcut değil	FL
HCE		

GHS: Küresel uyum sistemi; BCOP: Siğir korneası opasite ve geçirgenlik testi; ICE: İzole tavuk gözü testi; CM: Sitosensör mikrofizyometre; EIT: EpiOcular™ göz iritasyon testi; HCE: SkinEthic™ insan kornea epitel modeli; FL: Fluorescein sızıntısı testi.

site potansiyelinin değerlendirilmesi için uygun değildir. Bu yöntemle gaz ve aerosoller test edilemez. Alkoller ve ketonlar için yanlış pozitif tahminlere ve katılar için yanlış negatif tahminlere neden olabilir.³⁴

İZOLE TAVUK GÖZÜ TESTİ

ICE testi de gaz ve aerosoller için uygun bir test değildir ve sistemik toksisitenin belirlenmesinde kullanılamaz. Alkoller için yanlış pozitif tahminlere, katı ve yüzey aktif maddeler için yanlış negatif tahminlere neden olabilir. Aynı BCOP testi gibi Kategori 1 ve iritan olmayan kimyasalları belirlemek amacıyla kullanımı uygundur.^{6,34}

FLORESİN SIZINTISI TESTİ

FL testi, geri dönüşümsüz göz hasarına neden olan kimyasalları (Kategori 1) tanımlamak için önerilir. Bu yöntem, sadece suda çözünen kimyasallar için ve/veya toksik etkinin seyreltmeden etkilenmediği durumlar için geçerlidir. Kuvvetli asitler, bazlar ve yüksek derecede uçucu kimyasallar için uygulanamaz.^{25,34}

KISA SÜRELİ MARUZİYET TESTİ

STE testi de Kategori 1 ve iritan olmayan kimyasalların belirlenmesi için kullanılabilir. Bu yöntem, serum fizyolojik çözeltisinde, %5 dimetil sülfoksit içeren serum fizyolojik çözeltisi içerisinde veya mineral yağda çözünen veya süspansiyon hâlinde kalan kimyasallar için uygundur. Bu sayede suda çözünmeyen test kimyasallarının da (örneğin uzun zincirli yağ alkolleri veya ketonlar) göz iritasyon potansiyelleri tahmin edilebilir.^{27,34}

YENİDEN YAPILANDIRILMIŞ İNSAN KORNEA BENZERİ EPİTEL MODELLERİ

RhCE modelleri, iritan olmayan (kategorisi bulunmayan) kimyasalları tanımlamak için kullanılır. Katılara, sıvılara, yarı katılara ve vakslara uygulanabilir. Bu yöntemle gaz ve aerosoller test edilemez.³⁴ Kimyasal maddelerin GHS kategorilerini belirlemek için kullanılan alternatif yöntemler **Tablo 2'**de gösterilmiştir.

SONUÇ

Günümüzde medikal ürünler için oküler toksisite araştırmalarında ve bu ürünlerin göz irritasyon potansiyellerinin değerlendirilmesinde, hayvan deneyleri kullanılmaktadır. Ancak kozmetikler ve kişisel bakım ürünlerinin oküler etkilerinin değerlendirilmesi için alternatif in vitro yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemlerden bazıları düzenleyici otoriteler tarafından kabul edilmiştir. Oküler irritasyon için tek başına hayvan testi yerine geçecek in vitro yöntem henüz geliştirilmemiştir. Bununla birlikte, dünyadaki birçok akademik veya özel araştırma-geliştirme laboratuvarı tarafından oküler toksisite çalışmaları için hücre ve doku kültürleri başta olmak üzere birçok in vitro yöntem kullanılmaktadır. Oküler toksisite testlerinde, hayvan kullanımının tamamen ortadan kaldırılması için öncelikle hücresel düzeyde değişikliklerin, inflamasyonun ve oküler doku onarımının daha iyi anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.^{12,35,36}

Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, doku mühendisliğinde geliştirilen 3 boyutlu yazıcılar gibi yön-

temler sayesinde insan gözüne çok benzeyen doku modelleri geliştirilebilir. Hücresel ve moleküler biyolojinin ve analitik sitometrik tekniklerin uygulanması temeline dayanan doku ve hücre kültürü teknikleri sayesinde, bilim insanları oküler toksisite testlerinde hayvan deneyi ihtiyacını ortadan kaldırma hedefine her geçen gün daha da yaklaşmaktadır. Ancak birçok bilimsel yayın ve veri, in vitro ve in vivo testlerin yerini alması için en az 10 yıllık bir süreye ihtiyaç duyulabileceğini ifade etmektedir.^{1,35}

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Pınar Erkekoğlu, Suna Sabuncuoğlu; **Tasarım:** Pınar Erkekoğlu, Suna Sabuncuoğlu; **Denetleme/Danışmanlık:** Pınar Erkekoğlu, Suna Sabuncuoğlu; **Analiz ve/veya Yorum:** Hülya Tezel, Pınar Erkekoğlu; **Kaynak Taraması:** Hülya Tezel; **Makalenin Yazımı:** Hülya Tezel, Suna Sabuncuoğlu, Pınar Erkekoğlu; **Eleştirel İnceleme:** Pınar Erkekoğlu.

KAYNAKLAR

- Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci.* 2008;97(1):46-59. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wilson SL, Ahearn M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology.* 2015;2;327:32-46. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McCaa CS. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environ Health Perspect.* 1982;44:1-8. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
- Willoughby CE, Ponzin D, Ferrari S, Lobo A, Landau K, Omid Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidosis disease on structure and function - a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2010;38(1):2-11. [\[Crossref\]](#)
- Huhtala A, Salminen L, Tähti H, Uusitalo H. Corneal models for the toxicity testing of drugs and drug releasing materials. In: Ashammakhi N, eds. Vol 1. Multifunctional Biomaterials and Devices. Oulu University E-book Series. Oulu, Finland Publisher; 2008; p.1-24. [\[Link\]](#)
- Lotz C, Schmid FF, Rossi A, Kurdyn S, Kampik D, De Wever B, et al. Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. *ALTEX.* 2016;33(1):55-67. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Maurer JK, Parker RD, Jester JV. Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002;36(1):106-17. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Eskes C, Bessou S, Bruner L, Curren R, Harbell J, Jones P, et al. Eye irritation. *Altern Lab Anim.* 2005;33 Suppl 1:47-81. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)

9. OECDiLibrary [Internet]. © 2017 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 405: Acute eye irritation/corrosion. Paris: OECD Publishing; 2017. Erişim linki: [\[Crossref\]](#)
10. EUR-Lex [Internet]. European Union (EU). Council Directive 93/35/EEC of 14 June 1993 amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. (Last Access Date: 14.01.2021) Erişim linki: [\[Link\]](#)
11. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) [Internet]. [Erişim tarihi: 04-05.2020]. Kozmetik ürünler üzerinde yapılan hayvan deneylerine alternatif test metodlarına ilişkin kılavuz sürüm 1.0. Erişim linki: [\[Link\]](#)
12. Lee M, Hwang JH, Lim KM. Alternatives to in vivo Draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicol Res.* 2017;33(3):191-203. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
13. Luechtefeld T, Maertens A, Russo DP, Rovida C, Zhu H, Hartung T. Analysis of draize eye irritation testing and its prediction by mining publicly available 2008-2014 REACH data. *Altex.* 2016;33(2):123-34. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
14. Barile FA. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(2):136-45. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
15. Ubels JL, Clousing DP. In vitro alternatives to the use of animals in ocular toxicology testing. *Ocul Surf.* 2005;3(3):126-42. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF, et al. Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundam Appl Toxicol.* 1986;7(4):626-34. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Unclassified Joint Meeting of the Chemicals Committee and The Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology Cancels & Replaces. The Same Document Of 6 July 2018 Guidance Document No 263 On Integrated Approaches To Testing and Assessment Iata. 2019;263(263). (Last Access Date: 14.01.2021). [\[Link\]](#)
18. Luepke NP, Kemper FH. The HET-CAM test: an alternative to the draize eye test. *Food Chem Toxicol.* 1986;24(6-7):495-6. [\[Crossref\]](#)
19. OECDiLibrary [Internet]. © 2021 OECD. Test No. 438: Isolated chicken eye test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Paris: OECD Publishing; 2009. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021)
20. OECDiLibrary [Internet]. © 2021 OECD. Test No. 437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Paris: OECD Publishing; 2009. Erişim linki: [\[Link\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021).
21. Piehl M, Gilotti A, Donovan A, DeGeorge G, Cerven D. Novel cultured porcine corneal irritancy assay with reversibility endpoint. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(1):231-9. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. OECDiLibrary [Internet]. © 2019 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 496: In vitro macromolecular test method for identifying chemicals inducing serious eye damage and chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: OECD Publishing; 2019. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021).
23. Hagino S, Kinoshita S, Tani N, Nakamura T, Ono N, Konishi K, et al. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol In Vitro.* 1999;13(1):99-113. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Spielmann H. Ocular irritation. In: Castell JV, Gómez-Lechón MJ, eds. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research.* 1st ed. San Diego: Academic Press; 1999. p.265-87. [\[Crossref\]](#)
25. OECDiLibrary [Internet]. © 2017 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 460: Fluorescein leakage test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Paris: OECD Publishing; 2017. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021)
26. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline; 2010. p.1-16. [\[Link\]](#)
27. OECDiLibrary [Internet]. © 2018 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 491: Short time exposure in vitro test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: OECD Publishing; 2018. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021)
28. Pape WJ, Pfannenbecker U, Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol Toxicol.* 1987-1988;1(4):525-36. [\[PubMed\]](#)
29. Lewis RW, McCall JC, Botham PA. Use of an in vitro test battery as a prescreen in the assessment of ocular irritancy. *Toxicol In Vitro.* 1994;8(1):75-9. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. OECDiLibrary [Internet]. © 2019 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 492: Reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: OECD Publishing; 2019. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021)
31. Katoh M, Uemura N, Hamajima F, Ogasawara T, Hata K. Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the Draize eye test for the assessment of eye irritation. *Altern to Anim Test Exp.* 2012;17(1):2-8. [\[Link\]](#)
32. Takezawa T, Ozaki K, Nitani A, Takabayashi C, Shimo-Oka T. Collagen vitrigel: a novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplant.* 2004;13(4):463-73. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. OECDiLibrary [Internet]. © 2019 OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test No. 494: Vitrigel-eye irritancy test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: OECD Publishing; 2019. Erişim linki: [\[Crossref\]](#) (Last Access Date: 14.01.2021)
34. European Chemicals Agency (ECHA). How to use new or revised in vitro test methods to address Serious eye damage/eye irritation. 2018;1-7. [\[Link\]](#)
35. Rönkkö S, Vellonen KS, Järvinen K, Toropainen E, Urtti A. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Delivery and Translational Research.* 2016;6(6):660-75. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
36. Köse Ö, Erkekoğlu P, Sabuncuoğlu S, Koçer-Gümüşel B. Kozmetik ürünlerin göz irritasyon potansiyellerinin değerlendirilmesinde geleneksel ve alternatif yöntemler. [Traditional and alternative methods for the evaluation of eye irritation potential of cosmetic products]. *Marmara Pharm J.* 2017;21(2):195-206. [\[Crossref\]](#)