

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BAZI KOZMETİK MADDELERİN CİLT
İRRİTASYON POTANSİYELİNİN TESPİTİNDE
KULLANILABİLECEK *in vitro* BİR TEST
MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Saime Yeliz TUĞRUL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 26.09.2011

Bornova-İZMİR

2011

Saime Yeliz TUĞRUL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Bazı Kozmetik Maddelerin Cilt İritasyon Potansiyelinin Tespitinde Kullanılabilecek in *vitro* Bir Test Modelinin Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.09.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr.	
	S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN	
Raportör Üye	: Yard. Doç. Dr.	
	Feyzan ÖZDAL KURT	
Üye	: Yard. Doç. Dr.	
	Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ	

ÖZET**BAZI KOZMETİK MADDELERİN CİLT İRRİTASYON
POTANSİYELİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK *İN
VİTRO* BİR TEST MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

TUĞRUL, S.Yeliz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Eylül 2011, 102 Sayfa

Ciltle temas halinde bulunan kozmetik materyallerin, kişisel bakım (şampuan, sabunlar, diş macunları, vb.) ve temizlik ürünlerinin içerdikleri kimyasal maddelerin cilt irritasyon potansiyellerinin test edilerek belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada; etik açıdan deney hayvanı kullanmaksızın kimyasalın insan derisi üzerindeki irritasyon potansiyelini net bir şekilde belirlemek için *in vivo* hayvan testlerine alternatif, hücre kültür yöntemleri kullanılarak *in vitro* bir test metodu geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda insan epidermal keratinositleri (İEK) *in vitro* hücre kültürü teknikleri kullanılarak izole edilip monoklonal sitokeratin 8 ve 14 ankikorları ile karakterize edilmiştir. İEK, besi ortamı ile doyurulmuş filtre tabakası taşıyıcısı (substrat) ile desteklenmiş, kollajen kaplı poröz membranlar üzerinde hava-sıvı ara yüzeyinde kültüre edilerek tabakalandırılmıştır. Oluşturulan epidermal kültür modelinin (EKM) uygunluğu a. Histolojik olarak Hematoksilen - Eosin boyama, b. Canlılık, MTT veya vital boyama teknikleri ile c. Bariyer fonksiyonu değerlendirmesi ile saptanmıştır. EKM üzerine farklı konsantrasyonda SLS solusyonları topikal olarak uygulanmıştır. Kimyasalların kültür tabakası ile sabit tutulan temas süresi sonunda hücrelerin mitokondrial aktivitesi MTT analizi ile belirlenmiştir. Paralel olarak EKM' nin kültür süpernatantı içinde bulunan inflamatuvar sitokin (IL 1 α) salınım düzeyi de ölçülerek, test edilen kimyasalların cilt irritasyon potansiyeli belirlenmiştir. Her SLS konsantrasyonu için analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

15 dakika bekletilen 1,5mg/ml ve 20 dakika bekletilen 1mg/ml üzerindeki SLS konsantrasyonlarında irritasyon tespit edilmiştir. Oluşturulan EKM' nin piyasada bulunan ticari epidermal model (EpiDerm) ile karşılaştırılması sonucunda, bu EKM' nin test edilen kimyasallar karşısında daha hassas olduğu izlenmiştir.

Anahtar sözcükler: İritasyon, kozmetik maddeler, keratinosit hücre kültürü, *in vitro* deri testleri, sitotoksite, emilim.

ABSTRACT**RECONSTRUCTION OF *IN VITRO* TEST MODEL FOR
DETERMINATION OF THE SKIN IRRITATION
POTENTIAL CAUSED BY SOME COSMETIC MATERIALS**

TUĞRUL, S.Yeliz

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU-GÜRHAN

September 2011, 102 pages

Skin irritation potentials of chemical ingredients available in cosmetics, personal care products (shampoos, soaps, toothpastes etc) and cleaning preparations, which are coming in contact with the skin, must be determined by suitable test methods. The aim of this work is to develop an *in vitro* test method, based upon cell culture techniques, through which the irritation potentials of chemicals upon human skin can be evaluated, as an alternative to *in vivo* animal tests, ethically without the usage of any test animals.

Human epidermal keratinocytes (HEK) have been isolated by using *in vitro* cell culture techniques and have been characterized by monoclonal cytokeratine 8 and 14 antibodies. HEK' s have been cultured upon collagen impregnated porous membranes, which were supported by the culture medium saturated filter vehicles (substrate) to obtain cell layers at the air – liquid interference. The suitability of the achieved epidermal culture model (ECM) has been controlled and identified ;a. histologically by H&E dyeing,b. by viability determination techniques (MTT or vital dyeing), and c.by barrier function evaluation. SLS solutions have been applicated onto the ECM topically at different concentrations. After the fixed contact period of the chemicals with cultured layer, mitochondrial activities of the cells have been determined by MTT analysis. Parallely, irritation potentials of the tested chemicals have also been controlled by the excretion level measurement of the inflammatory cytokine Interleukin 1- α (IL 1- α) within the supernatant of the culture system. For each concentration determinations have been repeated 3 times.

We have observed detectable irritations by the SLS concentrations of 1,5 mg/ml (contact time period of 15 minutes) and by 1,0 mg / ml (contact time period of 20 minutes). The comparison of the ECM cultured by us with the in market already existing model, we have noticed that this ECM is apparently more sensitive against the chemicals tested by in our work.

Keywords: irritation, cosmetic ingredients, keratinocyte cell culture *in vitro* skin tests, cytotoxicity, permeability.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım ve tezim süresince danışmanım Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhan'a verdiği sonsuz destek ve çalışmam süresince paylaştığı her türlü bilgi ve deneyimi için teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma boyunca, yanımda olan destek veren, tüm hayvan hücre ve doku kültürü laboratuvarı çalışanlarına, immünohistokimya çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden ötürü Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Seda Vatansever ve çalışma grubuna teşekkür ederim.

Tezim boyunca 462.STZ.2009-2 kod numaralı SANTEZ projesi kapsamında çalışmamı destekleyen ve burs sağlayan Sanayi Bakanlığı ve ANKA Özel Sağlık Hizmetlerine, katkılarından dolayı EBİLTEM'e, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan, beni anlayan ve destekleyen sevgili eşim ve anneme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmamı, her zaman yanımda olup umutsuz anlarımda bana yol gösteren, desteğini kalbimde hissettiğim canım babama adıyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Derinin Yapısı ve Fonksiyonları.....	4
2.1.1 Hipodermis.....	4
2.1.2 Dermis.....	4
2.1.3 Epidermis.....	5
2.2 Derinin Biyokimyasal Özellikleri.....	9
2.3 Epidermal Bariyer.....	10
2.3.1 Perkutanöz (dermal) absorbsiyon.....	12
2.4 Kozmetik Maddelerin Ciltte Yarattığı Reaksiyonlar.....	14

İÇİNDEKİLER (devam)

2.4.1 İrritasyon.....	15
2.4.2 Cilt hassasiyeti.....	17
2.5 Kozmetik Maddelerin Toksisite Testleri.....	19
2.5.1 Draize testi.....	20
2.5.2 Kobay maksimizasyon testi (gpmt).....	22
2.5.3 Lokal lenf nodu testi (llna).....	22
2.5.4 Yama (patch) testi.....	23
2.5.5 Prick (iğne) testi.....	24
2.6 Kozmetik Alanında Kullanılan Alternatif Test Metotları.....	25
2.6.1 Sığır kornea opaklık ve geçirgenlik testi (bcop).....	26
2.6.2Het-Cam (hen'in yumurta testi- korioallantoik membran).....	27
2.6.3 <i>İn vitro</i> deri iritasyon testi; insan epidermal modeli.....	29
3. MATERYAL METOT.....	42
3.1 Nih 3t3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin Üretilmesi ve Stoklanması.....	43
3.1.1 Nih 3t3 (fare embriyonik fibroblast) hücrelerinin karakterizasyonu..	45
3.1.2 Nih 3t3 (fare embriyonik fibroblast) hücreleri ile besleyici tabaka oluşturulması	47

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2 İnsan Kaynaklı Epidermal Keratinosit (İEK) İzolasyonu	48
3.2.1 Epidermal keratinositlerin karakterizasyonu	51
3.3 Epidermal Kültür Modeli (EKM)'nin Oluşturulması.....	52
3.3.1 Gözenekli membran yapılarının kollajen ile kaplanması.....	52
3.3.2 Kollajen kaplı poröz membranlar üzerinde epidermal model oluşturulması.....	54
3.3.3 Keratinosit kültür modelinin histolojik analizi	55
3.4 Epidermal Kültür Modeli Üzerine Kimyasalların Uygulanması Ve İritasyon Potansiyelinin Tespiti.....	57
3.4.1 MTT testi	58
3.4.2 EC_{50} / IC_{50} Ve ET_{50} Değerlerinin Hesaplanması.....	60
3.4.3 İnsan interlekin 1- α (IL-1 α) analizi.....	61
3.5 İstatistiksel Değerlendirme.....	62
4. BULGULAR.....	63
4.1 NIH 3T3 Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	63
4.1.1 Mitomisin C Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	65
4.2 Deri Dokusundan İek İzolasyonu Ve Morfolojik Özellikleri.....	67
4.3 İnsan Epidermal Keratinositlerin (İEK) Karakterizasyonu.....	69
4.4.1 İEK 'lerinin üreme kinetiği.....	69
4.4.2 İEK 'lerinin immünohistokimyasal özellikleri.....	69
4.5 İEK 'lerinin poröz membranlar üzerinde geliştirilmesi.....	72

İÇİNDEKİLER (devam)

4.6 Epidermal Kültür Modelinin Histolojik Analizi.....	72
4.6.1 Epidermal Kültür Modelinin Bariyer Fonksiyon Analizi.....	73
4.7 EKM kullanılarak SLS' ın irritasyon potansiyelinin belirlenmesi.....	74
4.7.1 MTT Analizi.....	75
4.7.3 EC_{50} / IC_{50} ve ET_{50} değerlerinin hesaplanması.....	80
4.7.3 hIL1- α analizi.....	81
5. TARTIŞMA.....	86
6.SONUÇ.....	89
7.ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Derinin Yapısı.....	5
Şekil 2.2 Epidermisin Tabakaları	6
Şekil 2.3 Dermo- Epidermal Bağlantı Bölgesinde Bazal Epidermisin Görünümü	7
Şekil 2.4 Keratinin Moleküler Yapısı	9
Şekil 2.5 Epidermisin Bariyer Fonksiyonu	11
Şekil 2.6 <i>St. Korneum</i> Membranı, Diffüzyonda İzlenen Yolaklar	12
Şekil 2.7 Dermal İrritasyon Mekanizmaları Ve Ölçümü	16
Şekil 2.8 Akut Kontakt Dermatit'te Hassasiyet	18
Şekil 2.9 Kimyasal Maddelerin Toksisite Testleri	20
Şekil 2.10 Draize Testi.....	21
Şekil 2.11 Yama Testi Uygulanması	23
Şekil 2.11 Prick Testi Uygulanması	25
Şekil 2.12 Sığır Kornea Opaklık Ve Geçirgenlik Testi	27
Şekil 2.13 HET-CAM Testinin Aşamaları.....	28
Şekil 2.14 Epidermal Farklılaşmayı Kontrol Eden Faktörler.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 2.15 Keratinositler Tarafından Oluşturulan Organotipik Kültür Sistemi.....	35
Şekil 2.16 Fibroblastlar İle Oluşturulan Organotipik Kokültürde Keratinositlerin Büyümesinin Düzenlenmesinde Karşılıklı Parakrin Yol İzleri	36
Şekil 2.17 Deri Yapılarının Karşılaştırılması	37
Şekil 2.18 Deri Doku Mühendisliği Prensipleri	38
Şekil 3.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin Farklı Hücre Yoğunluklarındaki Mikroskop Görüntüleri.....	43
Şekil 3.2 Deri Dokusundan Keratinosit İzolasyonu.....	50
Şekil 3.4 Epidermal Kültür Modeli Oluşturulurken Kullanılan Poröz Membran	53
Şekil 3.5 Epidermal Kültür Modelinin Histolojik Analizi	57
Şekil 3.6 SLS'in Genel Kimyasal Yapısı	59
Şekil 3.7 Farklı SLS Konsantrasyonlarının Doku Modeli Üzerine Uygulanması.....	60
Şekil 3.8 ELISA Kalibrasyon Eğrisi	63
Şekil 4.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin İnverted Mikroskop Altındaki Görüntüleri	64
Şekil 4.2 NIH 3T3 Hücrelerinin Kalibrasyon Eğrisi	65
Şekil 4.3 NIH 3T3 Hücrelerinin Üreme Kinetiği	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.4 Mitomisin C Uygulaması Öncesinde NIH 3T3 Hücreleri	67
Şekil 4.5 Mitomisin C Uygulaması Sonrasında NIH 3T3 Hücrelerinin Görünümü	67
Şekil 4.6 İEK' Lerinin Morfolojil Görüntüsü	69
Şekil 4.7 Deri Dokusundan Elde Edilen Keratinosit Kolonilerinin Görüntüleri...	69
Şekil 4.8 İEK Lerin Üreme Kinetiği.....	70
Şekil 4.9 İEK' Lerin (P/2) Mayers Hematoksilen Boyama Görüntüsü.....	71
Şekil 4.10 İEK' Lerin (P/2) DAB (Diaminobenzidin) Boyama Görüntüsü	72
Şekil 4.11 0,4µm Gözenek Çaplı Membran Yapısı Üzerine Keratinositlerin Ekilmesi	73
Şekil 4.12 Tabakalanmış Epidermal Kültür Modelinin H&E Boyaması.....	74
Şekil 4.13 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 20 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonları (5mg/Ml, 10mg/Ml, 25mg/Ml, 50mg/Ml) Sonrasında Model Üzerinde MTT İle Canlılık Ölçüm	76
Şekil 4.14 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 10 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonları (1mg/Ml, 0,5mg/Ml, 0,25mg/Ml, 0,1mg/Ml, 0,01mg/Ml) Sonrasında Model Üzerinde MTT İle Canlılık Ölçüm.....	77
Şekil 4.15 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 15 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonları (1mg/Ml, 0,5mg/Ml, 0,25mg/Ml, 0,1mg/Ml, 0,01mg/Ml) Sonrasında Model Üzerinde MTT İle Canlılık Ölçümü	78
Şekil 4.16 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 10 Ve 15 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonlarının (1mg/Ml, 0,5mg/Ml, 0,25mg/Ml, 0,1mg/Ml, 0,01mg/Ml) MTT Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.17 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 15 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonları (3mg/Ml, 2mg/Ml, 1,5mg/Ml, 1mg/Ml) Sonrasında Model Üzerinde MTT İle Canlılık Ölçümü	79
Şekil 4.18 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 20 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonları (3mg/Ml, 2mg/Ml, 1,5mg/Ml, 1mg/Ml) Sonrasında Model Üzerinde MTT İle Canlılık Ölçümü	80
Şekil 4.19 Epidermal Kültür Modeli Üzerinde 15 Ve 20 Dakika Bekletilen SLS Konsantrasyonlarının (3mg/Ml, 2mg/Ml, 1,5mg/Ml, 1mg/Ml) MTT Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması	80
Şekil 4.20 Örneklerin Değerlendirilmesinde Kullanılan ELISA Kalibrasyon Eğrisi	82
Şekil 4.21 SLS'in İritasyon Potansiyeli Tespit Edilirken IL-1 α Analizinde Kullanılan ELISA Pleytinin Görünümü.....	83
Şekil 4.22 Farklı Sürelerde Ve Konsantrasyonlarda SLS'in IL-1 α Salınım Değerleri.....	84
Şekil 4.23 Farklı Sürelerde Ve Konsantrasyonlarda SLS'in IL-1 α Salınım Değerleri Ve MTT Sonuçları.....	85
Şekil 4.24 Şekil 4.23' Teki Yeşil Halkanın Büyütülmüş Şekli	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Dermal Absorbsiyonu Etkileyen Parametreler	13
Çizelge 2.2 Draize Testi Puanlama Sistemi	21
Çizelge 2.3 GPMT Ve Buehler Test İçin Kullanılan Derecelendirme Skalası	22
Çizelge 2.4 Yama Testi İçin Kullanılan Derecelendirme Skalası	24
Çizelge 2.5 Prick Testi İçin Kullanılan Derecelendirme Skalası	25
Çizelge 2.6 Epidermal Farklılaşmayı Kontrol Eden Faktörler	32
Çizelge 2.7 Epiteliyal Hücre Karakterizasyonunda Sitokeratinler	33
Çizelge 2.8 Ticari Olarak Piyasada Bulunan <i>İn Vitro</i> Deri Yapıları Ve Epidermal Malzemeler	39
Çizelge 4.1 Absorbans Değerlerine Karşılık Gelen NIH 3T3 Hücre Sayıları	65
Çizelge 4.2 Farklı Mitomisin C Konsantrasyonunun NIH3T3 Fibroblastları Üzerine Etkisi	68
Çizelge 4.3 EKM Üzerinde Farklı Sürelerde Bekletilen Triton X-100 Sol. (%1) Sonrası Canlılık Değerleri	75
Çizelge 4.3 İritasyon Parametreleri	75
Çizelge 4.4 Farklı SLS Konsantrasyonlarının EKM Üzerindeki Canlılık Değerleri	81
Çizelge 4.5 Farklı SLS Konsantrasyonlarının EKM' Nde Yol Açtığı IL-1 α Salınım Ölçümü	83

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge 4.6 Farklı SLS Konsantrasyonlarının EKM' Nde Yol Açtığı IL-1 α Salınım Ölçümü	84
Çizelge 4.6 Epiderm Kültür Modeli Üzerinde Uygulanan SLS Konsantrasyonlarının EC ₅₀ Değerleri.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrad derece
h	Saat
dk	Dakika
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
ELISA	Enzim ilintili immün test
FCS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GMP	İyi üretim uygulamaları
HEPES	[N-2-hidroksietilpiperazin-N]etansülfonik asit
Max	En yüksek
Min	En düşük
ml	mililitre
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyon
KSFM	Serum içermeyen Keratinosit ortamı
rpm	Bir dakikadaki dönüş sayısı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

EKM	Epidermal Kùltür Modeli
İEK	İnsan Epidermal Kertinositleri
IL-1 α	İnterlòkin 1 alfa

1. GİRİŞ

Ciltle temas halinde bulunan kozmetik materyallerin, kişisel bakım (şampuan, sabunlar, diş macunları, vb.) ve temizlik ürünlerinin içerdikleri kimyasal maddelerin cilt irritasyon potansiyelinin ve korozivitesinin test edilerek belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan pek çok *in vivo* yöntem bulunmaktadır. Bu *in vivo* yöntemlerin çoğunda deney hayvanı kullanılmaktadır.

Draize testi, deney hayvanı kullanılarak yapılan kozmetik toksisite testlerinin başında gelmektedir (Draize et al., 1944). 1965’ te Buehler, daha yüksek hassasiyete sahip ‘topikal kapalı yama tekniğini önermiştir. 1969 yılında Magnusson ve Kligman ‘kobay maksimizasyon testini’ geliştirmiştir. 1980’ den beri birçok alternatif test metodu geliştirilmiştir. Bu testlerin (NPPET; *non-perfused pig ear test*), (SIFT; fare derisi bütünlük fonksiyon testi), (TER; transkutanöz elektriksel direnç testi) bir kısmı hala kullanılmakta ve ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods; Avrupa Alternatif Yöntemlerin Onaylanması Merkezi*) tarafından validasyon prosesi içerisine sokulmamaktadır (Kidd et al., 2007).

Avrupa Birliği Kozmetik Yönetmeliği (*The 7th Amendment to the Cosmetics Directive - Council Directive 2003/15/EC*) doğrultusunda kozmetiklerde, yeni kozmetik ürünlerde ve katkılarında hayvan deneylerinin sona erdirilmesi ile (öneri olarak 2013 yılında) Avrupa Birliği pazarlarında hayvan deneyleri uygulanmış bu tür ürünlerin satışına yasaklar getirilmesini ön görmektedir. Bu yönerge çerçevesinde söz konusu madde ve ürünlerin insan sağlığına etkilerinin belirlenebilmesi için gerekli, yeni ve alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesi sürecinde ortaya çıkabilecek teknik sorunlar ve gecikmeler dikkate alınarak, önerilen tarihlerde değişiklikler olabileceği de vurgulanmıştır. Söz konusu karar, diğer taraftan da, halen ECVAM tarafından kabul edilmiş olup Avrupa Birliği pazarlarına uyarlanmış olan alternatif test yöntemlerinin bulunduğu konularda ise hemen yasaklamaların getirilmesini gerektirmektedir. Aynı zamanda kozmetik ham ve katkı maddeleri Avrupa Birliği Kimyasal Maddeler Yönetmeliği [*Directive 67/548/EC and Regulation (EC) No 1907/2006*] kapsamında da yer aldıklarından Kozmetik Yönetmeliği doğrudan

kimyasal maddelerin kontrolü ile de ilişkilendirilmektedir. İlgili Avrupa Birliği kimyasal maddeler kontrol politikaları 30.000 kadar kimyasalın, insan sağlığı açısından tekrar test edilmesini öngörmektedir. Eğer uygun alternatif test yöntemleri geliştirilemezse, REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances; Kimyasal maddelerin Değerlendirilmesi, Kaydının oluşturulması, Sınırlandırılması ve İzinleri*) düzenlemeleri kapsamında, büyük miktarlarda hayvanın telef edilmesi söz konusu olacaktır. Bu yüzden yönetmelikte geleneksel hayvan deneylerine alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesinin öncelikli bir çalışma alanı olduğu vurgulanmaktadır (Hoffmann et al., 2005; Spiekstra et al., 2009).

Kozmetik materyallerin toksisitesinin tespitinde hayvan testlerine alternatif metotlar oluşturulmasının kontrolünde görev alan uluslar arası otoritelerin başında Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (*Organization for Economic Co-operation and Development, OECD*), Avrupa Alternatif Yöntemlerin Onaylanması Merkezi (*European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM*) ve Avrupa Kozmetik, Tuvalet Malzemesi ve Parfümeri Birliği (*The European Cosmetic, Toiletry & Perfumery Association, COLIPA*) gelmektedir.

İnsan derisinde kimyasalların yarattığı tahriş potansiyelinin belirlenmesinde, deney hayvanı kullanmaksızın, ECVAM tarafından onaylanmış EpiDerm™ (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), EPISKIN™ (Episkin, Chaponost, France), SkinEthic RHE™ (SkinEthic Laboratories, Nice, France) gibi in vitro test yöntemleri bulunmaktadır (D.A. Kidd, 2007). Bunlar hayvan testlerine alternatif olabilecek ve özellikle etik kurallara uygun oldukları için kabul edilen testlerdir ve hücre kültür yöntemleri ile laboratuvar koşullarında keratinositler kullanılarak insan epidermal kültür modelleri oluşturulması temeline dayanmaktadır (ECVAM, 2008).

Memeli canlıların en geniş organı olan deri, insan vücudu ile onun etrafında bulunan çevre arasında koruyucu bariyer niteliğindedir. Vücudun içindeki organları ve vücudu her türlü patojen ve mikroorganizmadan korumaktadır. Zararlı mikrobiyal, termal, mekanik ve kimyasal etkilere doğrudan maruz

kalmaktadır. Geçtiğimiz 25 yıl boyunca insan derisini taklit edebilecek bir yapının oluşturulması amacıyla çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (MacNeil, 2007). Bu yapılar klinik uygulamalarda kullanılmak, akut ve kronik yara iyileşmelerini desteklemek veya farmasötik uygulamalarda kullanılmak üzere insan temelli organ benzeri test sistemleri oluşturmak amacıyla geliştirilmektedir. Bu süreçte deri modelleri oluşturulurken ileri doku mühendisliği yaklaşımları kullanılmaktadır (Ponec, 2002; Groeber et al., 2011). Deri doku mühendisliğinde fonksiyonel doku modelleri oluşturulurken çeşitli biyolojik ve sentetik materyaller *in vitro* kültüre edilmiş hücreler ile biraraya getirilmektedir (Vacanti, 1995).

In vitro şartlarda yapılandırılmış çeşitli insan deri modellerinin çoğu, normal insan derisi ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Keratinositler kültürde yaklaşık 2 hafta hava-sıvı ara yüzeyinde kültüre edilerek epidermal farklılaşma tetiklenmektedir. Bu modeller oluşturulurken keratinositlerin alt kısmında hücre içermeyen dermal matrisler, geçirgen filtreler, fibroblast tutundurulmuş kollajen matrisler ve kollajen- GAG membranlar gibi çeşitli yapılar kullanılmaktadır (Boyce et al., 1988; Bell et al., 1981; El Ghalbzouri et al., 2008).

Bu tez projesinde, kozmetik maddelerin cilt üzerinde meydana getirdiği irritasyonun potansiyelini belirlemek amacıyla insan keratinositleri kullanılarak yapay epidermal bir model oluşturulması amaçlanmıştır. Kimyasal madde topik olarak oluşturulan model üzerine uygulanmış ve sonrasında oluşan reaksiyonun potansiyeli, hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ve inflamatuvar sitokinlerin salımı ölçülerek belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Derinin Yapısı ve Fonksiyonları

Deri hacim ve ağırlık bakımından vücudumuzdaki organların en büyüğüdür. Vücut ısısının korunmasında, D vitamin sentezlenmesinde, duyu algılanmasında, ter bezleri yardımıyla boşaltımda, dışarıdan gelen kimyasal maddelere ve mikroorganizmalara karşı ilk bariyerin oluşturulmasında görev almaktadır. Deri başlıca epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan tabaka) olmak üzere üç tabakadan oluşmuştur (Ponec, 2002; Gawkrödger, 2002; Alenius et al., 2008).

2.1.1 Hipodermis

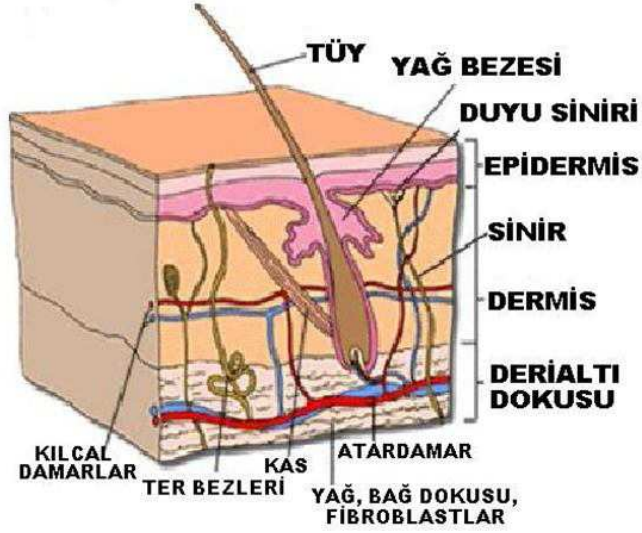
Bu tabaka damar ve sinir yönünden çok zengindir ve tüm vücutta ve deride ısı düzenlenmesinden sorumludur (Tuncer , 2006).

2.1.2 Dermis

Epidermin altında bulunan, derinin kıvam ve elastikiyetini sağlayan tabakadır. Esas yapıyı jelatinöz bir madde oluşturur. Bu madde fibroblastlar tarafından salgılanır. Hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat ve diğer mukopolisakkaritlerden meydana gelir, çok yüksek oranda su tutma kapasitesine sahiptir. Bu yapı içerisinde kollajen, elastik, retiküler lifler ve farklı hücreler dağılım gösterir. Vücudun yapısal proteini kollajendir. Kollajen çoğunlukla tendonlarda, ligamentlerde ve dermisde bulunmaktadır. Derinin kuru ağırlığının %70'i kollajenden oluşmaktadır (Eroschenko, 2008).

Dermiste kan ve lenf damarları, yağ ve ter bezleri, kıl follikülleri, deri kasları ve çeşitli duyu alan sinirler bulunur. Dermis ile epidermis birbirleriyle girintili çıkıntılı bir şekilde birleşmiştir. Epidermis dermis içerisine el parmağı şeklinde girerken, dermis de epidermise aynı görünümde ilerler (papilla). Bu iki tabakanın birleşim yerinde bazal membran denilen bir bölge mevcuttur. Bu yapı epidermin beslenmesini ve iki tabakanın birbirine sıkı bir şekilde tutunmasını sağlamaktadır(Eroschenko, 2008).

Dermis papiller ve retiküler kat olmak üzere iki tabakadan oluşmuştur. Papiller tabakada kapiller damarlar ve duyu alan sinir lifleri bulunur. Bu katta konnektif lifler deri yüzeyine dik olarak yerleşmiştir. Retiküler kat dermisin alt kısmına verilen isimdir. Bu bölgede konnektif lifler deri yüzeyine paralel görünüm sergilemektedir.

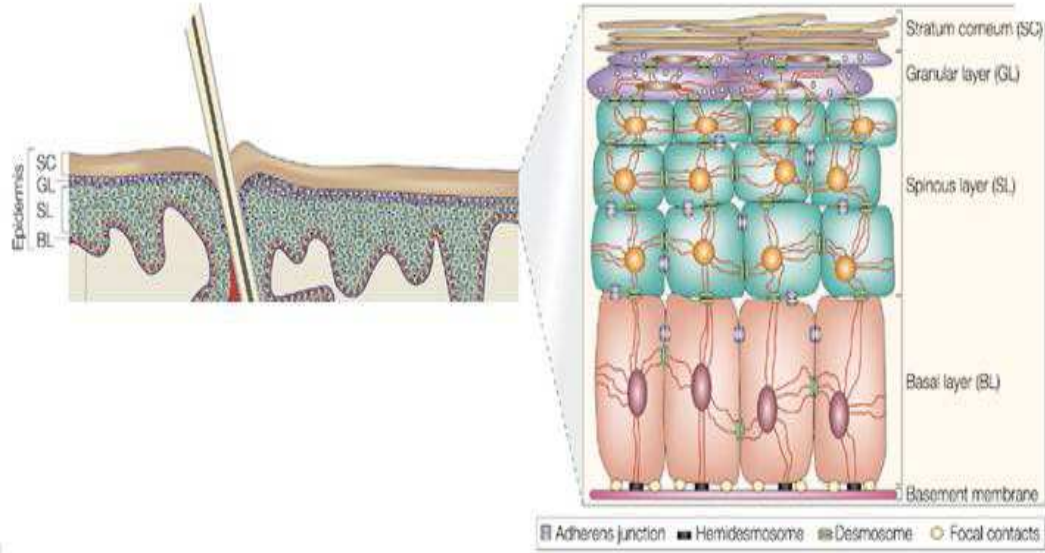


Şekil 2.1 Derinin yapısı (<http://www.bilimvesaglik.com/duyu-organlari>)

2.1.3 Epidermis

Epiderminin çok katlı yassı epitel tabakasında dört ayrı hücre tipi bulunmaktadır. Hakim hücre tipi keratinositlerdir. Bu hücreler, başlıca ürünleri olan ara filaman proteini keratin nedeniyle bu ismi almıştır. Melanositler, melanin üretiminden sorumlu nöral kista kökenli hücrelerdir. Langerhans hücreleri, kemik iliği kökenli dendritik hücrelerdir. T lenfositlere antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar. Merkel hücreleri, dokunma duyusunda rol alan nöral kista kökenli hücrelerdir (Kierszenbaum., 2006).

Epidermis, derinin en üst tabakası olup aşağıdan yukarıya doğru bazal tabaka (*stratum bazale*), spinozum tabakası (*stratum spinozum*), granüler tabaka (*stratum granülozum*), lüsidum tabakası (*stratum lucidum*) ve korneum tabakası (*stratum korneum*) adını alan beş katmandan meydana gelmektedir.



Şekil 2.2 Epiderminin tabakaları (Funchs and Raghavan., 2002)

2.1.3.1 Bazal Tabaka (*Stratum Bazale*)

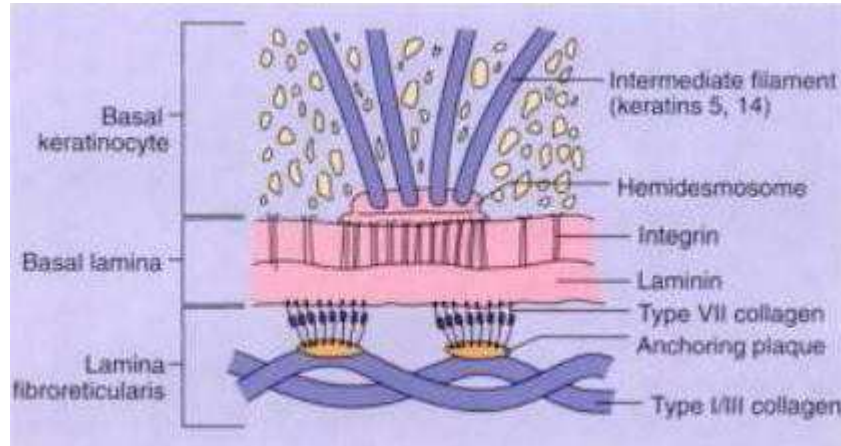
Epiderminin en alt tabakası olup “doğurucu tabaka” olarak da adlandırılmaktadır. Tek sıra halindeki silindirik hücrelerden meydana gelmiştir. Bu tabakada üç tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; keratinositler, melanositler ve Merkel hücreleri’ dir. Bu tabakadaki tüm hücreler, yukarı doğru göçle birlikte sayıları gittikçe artan oranda ara keratin filamanları içerirler.

Keratinositler derinin bir nevi “kök hücreleri” olarak kabul edilmektedir. Çoğalarak ve değişikliğe (farklılaşarak) uğrayarak üst tabakaları oluşturmaktadırlar. Esas görevleri keratin denen fibriller proteinleri sentezlemektir. Bazal hücreler hemidesmozomlarla bazal membrana, desmozomlarla diğer keratinositlere bağlanmaktadır. Epidermal hücrelerin %90-

95'i keratinositlerden oluşmaktadır. Keratinositler, sitokin ve inflamatuvar mediatörleri salgılayarak immün cevap gelişiminde de rol almaktadır.

Melanositler, melanin pigmentini sentezlemekle görevlidirler ve keratinositler arasında yerleşmişlerdir. Bu hücrelerin dendritik uzantıları vardır. Bu uzantılar vasıtasıyla hücrede sentez edilen melanin, melanozom denen melanin paketleri halinde keratinositlerin üst bölümlerine taşınır. Bir melanosit 30-40 keratinositi melanize eder, bu sisteme epidermal melanin ünitesi denir(Kierszenbaum., 2006).

Merkel hücreleri, nöroendokrin ve duyuşal fonksiyonlu hücreler olup bazal tabakada yer almakta ve epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %1'ini oluşturmaktadırlar.



Şekil 2.3 Dermo- epidermal bağlantı bölgesinde bazal epidermisin görünümü (Gawkrodger, 2002).

2.1.3.2 Spinozum Tabakası (*Stratum Spinozum*)

Hücreler, epidermis içinde yukarı doğru göç ederken, ikinci bir hücre tabakasını (dikenli tabaka) oluştururlar. Bazal tabakanın üstünde yer alan 5-7 sıra, çok köşeli (poligonal) hücreler topluluğundan oluşur. Rutin histolojik incelemelerde, bu tabakadaki hücreler büzüşürler. Sonuç olarak, hücreler arasında

oluşan boşluklar, hücre yüzeyinden çıkan çok sayıda sitoplazmik uzantılar ve dikensi çıkıntılar (dezmozom) oluştururlar. Bu uzantılar, dezmozomların keratin filaman demetleri veya tonofilamanlar ile komşu hücrelere bağlandığı yerlere karşılık gelir. Tonofilamanlar, epidermisin aşınmalara karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Bu tabakanın üst kısımlarında keratinin ön maddesi olan filagrin içeren keratohiyalin granülleri ve lipid içeren Odland cisimcikleri görülür. Hücreler arasında lenf sıvısına benzer intersellüler bir sıvı bulunur (Eroschenko, 2008).

Bu tabakada immünolojik fonksiyona ve antijen sunma yeteneğine sahip Langerhans hücreleride yer almaktadır ve epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %3-5'ini oluştururlar.

2.1.3.3 Granüler Tabaka (*Stratum Granülozum*)

Bu tabaka 3 - 5 sıra halinde dizilmiş yassı hücrelerden oluşmaktadır. Hücrelerin çekirdekleri kısmen atrofiktir ve sitoplazmalarında keratohiyalin granülleri mevcuttur. Mukozalarda bu tabaka görülmez. Lökoplazi gibi keratinizasyonun arttığı durumlarda *stratum korneum* ile birlikte bulunmaktadır.

Bu hücrelerin sitoplazmalarında ayrıca, çift yapılı lipid zarla çevrili lamelli granüller de bulunur. Lamelli granüllerin içerikleri, *stratum granülozum* da hücrelerarası boşluğa bırakılır ve burada yapıştırıcı özelliğin yanı sıra lipid bir bariyer oluştururlar.

2.1.3.4 Lusidum Tabakası (*Stratum Lucidum*)

Yalnız el içi ve ayak tabanında görülen bir tabakadır. Normal tabakalardan daha açık renkte görülür. Bu tabakadaki hücreler iğ şeklinde yassılaşmış atrofik çekirdeğe sahip hücrelerdir. Sitoplazmalarında eleidin bulunmaktadır.

2.1.3.5 Korneum Tabakası (*Stratum Korneum*)

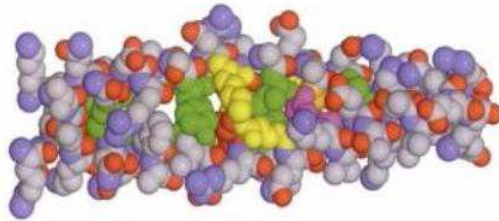
Derinin en üst kısmıdır. Çekirdeksiz lameller halindeki hücrelerden meydana gelir. Hücreler bol miktarda keratin içerir ve hücreler arası bağlar gevşek olduğundan dolayı dökülme özelliğine sahiptir.

Bazal tabakadaki keratinositler mitotik aktiviteye ve farklılaşma özelliğine sahiptir. Bazal tabakadan üreyen keratinositlerin *stratum korneum* tabakasını oluşturup dökülmesi sayesinde deri devamlı yenilenme özelliği kazanmaktadır. Bazal tabakada mitoz sonrası oluşan bir keratinosit yaklaşık 14 günde korneuma ulaşır ve 14 günde de deskuame olur. Bu sürece derinin yenilenme zamanı denir.

2.2 Derinin Biyokimyasal Özellikleri

Keratin, melanin, kollajen ve glikozaminoglikan deri tarafından sentezlenen moleküllerin başında gelmektedir.

Keratin: Keratinositler tarafından oluşturulan yüksek moleküler ağırlığa sahip polipeptit zincirlerdir. Keratin, *stratum korneumu*, kıl ve tırnakları oluşumunda temel bir bileşendir. Farklılaşma prosesinin çeşitli aşamalarında bulunan epiderminin farklı tabakalarında farklı moleküler ağırlığa sahip keratin polipeptitler bulunmaktadır. Epidermal keratin saç keratini ile karşılaştırıldığında az miktarda kysitin ve yüksek oranda glisin içermektedir(Gawkrödger, 2002).



Şekil 2.4 Keratinin moleküler yapısı (Gawkrödger, 2002)

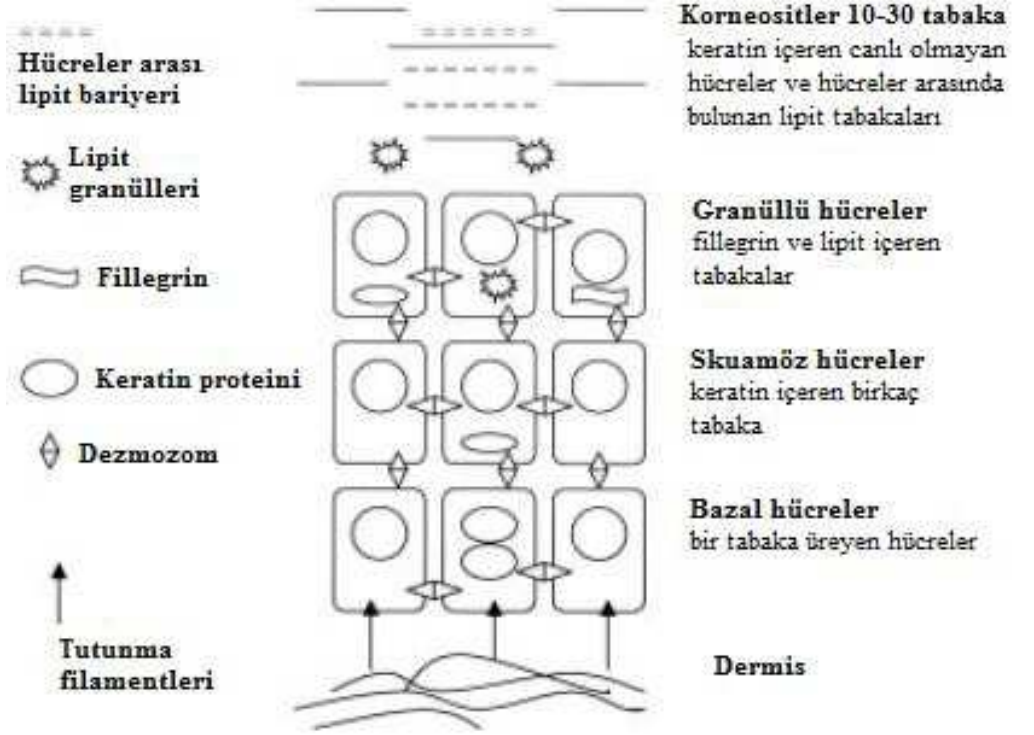
Melanin: Melanositler içinde bulunan tirozinler tarafından meydana gelir. Ömelanin ve fakomelanin olmak üzere 2 farklı formu bulunmaktadır. Ömelanin, en çok bulunan melanin formu olup kahverengi-siyah renk oluşturmaktadır. Fakomelanin, daha az bulunan bir melanin formu olup sarı ve kırmızı renk oluşumundan sorumludur. En doğal melaninlerde her 2 form birarada bulunmaktadır. Melaninler enerji ve UV ışınlarının absorpsiyonundan da sorumludur.

Kollajen: Fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Kollajen, dermisin kuru ağırlığının %70-80'ini oluşturan temel yapısal proteindir. Yapısında bulunan aminoasitlerin başlıcaları glisin, prolin ve hidroksiprolindir. Doğada 14' ün üzerinde kollajen tipi bulunmaktadır. Bunlardan sadece 5 tanesi deride bulunmaktadır. Tip I; retiküler dermiste, Tip III; papiller dermiste, Tip IV ve VII; bazal membran yapısında, Tip VIII; endotelial hücrelerde bulunmaktadır.

Glikozaminoglikan (GAG): Derinin viskozitesini ve hidrasyonunu sağlayan, deri yapısının esas bileşenidir. Kondroitin sülfat, beraberindeki dermatan sülfat ve hyaluronan ile dermiste bulunan temel GAG' ı oluşturmaktadır (Gawkrödger, 2002).

2.3 Epidermal Bariyer

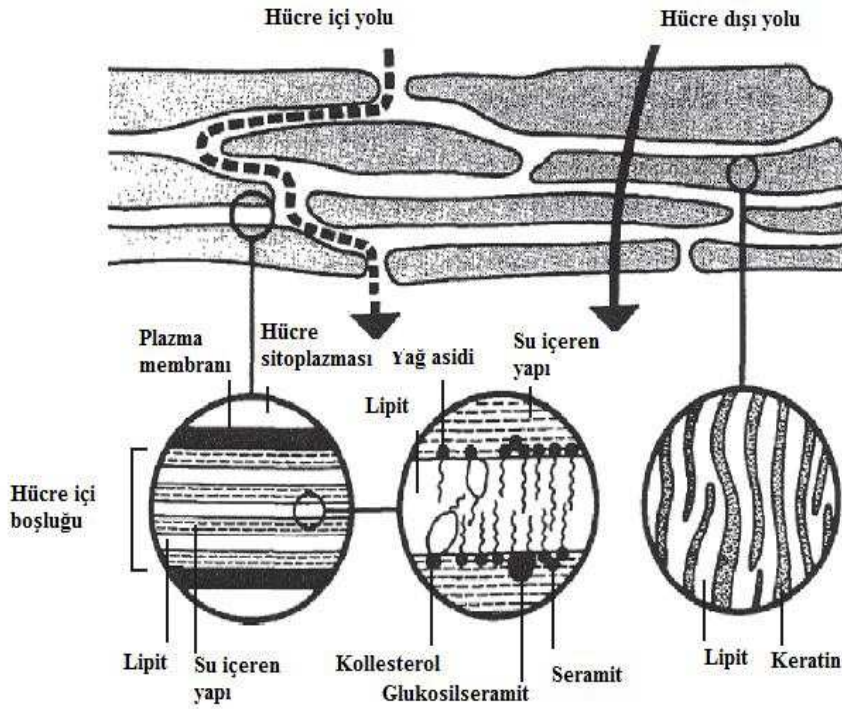
Deri emilimi kompleks bir fenomendir. *Stratum korneum'* un en önemli fonksiyonu epidermal geçirgenlik bariyerini oluşturmaktır. Böylelikle su, elektrolit geçişini ve topikal uygulanan ilaçların perkutanöz absorpsiyonunu kontrol etmektedir. 10 – 20 µm kalınlığındaki *stratum korneum* da bulunan korneositler arasındaki lipid lamelleri geçirgenlik bariyerini oluşturmaktadır (Ponac, 2002). *Stratum korneum* un hücreler arası boşluklarında bulunan hidrofobik lipidlerin % 45 – 50' si seramid, % 25'i kolesterol, % 15'i uzun zincirli serbest yağ asitleri ve % 5'i diğer lipidlerdir (WHO, 2002; Jennemann et al., 2007).



Şekil 2.5 Epidermisin bariyer fonksiyonu(Simonsen, 2002)

Kimyasalların, deri içerisinden geçmesi kompleks bir prosestir. Cilt absorpsyonu üç ana mekanizma ile gerçekleşmektedir.

- Hücre içi absorpsyon: Kimyasallar, keratin kaplı korneositler içerisinden hücre membranının içinde ve dışında parçalanarak geçerler.
- Hücreler arası absorpsyon: Kimyasallar, korneositlerin etrafından lipidçe zengin ekstraselüler bölgelerden geçerler.
- Ara yollardan absorpsiyon: Kimyasallar, kıl folikülleri ve ter bezleri tarafından oluşturulan yan yolları kullanarak korneositleri geçerler (M.Ponec,2002).



Şekil 2.6 *St. Korneum* membranı, diffüzyonda izlenen yollar (Bronaugh and Maibach, 1991)

In vivo cilt irritasyon reaksiyonunun konsantrasyonu, *stratum korneumun* bariyer kapasitesi ile yakından ilişkilidir. Bu bakımdan uygun bir *in vitro* deri modeli oluşturulurken derinin bariyer fonksiyonu taklit edilmelidir (Ponac, 2002).

2.3.1 Perkutanöz (Dermal) Absorbsiyon

Dermal absorpsiyon, kimyasalların dış ortamdan gelerek deri içerisine nüfuz edip sistemik dolaşıma katılması olarak tanımlanmaktadır (OECD, 2004).

Epidermin *stratum korneum* bölgesi, yarı geçirgen bir membran yapısı sergileyerek perkutanöz absorpsiyonu belirleyen en önemli bariyerdir (Brisson, 1974). *St. korneumun* çoğunlukla su geçirmez yapısına rağmen günlük ortalama 400 ml kadar su, içerisinden geçerek buharlaşmaktadır. Hareketsiz bir kişi günde ek olarak 200 ml suyu ter olarak kaybetmektedir. Ter; suyun, az miktarda tuzun, karbondioksitin, amonyak ve ürenin salgılanmasında taşıyıcı rol oynamaktadır.

Suda çözünür maddelerin deriden absorpsiyonu ihmal edilecek oranda azdır. Fakat yağda çözünen maddeler kolaylıkla deri içerisine nüfuz edebilmektedir. Bunlar yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K), bazı druglar, oksijen ve karbondioksit gazlarıdır. Kurşun gibi ağır metallerin tuzları, civa, arsenik ve zehirlerin toksinleri gibi deri içerisine absorbe olan toksik maddeler, aseton gibi organik solventler ve karbontetraklorit (kuru temizleme sıvısı) içermektedirler. Kortizon gibi topikal steroidler, yağda çözündükleri için derminin papiller bölgesine kolayca ulaşabilmektedirler. Burada anti- enflamatuar özelliklerini göstererek mast hücrelerinin histamin üretimini inhibe ederler. Dermal absorpsiyonu etkileyen önemli parametreler bulunmaktadır (WHO, 2002; Yourick, 2008).

Çizelge 2.1 Dermal absorpsiyonu etkileyen parametreler(WHO 2002; Brisson,1974)

SİSTEM İÇERİKLERİ	FAKTÖRLER
Kimyasal madde	Moleküler boyut İyonizasyon Lokal deri etkileri Fiziksel hal
Deri	Tür Sıcaklık Stratum korneumun hidrasyonu Stratum korneumdaki hasar Metabolizma Hastalıklı deri Anatomik bölge Deskuamasyon Kan ve lenf akışı
Taşıyıcı	Çözünürlük Kararsızlık hali, uçuculuk pH Yardımcı madde

Uygulama dozu	Konsantrasyon Taşıyıcı ile etkileşimde olan toplam deri alanı Maruz kalınma süresi Sınırlı ve sınırsız doz
---	--

2.4 Kozmetik Maddelerin Ciltte Yarattığı Reaksiyonlar

Deri üzerine uygulanan çeşitli drug ve kimyasal maddelerin klinik etkileri, epidermis içerisine penetre olabilen miktar ve konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Bu ürünlerin içerdikleri bileşikler deride irritasyon, korezyon, hassasiyet, fototoksisite, kontakt allerjikdermatit gibi lokal reaksiyonlara sebep olmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda immün ve allerjik yanıtlar oluşmaktadır (Brisson, 1974; Alenius et al., 2008).

Cilt reaksiyonuna yol açan kozmetik maddelerin başında; banyo sabunları, deodorantlar, göz makyaj malzemeleri, nemlendiriciler, kalıcı dalga oluşturan losyonlar (özellikle gliseril monotioglikolat içerenler), şampuanlar, ojeler (formaldehit içeren) ve rujlar gelmektedir. P- fenilindiamin ve amonyum persülfat gibi renk açıcı madde içeren saç boyları da ciltte çeşitli reaksiyonlara sebep olmaktadır. Alfa- hidroksi asit (AHAs) içeren kozmetik ürünler bazı kişilerde problemlere yol açmaktadır. FDA tarafından yayınlanan raporda, %10' luk konsantrasyonun üzerinde AHAs içeren ürünlerin kullanımı sonrasında ciltte kızarıklık, şişlik, yanma ve kaşıntı gibi etkilerin gözlemlendiği belirtilmektedir. Bazı kişilerde ise retin-A kırışıklık krem ve serumları, irritan kontakt dermatitlere yol açmaktadır.

Kozmetik endüstrisi tarafından binlerce kimyasal içerik olarak kullanılmaktadır. Bunlar saf birleşikler, karışımlar, bitki ekstraktları, yağlar, surfaktanlar (yüzey aktif maddeleri), prezervatifler ve polimerlerdir.

Kozmetik maddelerin içeriğinde en sık rastlanan surfaktanların başında sodyum lauril sulfat (SLS) gelmektedir. SLS, birçok hijyen ve temizlik

ürünlerinde kullanılan anyonik bir yüzey aktif maddesidir. Tuzu, sülfat grubuna bağlı 12 karbon içeren bir anyonik organosülfat içermektedir. Bu da maddeye deterjanlar için gerekli olan amfifilik özellikleri kazandırmaktadır. SLS, çok güçlü bir surfaktan olup deterjan endüstrisinde yağ lekelerinin çıkarılmak amacıyla kullanılmaktadır. Endüstriyel ürünlerde yüksek konsantrasyonda bulunmakla birlikte diş macunlarında, sabun ve şampuanlarda daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Aynı zaman da köpük oluşumunu sağlamaktadır. Araştırmalar SLS'in direkt cilde uygulanmasında karsinojenik etki gösterdiği yönündedir (NICNAS, 2007). Cilt İritasyon potansiyeli belirlenmiş SLS, cilt iritasyon mekanizmasının anlaşılması ve iritasyon belirteçlerinin tanımlanması amacıyla çeşitli çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Özellikle *in vitro* epidermal kültür modelleri oluşturulurken ve parametreleri belirlenirken tercih edilmektedir (Fletcher et al., 2006; 2001)

Tüm bu kozmetik içerikleri güvenlik testlerinden geçirilmelerine ramen bazı tüketicilerde reaksiyonlar meydana gelmektedir. En sık rastlanan reaksiyonların başında kontakt iritasyon daha seyrek olarak da kontakt alerjik reaksiyonlar görülmektedir. Testler sonucu güvenli bulunan maddeler farklı formülasyonlarda, deri içerisine daha fazla emilim gösterdiği için ciltte irritasyona sebep olabilir. (Draelos, 2010).

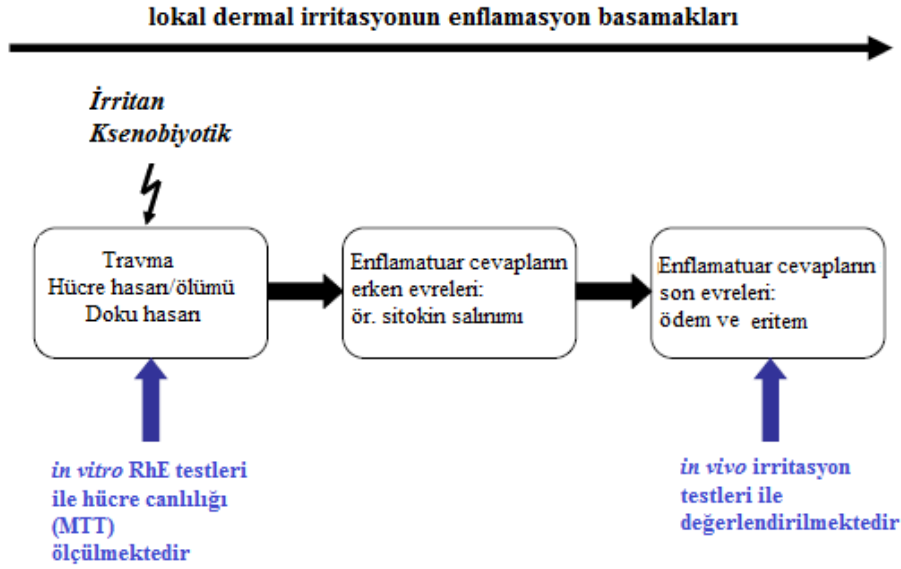
2.4.1 İritasyon

Cilt iritasyonu:

Cilt iritasyonu; kimyasal maddenin 4 saatten fazla uygulanması sonucu geri dönüşümlü hasarın ciltte meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır (OECD, 1987).

Topikal bir formülasyon deri üzerine tatbik edildiğinde aktif bileşenin (drug) *st. korneum*' dan nüfuz ederek canlı dokuya geçmesi gerekmektedir. Deride bulunan protein ve lipidlerin yüzey aktif ajanları ile reaksiyona girmesi sonucu iritasyon oluşmaktadır. İritan kimyasal öncelikle *st. korneumun* bariyer

fonksiyonunu hasara uğratmakta ve sonrasında deri içerisindeki hücelere etki etmektedir (Welss et al., 2004).



Şekil 2.7 Dermal irritasyon mekanizmaları ve ölçümü (OECD, 2002)

Genel olarak kimyasal maddenin tavşan derisi veya gözüne uygulanması sonrasında oluşan ödem ve eritema Draize puanlamasına göre değerlendirilerek irritasyonun potansiyeli belirlenmektedir (OECD TG 404, 2002; Welss T. et al., 2004). Günümüzde irritasyonun tespitinde kullanılmak üzere *in vitro* epidermal kültür modelleri oluşturulmaktadır (Robinson et al., 1999).

Cilt korrozyonu:

Cilt korrozyonu; kimyasal maddenin 4 saatten fazla uygulanması sonucu dermise kadar ulaşan nekroz görünümlü geri dönüşümsüz dermal hasar olarak tanımlanmaktadır (OECD, 2002). Korroziv reaksiyonlar sonucu kanama ve ülser oluşabilmektedir.

Göz irritasyonu:

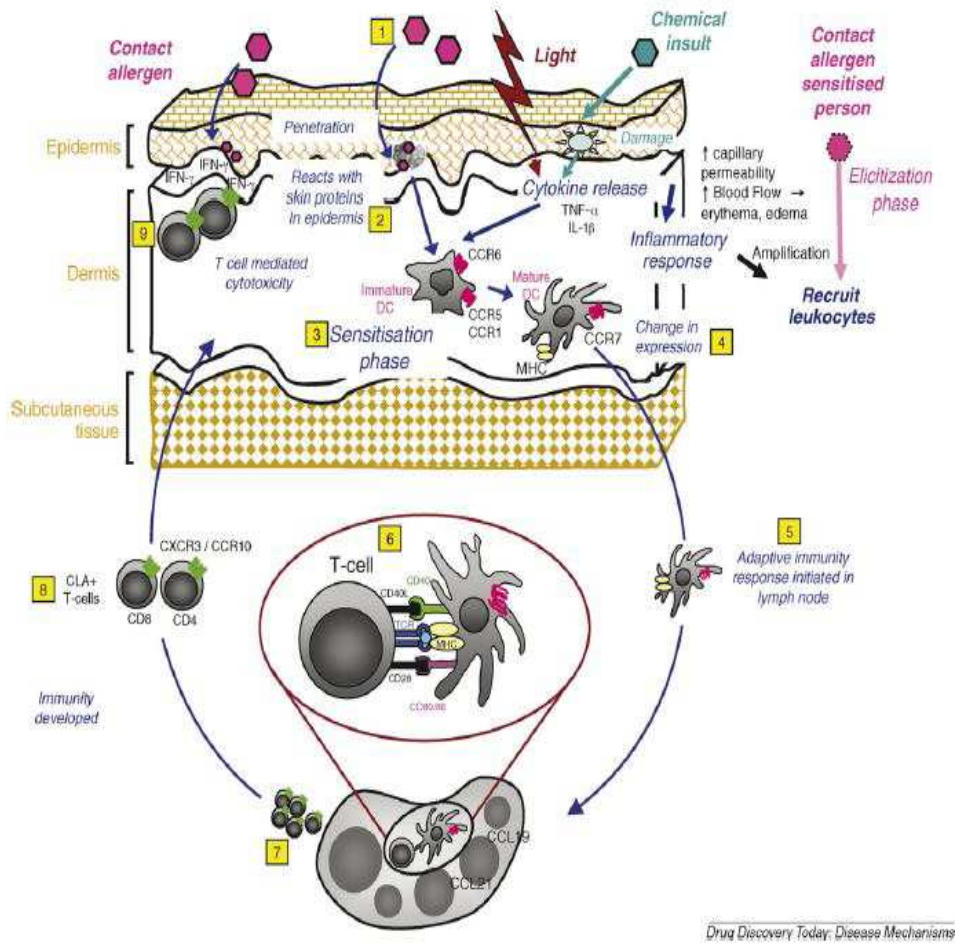
Kimyasal maddenin gözün ön kısmına uygulanması sonrasında 21 gün içerisinde gözde oluşan geri dönüşümlü hasar olarak tanımlanmaktadır (OECD, 2002).

2.4.2 Cilt Hassasiyeti

Cilt hassasiyeti sonucu oluşan allerjik kontak dermatit olaylarına, insanlarda çok sık rastlanmaktadır (Gerberick, 2007). Allerji, spesifik immün cevapların uyarılmaları sonucu oluşan advers bir reaksiyondur.

Allerjik kontakt dermatit (AKD):

AKD, allerjen kimyasal maddelerin deri içerisine nüfuz etmesi sonucu oluşan immün bir cevaptır. Enflamasyonun başladığı hassasiyet fazı ve lökositlerin görev aldığı açığa çıkma fazı olmak üzere 2 faz şeklinde gerçekleşmektedir. Deri içerisine giren kontakt allerjen, taşıyıcı protein kompleksleri ile etkileşime geçmektedir. Bu taşıyıcı protein kompleksleri, antijen salımından da sorumlu olan olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından salgılanmaktadır. Bu taşıyıcı proteinler kimyasal madde ile birleştiğinde antikorların oluşumunu uyaran tam olmayan antijen niteliği kazanmaktadır. Taşıyıcı proteinler yalnız başına immün yanıt oluşturmaz, ancak oluşmuş immün yanıtla reaksiyona girebilir ya da bir protein molekülü ile birleştiğinde antijen özelliği kazanabilirler. Kimyasalın hassasiyet oluşturma sonrasında lökositler devreye girer ve hassasiyetin olduğu bölgede ısı, ödem, kaşınma ve vezikül oluşumu meydana gelir (Alenius et al., 2008; Draeos, 2010).



Şekil 2.8 Akut kontakt dermatit'te hassasiyet (1-7) oluşumu ve açığa çıkma fazlarının modeli. Moleküller epidermise penetre olup (1) ve deri içerisindeki taşıyıcı protein molekülleri ile etkileşime geçmektedir(2). Olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından taşıyıcı protein kompleksleri salınır (3). Kontakt allerjenler irritasyon oluşumunu tetikler. İritasyon oluşumu dendritik hücrelerin olgunlaşması için gerekli proenflamatuar sitokinlerin salınımını uyarır. Olgunlaşma sürecinde(4), enflamatuar kemokin reseptörlerinin ekspresyonu azalmakta, MHC moleküllerin ve kemokin reseptör 7(CCR7) nin ekspresyonu artmaktadır (5). Lenf nodunda immün cevabın kabulü gerçekleşir. Burada MHC moleküllerine bağlı antijen T- hücrelerine işlenmektedir (6). T – hücreleri, antijene özgü T – hücrelerine dönüşüp çoğalması için birtakım sinyallere (CD28-CD80/86 ve CD40-CD40L etkileşimi gibi) ihtiyaç duymaktadır (7). İkinci kez aynı molekül ile karşılaşılması (CD4+ veya CD8+ CLA bağlantılı T-hücreleri)ile allerjen bulunan bölgede allerjene özgü T-hücreleri göreve başlar(8). AKD te olduğu gibi moleküle özgü T-hücreleri IFN- γ salgılamakta ve T-hücre aracılı sitotoksikite enflamasyonla sonuçlanmaktadır(9) (Alenius et al., 2008) .

Akut Dermal Toksisite:

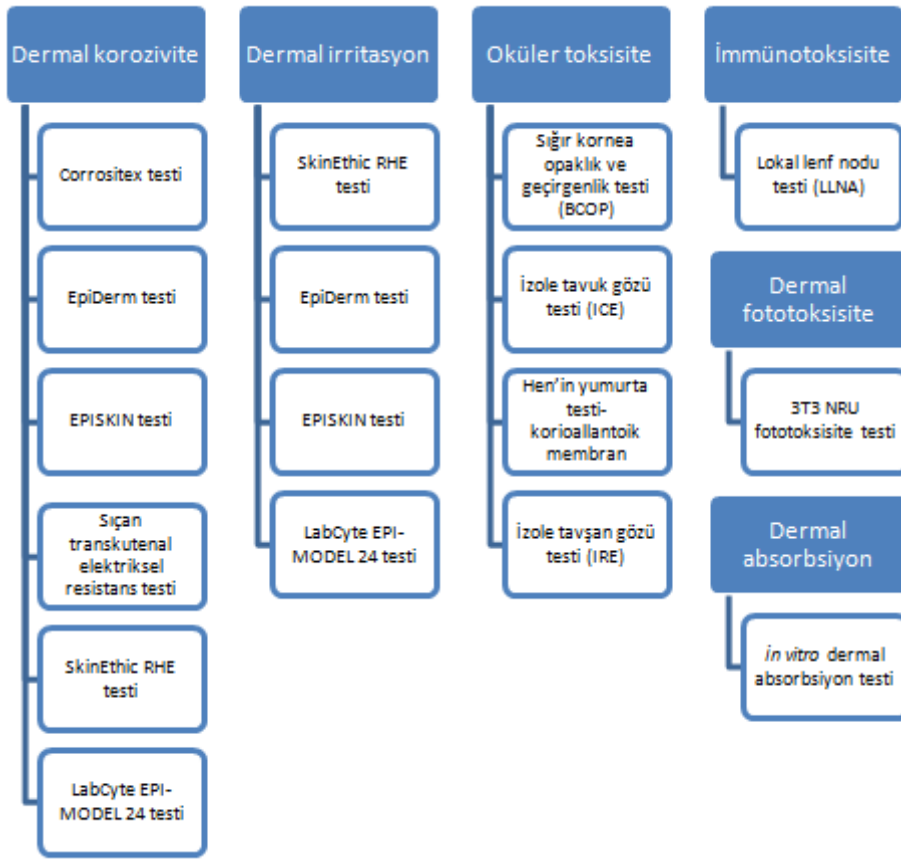
Kimyasal maddenin kısa süreli deri üzerine tek doz uygulanması sonucu oluşan olumsuz etkidir (OECD, 1987).

2.5 Kozmetik Maddelerin Toksisite Testleri

Ürün güvenlik testleri ve risk/yarar analizleri, kozmetik ürünlerin etkinliklerinin ortaya konması ve cilt üzerinde ters bir etkiye (cilt irritasyonu, göz irritasyonu, cilt hassasiyeti, fototoksisite vb.) sahip ürünlerin tanımlanması amacıyla yapılmaktadır. Her türlü kimyasal maddenin kozmetik ürün oluşumunda kullanılabilmesi için tehlike analizlerinin yapılması ve insan sağlığına olan etkilerinin ortaya konması gerekmektedir (Berthaud et al., 2011). Geçmişte ve hala bazı resmi kurumlarda bu tip testlerin yapılması amacıyla deney hayvanı kullanılmaktadır.

Draize testi, deney hayvanı kullanılarak yapılan kozmetik toksisite testlerinin başında gelmektedir (Draize et al. 1944). 1965’ te Buehler, daha yüksek hassasiyete sahip ‘topikal kapalı yama tekniğini önermiştir. 1969 yılında Magnusson ve Kligman ‘kobay maksimizasyon testini’ geliştirmiştir. 1980’ den beri birçok alternatif test metodu tanımlanmaktadır. Bu testlerin (NPPET; *non-perfused pig ear test*), bir kısmı hala kullanılmakta ve ECVAM tarafından validasyon prosesi içerisine dahil edilmemektedir.

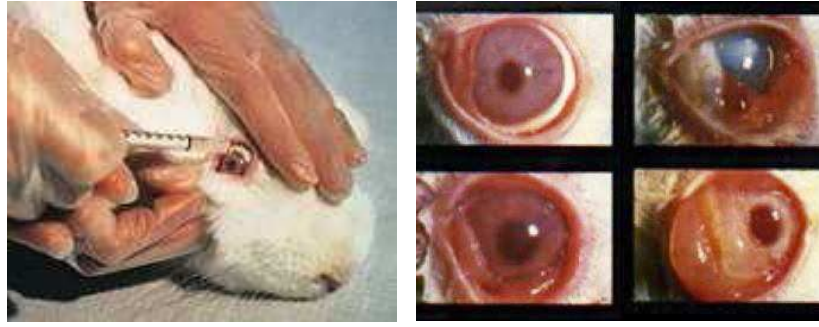
Kozmetik ürünlerin ve içerdikleri maddelerin test edilebilmesi için deney hayvanı kullanımına alternatif ECVAM tarafından onaylanmış EpiDerm™ (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), EPISKIN™ (Episkin, Chaponost, Fransa;), SkinEthic RHE™ (SkinEthic Laboratories, Nice, France) (D.A. Kidd,2007) yeniden yapılanadırılmış epidermis modellenli test metotları ve TER (Transkutanöz elektriksel direnç testi), SIFT (Fare derisi bütünlük fonksiyon testi), BCOP (sığır kornea opaklık ve geçirgenlik testi) yöntemleri bulunmaktadır.



Şekil 2.9 Kimyasal maddelerin toksisite testleri

2.5.1 Draize Testi

Herhangi bir hastalığı bulunmayan, göz yapıları normal olan albino tavşanlar kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Özellikle kozmetik alanda kullanılan kimyasalların toksisitesini ve gözde yarattığı irritasyonu belirlemektedir. Genellikle her bir test dozu için 3 veya 6 adet tavşan kullanılmaktadır. Tavşanın sağ gözü test için tasarlanırken, sol gözü kontrol amacıyla uygulama dışı bırakılır. Göz başına 0,1 ml hacimde kimyasal tek damla (yaklaşık 0,04 ml) halinde uygulanır. Bu oran düşük hacimli dozlarda 0,01ml' ye kadar indirilir. Steril tuz solüsyonları ile zaman zaman oküler yüzey nemlendirilir.



Şekil 2.10 Draize testi A)Tavşan gözüne kimyasalın uygulanması, B)Kimyasalın uygulanması sonucu tavşan gözünde meydana gelen değişimler ve hasarlar (<http://www.unleashed.org.au>)

Deney öncesi ve sonrası değerlendirmeler bioküler büyüteç veya mikroskop ile gerçekleştirilir. Kimyasal uygulanmasından 1, 24, 48 ve 72 saat sonra, gerekli ise 7 ve 21 gün sonra değerlendirmeler gerçekleştirilir. Oküler değişimler (göz kapağı, konjunktiva, kornea ve iris) bir puanlama sistemine göre tanımlanmaktadır (Wilhelmus, 2001; Liu, 2001).

Çizelge 2.2 Draize testi puanlama sistemi (Wilhelmus K.R., 2001, Chambera et al., 1993)

Değerlendirme	Puan
Korneal opaklık	
Bulanıklı veya ülser oluşumu yok	0
Dağınık halde bulanıklık var, iris net bir şekilde gözükmemekte	1
Yarı saydam görünümlü bölgeler; irisi hafifçe örtmekte	2
Opaklaşan bölgeler; iris ayrıntısı ve pupil boyutu görünmemekte	3
Opak kornea; bulanıklıktan iris görünmemekte	4
İritis	
Normal	0
İriste kan birikmesi, kornea çevresindeki enfeksiyona bağlı şişlik oluşması	1
Kanama, iriste büyük yıkım veya ısığa karşı duyarlılık kaybı	2
Konjunktival kızarıklık	
Kan damarları normal	0
Bazı kan damarlarında kan artışı	1
Damarları görünürlüğünde azalma ve kırmızımsı bir renk oluşması	2
Güçlü bir kırmızı renk yayılması	3
Toplam Puan = Tüm puanların toplamı (kornea, iris ve konjunktiv)	

2.5.2 Kobay Maksimizasyon Testi (GPMT)

Magnusson ve Kligman tarafından geliştirilen adjuvan türü bir test metodudur. Adjuvan olmayan testlere oranla olası hassasiyetin belirlenmesinde daha etkilidir (Momma et al,1998).

İndüksiyonda kullanılacak (intradermal ve topikal) kimyasalın konsantrasyonları, sistemik olarak tolere edilebilir ve hafif cilt irritasyonuna yol açacak nitelikte olmalıdır. Eğer kimyasal irritan değil ise, uygulama öncesinde lokal irritasyonun sağlanması amacıyla sodyum lauril sülfat kullanılır. Kimyasalın uygulanması için en az 10, kontrol grubu için ise en az 5 deney hayvanı kullanılmaktadır. Tekrarlı topikal uygulama sonrasında, ciltte meydana gelen reaksiyonlar gözlenir ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır (OECD, 1992)

Çizelge 2.3 GPMT ve Buehler test için kullanılan derecelendirme skalası (OECD, 1992)

DEĞERLENDİRME	MORFOLOJİ
0	Görünen bir değişikliğin olmaması
1	Aralıklı eritem
2	Konfluent eritem
3	Şiddetli eritemve şişlik

2.5.3 Lokal lenf nodu Testi (LLNA)

Kimyasalın deri üzerinde yarattığı hassasiyeti belirlemeye yarayan ve kobay testlerine alternatif oluşturan bir metottur. Kimyasal maddenin uygulandığı bölgede bulunan lenf düğümlerinde indüklenmiş proliferatif cevap artışı meydana gelmektedir. Bu artış ölçülerek allerjen maddeler tespit edilebilmektedir. Her bir kimyasal doz grubu için 4 fare kullanılmakta ve her testte pozitif/negatif kontrol hariç minimum 3 farklı kimyasal madde

konsantrasyonu (%100, %50, %25, %10, %5, %2,5) test edilmektedir. Kimyasal, farenin her iki kulağının arkasına topikal olarak uygulanmaktadır. Üç gün boyunca, hergün uygulama devam ettirilir. Fareler bir süre dinlendirildikten sonra altıncı gün bromodeoksiuridin (BrdU) enjekte edilir. Fareler kurbanı edilir ve auriküler lenf nodülleri izole edilir. Lenf nodu hücreleri işaretlenir ve çoğalmaları akış sitometrisi ile ölçülmektedir.(OECD, 2010; Gerberick, 2007).

2.5.4 Yama (Patch) Testi

Direkt olarak insan derisi üzerine uygulanarak cilt tahriş potansiyelinin tespit edildiğ bir metottur. Kozmetik maddelerin, madde karışımlarının ve bitmiş ürünlerin test edilmesine olanak vermektedir. Özellikle allerjik kontakt dermatit tanısında kullanılmaktadır.



Şekil 2.11 Yama testi uygulanması (<http://www.qacs.gr/tr/patch-test.php>)

Yama testi ünitelerinin içerisine test kimyasalı eklenir. Oluşturulan test ünitesi yetişkin gönüllülerin sırt kısmı alkol ile temizlendikten sonra yapıştırılır. 48 saat sonunda test ünitesi çıkartılmaktadır. Bu işlemi takip eden 30. dakika da ve geç ortaya çıkabilecek reaksiyonların tespiti amacıyla 72. veya 96. saatte değerlendirmeler gerçekleştirilmektedir.

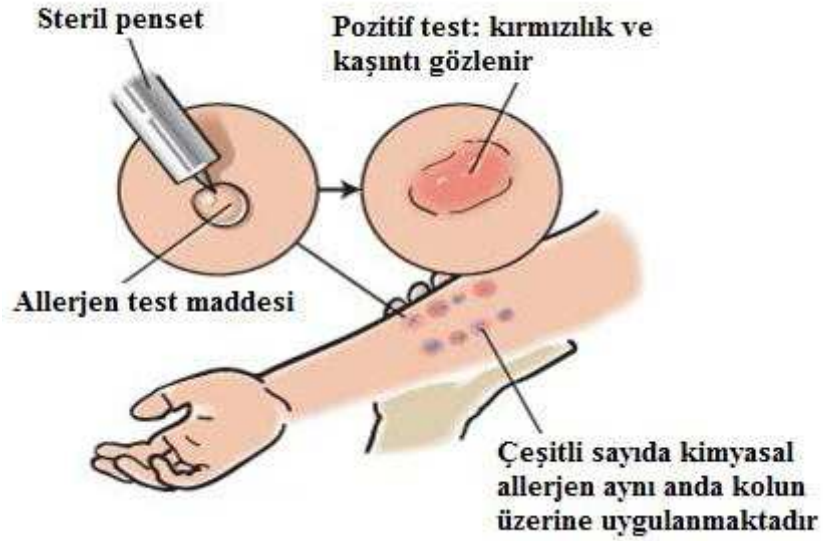
Çizelge 2.4 Yama testi için kullanılan derecelendirme skalası (türk dermatoloji derneği)

	DEĞERLENDİRME	KLİNİK YORUM
+	Reaksiyon yok	Kontakt allerji yok
+/-	Hafif eritem	Kuşkulu reaksiyon
+	Eritem, infiltrasyon ve ödem	Olası kontakt allerji
++	Eritem, infiltrasyon ve vezikül oluşumu	Allerjik kontakt dermatit
+++	Vezikülobülloz ve/veya ülseratif reaksiyon	Allerjik kontakt dermatit (kesin)
IR	İrritasyon	Kontakt allerji yok

2.5.5 Prick (İğne) Testi

Uygulama alanı yama testine benzer olup testin gerçekleştirilme tekniğinde farklılıklar içermektedir.

Testin gerçekleştirileceği deri bölgesi alkol ile temizlenir. Kimyasalın damlatılacağı deri bölgeleri aralarında en az 2şer cm aralık olacak şekilde işaretlenir. Test edilecek kimyasal maddenin solusyonları hazırlanır. Hazırlanan bu solusyonlar gönüllülerin derisi üzerine damlatılmakta ve damlaların bulunduğu kısım iğne ile delinmektedir. Deri yanıtı 15-20 dakika bekleme süresi sonunda maksimuma ulaşır.



Şekil 12.11 Prick testi uygulanması (<http://dustmitespedia.com/articles/allergy-skin-test-picture-skin-prick-allergy-test-pictures>)

Pozitif sonuç kendini çevresinde eritemli bir daire bulunan ödemli bir papül şeklinde göstermektedir. Pozitif ve negatif sonuçlar göz önünde bulundurularak kimyasalların irritasyon potansiyeli değerlendirilir.

Çizelge 2.5 Prick testi için kullanılan derecelendirme skalası (türk dermatoloji derneği)

0	Reaksiyon yok
+	Eritem ≤ 15 mm; ödem yok
++	Eritem > 15 mm; ödem < 3 mm
+++	Ödem 3-6mm
++++	Ödem > 6 mm ve psödopod gelişimi

2.6 Kozmetik Alanında Kullanılan Alternatif Test Metotları

Avrupa Birliği Kozmetik Yönetmeliği (*The 7th Amendment to the Cosmetics Directive - Council Directive 2003/15/EC*) doğrultusunda, altı yıl içinde kozmetiklerde, yeni kozmetik ürünlerde ve katkılarında hayvan deneylerinin sona erdirilmesi ile (öneri olarak 2013 yılında) Avrupa Birliği pazarlarında hayvan deneyleri uygulanmış bu tür ürünlerin satışına yasaklar

getirilmesini ön görmektedir. Bu yönerge çerçevesinde söz konusu madde ve ürünlerin insan sağlığına etkilerinin (toksikokinetikleri, tekrarlanan doz toksisite ve reproduktif olumsuz aktiviteleri vb gibi) belirlenebilmesi için gerekli, yeni ve alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesi sürecinde ortaya çıkabilecek teknik sorunlar ve gecikmeler dikkate alınarak, önerilen tarihlerde değişiklikler olabileceği de vurgulanmıştır. Söz konusu karar, diğer taraftan da, halen ECVAM tarafından kabul edilmiş ve Avrupa Birliği pazarlarına uyarlanmış olan alternatif test yöntemlerinin bulunduğu konularda ise hemen yasaklamaların getirilmesini gerektirmektedir. Aynı zamanda kozmetik ham ve katkı maddeleri Avrupa Birliği Kimyasal Maddeler Yönetmeliği kapsamında da *Directive 67/548/EC and Regulation (EC) No 1907/2006*] yer aldıklarından Kozmetik Yönetmeliği doğrudan kimyasal maddelerin kontrolü ile de ilişkilendirilmektedir. İlgili Avrupa Birliği kimyasal maddeler kontrol politikaları 30.000 kadar kimyasalın, insan sağlığı açısından tekrar test edilmesi gibi, eğer uygun alternatif test yöntemleri geliştirilemezse, REACH düzenlemeleri kapsamında, büyük miktarlarda hayvan telef edilmesine yol açabilecek ağır yükümlülöklere de yol açmaktadır. Bu yüzden geleneksel hayvan deneylerine alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesinin öncelikli bir çalışma alanı olduğu vurgulanmaktadır (Hoffmann et al., 2005, 2008; Spiekstra et al., 2009).

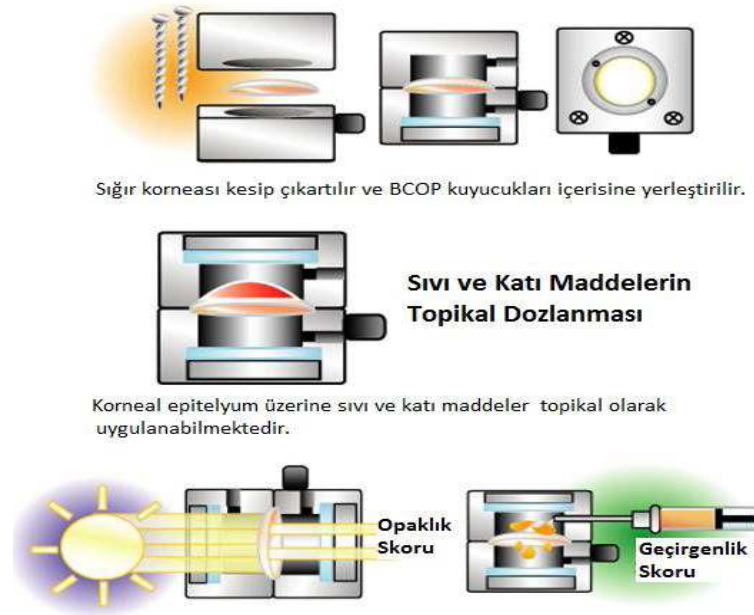
2.6.1 Sığır Kornea Opaklık ve Geçirgenlik Testi (BCOP)

1940' lı yıllardan beri sığır korneaları toksisite testlerinde kullanılmaktadır. Günümüzde uygulanan BCOP testi, Pierre Gautheron ve Joseph Sina tarafından kimyasalın göz de yarattığı irritasyonun belirlenmesi amacıyla, Draize testine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu testte floresan geçirgenliği ve ışık iletimi ölçölerek kimyasal maddenin kornea üzerindeki etkisi belirlenmektedir.

Mezbaha' dan elde edilen hasara uğramamış sığır korneaları disekte edildikten sonra 1 saat isotonik ortam içerisinde inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda her bir korneanın bazal opaklık opasimetre ile ölçölür ve kaydedilir.

Kimyasalın fizikokimyasal özelliklerine göre dilüsyonlar hazırlanır ve korneanın yüzeyine uygulanır. Bekleme süresinin sonunda opaklık ölçülmeden, kornealar taze ortam içerisinde 2 saat daha bekletilirler ve opaklık ölçümü gerçekleştirilir. Geçirgenlik ölçümü için fluoresan bir solusyon korneanın üzerine uygulanır ve bekleme süresi sonunda korneanın alt kısmındaki vasat toplanarak spektrofotometre ile okutma gerçekleştirilir. Opaklık ve geçirgenlik sonuçları birleştirilerek kimyasalın iritasyon potansiyeli belirlenmektedir (Invitox No: 127, OECD Test guideline No: 437). BCOP testi ile alınan sonuçlar *in vivo* sonuçlar ile %85 oranında uyum göstermektedir (Gautheron et al., 1992).

Bu test protokolünden elde edilen sonuçlar, alkoller ve ketonlar için yanlış pozitif değer ve bazı katı maddeler için yanlış negatif değer verebilmektedir.

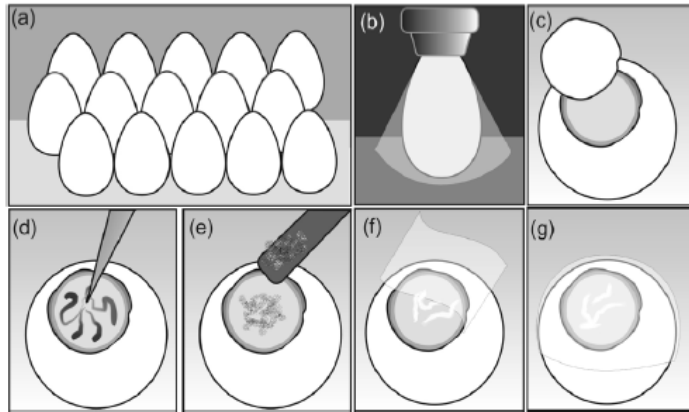


Şekil 2.12 Sığır Kornea Opaklık ve Geçirgenlik Testi (Kaynak:

<http://www.mbresearch.com/bcop.htm>)

2.6.2 HET-CAM (Hen'in Yumurta Testi- Koryoallantoik Membran)

Aşındırıcı veya oküler iritan maddelerin toksisitesini belirlemekte deney hayvanı kullanılarak yapılan testlere alternatif bir metottur. Test materyalinin, tavşan gözünde olduğu gibi küçük damarlar ve membran proteinleri üzerinde yol açtığı akut etkinin tespitinde uygulanır. Koryoallantoik membran (CAM), teknik açıdan çalışılması kolay ve kan damarları içeren tam bir dokudur. Tavşan gözündeki (Draize test) konjunktival doku gibi CAM' da hasarlara karşı bir enflamasyon prosesi ile cevap vermektedir. Genel olarak test beş aşamadan oluşmaktadır: (I) yumurtanın hazırlanması, (II) test örneklerinin ve pozitif kontrolün hazırlanması, (III) deney prosedürünün uygulanması, (IV) yumurtaların puanlamalarının yapılması, (V) puanlar hesaplanarak irritasyonun belirlenmesi (Cazedey et al., 2009).



Şekil 2.13 HET-CAM testinin aşamaları, a) yumurtaların doğrulması ve inkübasyonu, b) 4. gün yumurtaların gözlemlenmesi, embriyo varlığının ve pozisyonunun gözlenmesi, c) yumurta kabuğunun açılması ve nemlendirilmesi, d) sıvı test materyalinin eklenmesi, e) katı test materyalinin eklenmesi, f) açık kısmın bant ile kapatılması, g) damar hasarının gözlenmesi (Cazedey E.C.L. et al., 2009, CAMVA, 2008)

2.6.3 *In vitro* Deri İrritasyon Testi; İnsan Epidermal Modeli

2.6.3.1 Epiteliyal Hücrelerin Kültürü

Epiteliyal hücre tabakaları kollajen, laminin, fibronektin ve proteoglikanlardan yapılmış bir bazal membran sayesinde diğer hücresel yapılardan ayrılmıştır. Bu bazal membranın *in vitro* koşullarda yeniden yapılandırılması sonucu fonksiyonel bir epitelyum oluşturmak mümkündür (Freshney,2002). Epiteliyal hücrelerin en önemli özelliklerden biri yüzeye ve birbirlerine tutunma eğiliminde olmalarıdır. Bu nedenle normal veya ölümsüz epiteliyal hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldığı zaman apoptoze gidebilmektedir. Bu yüzey etkileşimi, metastatik proste malign hücrelerin yayılmasını etkileyen bir parametredir (Rheinwald and Green, 1975;1981). Bunun yanında epidermis gibi çok tabakalı epitelyumda hücrelerin tabakalanma sırasında bazal membrandan ayrılmaları terminal farklılaşma programının bir parçasıdır. (Jost M. and Rodeck U.,2004).

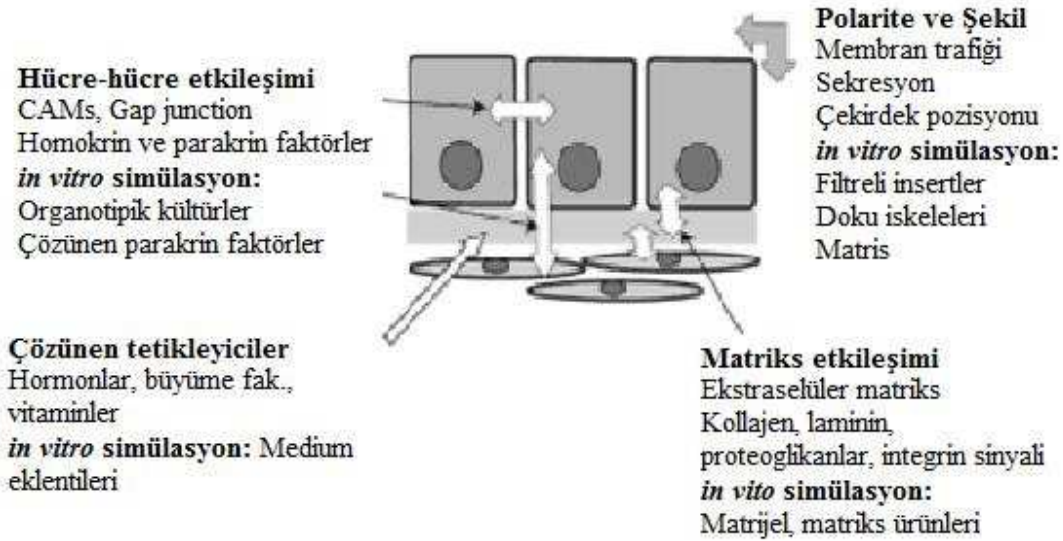
Epidermisteki hücreler canlılıklarını sürdürebilmek için birbirlerine tutunmaya ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle keratinosit izolasyonu sırasında kullanılan ayırma tekniklerinde tek hücre süspansiyonu oluşturmaya çalışılmamalıdır. Hücre ayrımı sırasında mekanik yöntemler ve kollajenaz kullanımı tripsinizasyon işlemine oranla daha etkindir. Kollajenaz kullanımında epitelyum tam olarak ayrılmadığından kültürdeki canlılık oranı daha yüksektir (Frizell et al., 2005; Freshney, 2005).

Epidermal hücre izolasyonunda karşılaşılan sorunların başında, bazal membran kaynaklı fibroblastların ortamdan uzaklaştırılması gelmektedir. Fibroblastların, epidermal kültürler üzerinde baskın bir şekilde hızlı büyümeleri fiziksel metotlar ile ortamdan uzaklaştırılmalarını güçleştirmektedir. (Freshney,2002) .

En popüler yüzey modifikasyonu, UV ışınları veya mitomisin C uygulanarak üremesi durdurulmuş tek tabakalı fibroblastların oluşturduğu besleyici tabakadır. 3T3 fare fibroblastları keratinositler başta olmak üzere

birçok epiteliyal hücrenin canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Besleyici tabaka keratinositlerin tutunabilecekleri bir yüzey sağlamakta ve parakrin faktörleri salgılamaktadır (Rheinwald ve Green, 1977; Wang et al., 2001; Freshney R, 2002).

İnsan epidermal keratinositleri ortamda düşük oranda Ca bulunduğunda çoğalmakta, yüksek oranda Ca varlığında ise farklılaşmaktadır. Fakat ortamda düşük Ca ve serumsuz vasat varsa konfluent olduğunda çoğalmayı durdurup farklılaşmaya başlamaktadır (Ura, et al., 2004). Epidermal farklılaşmanın tetiklenmesi dört ana parametre tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar; a) hücre – hücre etkileşimi, b) hücre – matriks etkileşimi, c) polarite ve hücre şekli, d) çözünen tetikleyicilerdir (hidrokortizon, retinoik asit, vitamin D,E ve K, parakrin faktörler, çoğunlukla sitokinler ve büyüme faktörleri) (Freshney,2002).



Şekil 2.14 Epidermal farklılaşmayı kontrol eden faktörler (Freshney R.I.,2002).

a) hücre – hücre etkileşimi:

Hücre-hücre tutunması, dokularda bulunan hücreler arasında genetik bilginin taşınmasını sağlamaktadır (Gumbiner et al., 1988). Epitelyumun doku fonksiyonu gösterebilmesi için epiteliyal hücrelerin düzgün şekilli olması ve çevresindeki hücreler ile sıkı bir yapı oluşturması gerekmektedir. Epiteliyal hücreler dezmozomlar ve tutunma bağlantıları olmak üzere 2 tip adezyon oluşturmaktadır. Adezyon komplekslerinde bulunan transmembran reseptörler hücrelerin dış yüzeyine bağlanırlar ve hücre içinde meydana gelen etkileri belirlerler. İçerdikleri sitoplazmik proteinler sayesinde transmembran reseptörler hücre iskeletine bağlanabilmektedir. Böylece diğer hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları ile iletişim sağlanabilmektedir.

Epiteliyal yapı oluşumunda, epiteliyal hücreler sürekli hücre içi etkileşimini değiştirmektedir. Örneğin yara iyileşmesi sırasında epiteliyal hücreler, hücre içi adezyonlarını azaltmakta ve hücre çoğalmasını arttırmaktadır (Maheswaran et al., 2007).

b) hücre – matriks etkileşimi:

Çoğu çözünen parakrin faktör, aktif hale gelmek amacıyla ekstraselüler matrikse özgü elemanlara bağlanmaya ihtiyaç duymaktadır. Çoğu matriks molekülü arginin, glisin, aspartik asit gibi integrin sınıfı reseptörlerin bağlanmasından sorumlu aminoasitleri içermektedir. Ekstraselüler matriks, hücrelerin mikroçevrelerini kontrol eden çok kompleks ve değişken bir sistemdir. Çoğu hücre, farklılaşma fonksiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla uygun matriks yüzeylerde geliştirilmektedir.

c) polarite ve hücre şekli:

Çoğu ökaryotik hücre polarize fenotip göstermektedir. Hücrenin polarite karakteri; hücrenin şekli, aktin hücre iskeleti ve membran bağlantılı hücre korteksi yapısına bağlı olarak belirlenmektedir (Knust, 2000).

d)çözünen tetikleyiciler

Kültür vasatı içerisine çeşitli çözünen maddeler eklenerek keratinositlerin farklılaşmaları tetiklenmektedir. Örneğin epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fetal sıgır serumu (FBS) içeren vasat ile içerisinde fibroblast bulunan kollajen jel üzerinde kültüre edilen genç donörlerden elde edilmiş keratinositler, birkaç hafta içerisinde tabakalanarak kültürde boşaltım kanalı benzeri yapılar oluşturmaktadır (Shikiji et al., 2003). Vasat içerisine vitamin C eklenmesi ise keratinositlerin kültürdeki canlılık sürelerini uzatmakta ve *in vitro* epidermal bariyer oluşumunu tetiklemektedir (Boyce et al., 2002).

Çizelge 2.6 Epidermal farklılaşmayı kontrol eden faktörler (Freshney R.I.,2002)

Etken	Hücreler	Referans
Fizyolojik, Diffüze olan:		
Ca ²⁺	Keratinositler	Boyce and Ham, 1983
KGF	Keratinositler	Marchese et al., 1990
KGF	Prostatik epitelyum	Thomson et al., 1997
HGF	MDCK hücreleri	Montesano et al., 1997
TGF-β	Bronşiyal epitelyum	Masui et al. [1986] (See also Chapter 8)
Hidrokortizon, OSM, IL-6, akciğer fibroblastları ile şartlanmış vasat	A549 hücreleri	Speirs et al., 1991; McCormick et al., 1995; McCormick and Freshney, 2000
Retinoik asit	Trake-bronşiyal epitelyum	Kaartinen, 1993
Vitamin D	IEC-6 hücreleri	Jeng et al., 1994
Vitamin K	Böbrek epitelyumu	Cancela et al., 1997
İnsülin, prolaktin ve hidrokortizon	Meme epitelyumu	Marte et al., 1994
Epimorfin	Böbrek epitelyumu	Hirai et al., 1992
Fizyolojik olmayan, Diffüze olan:		
Sodium butyrate	HT29 hücreleri	Velcich et al., 1995
PMA (TPA)	Bronşiyal epitelyum	Willey et al., 1984
PMA	HT29, CaCo-2 hücreleri	Pignata et al., 1994; Velcich et al., 1995

2.6.3.2 Epitelial ve Keratinosit Belirteçleri

Seçilen epitelial hücre hattının çalışmalarda kullanılabilmesi için tanımlanması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Morfoloji, bu amaçla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Epidermal doku oluşumu veya epitelial hücre karakterizasyonunda ışık ve elektron mikroskobu ile morfolojik gözlem gerçekleştirilmektedir. Epitelial hücrelerin çoğu sıkı, mozaik benzeri görünümde ve çevrelerindeki sınırları belirgin şekildedir. Bu karakteristikler tüm

epitelyal hücreler için geçerli değildir. Örneğin tümörlerden elde edilen epitelyal hücreler, şekil bakımından yüksek oranda plastisite göstermektedir. Endotelyum gibi bazı mezenşimden türevlenen hücreler ve fare embriyonik fibroblast hücreleri kültürde konfluent olduğunda epitelyal benzeri görünüm sergilemektedir. Bu nedenle epitelyal karakterizasyon amacıyla ortamda spesifik belirteçlerin varlığının tespit edilmesi gerekmektedir (Maas-Szabowski et al., 2000; Marionnet et al., 2006; Luchi et al., 2005).

Çoğu epitelyal hücre, keratin polipeptitlerden oluşmuş ara filament bir hücre iskeleti (sitokeratinlerin oluşturduğu) ve/veya dezmozomal hücre içi temasları içermektedir. Sitokeratinler farklı çeşitliliğe sahip büyük bir gruptur. Bu da farklı epitelyal hücrelere veya çeşitli farklılaşma basamaklarına özgü farklı anti-sitokeratin antikorlar bulunmakta anlamına gelmektedir. Keratinositlerin karakterizasyonunda kullanılabilecek özellikle epitelyal tabakalanma gösteren hücreler ile reaksiyona giren birçok monoklonal antikor bulunmaktadır. Sitokeratin 14, epidermisin bazal tabakasında bulunmakta, apikal tabakalara doğru gidildikçe miktarında azalma gözlenmektedir (Harris, 1996).

Kültürdeki hücreler konfluent olduğu sırada dezmozom bağlantıları oluşturmaktadır. Bu dezmozom bağlantıları elektron mikroskobu ile görüntülenmekte ve desmozomal proteinler desmoplakin ile immünolojik olarak boyanabilmektedir (Moll et al., 1986).

Çizelge 2.7 Epitelyal hücre karakterizasyonunda sitokeratinler (Freshney R.I.,2002' den uyarlanmıştır.)

Hücre tipi		Sitokeratin Ekspresyonu	
		<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Epidermal keratinositler	Hepsi	K5, K14	K5, K14
	Tüm suprabazal Stratum granulozum	K1, K10 K2e	K1, K10 K2e
Servikal keratinositler	Ektoserviks	K5, K19	K5, K19
	Endoserviks	K18	K18
Meme	TDLU	K19	K19
	Bazal		K5, K7, K14 K18 (postelection)
Prostat	Bazal	K5, K14	K5, K14
	Luminal	K8, K18	K8, K18

2.6.3.3 Epitelial Hücrelerin Organotipik Kültürü

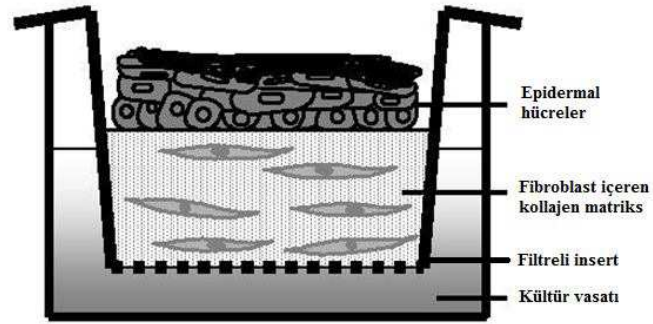
Epitelial hücreler, mezenkimal hücreler ile kokültüre edildiğinde dokuya özgü farklılaşma göstermektedir (Maas- Szabowski et al., 2000). Bu temele dayanarak, epitelial- mezenkimal etkileşimler ve diffüze olan regülasyon faktörlerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli *in vitro* modeller oluşturulmaktadır.

Diğer taraftan organotipik kültür hazırlanması, kültürdeki kısa yaşam süresi ve heterojen hücre yapısı bakımından çeşitli sınırlamaları da beraberinde getirmektedir. Genel olarak organotipik kokültürler a) bilinen lokal ve sistemik davranan büyüme faktörü, hormon ve vitaminlerin etki mekanizmasının çalışılması, b) transforme olmuş hücrelerin değişen büyüme ve farklılaşma mekanizmalarının ortaya konması, c) malign hücrelerin yayılması, tümör oluşturması ve histotipik yapısı gibi karakteristik davranışlarının anlaşılması amacıyla kullanılmaktadır (Freshney R.I., 2002).

Organotipik kültürlerde, insan epidermal keratinositleri kollajen tip1 içeren matrislerin kaplı olduğu geçirgen membran (insert) sistemleri üzerinde geliştirilir. Bu membran sistemleri sayesinde keratinositler, *in vivo* şartlardakine benzer olarak hava-sıvı ara yüzeyinde kültüre edilebilmektedirler. İnsan keratinositleri naylon mikro gözenekli membranlar üzerinde bir süre geliştirilir ve sonrasında hava- sıvı ara yüzeyinde 2 hafta daha kültüre devam edilir (Rheinwald and Green, 1975; Sobral et al., 2007) Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar ve elektron mikroskobu görüntüleri, bu kültür süresi sonunda üst hücre tabakalarında 56,5 ve 65-67 kDa keratinler ve filagrin tip proteinlerin bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca oluşturulan bu yapı içerisinde *in vivo* epidermiste bulunan desmozomlar, hemidezmozomlar, lamellar granüller, keratohyalin benzeri granüller gözlenmektedir (Poumay et al., 2004; Fleischmajer et al., 1993; Bernstam et al., 1990). Kültürün üst kısmında keratinize hücreler yoğun olarak bulunmaktadır.

İnsan keratinositleri besleyici tabaka kullanılmadan da çeşitli yüzeylerde kültüre edilebilmekte ve oluşturulan bu sistemler kimyasalların topikal olarak uygulanmasına olanak verip toksikolojik çalışmalara kolaylık sağlamaktadır

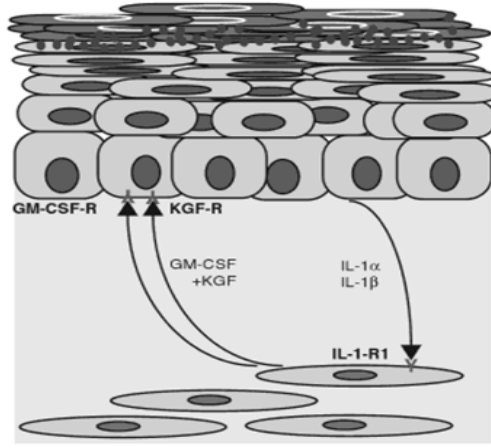
(Bernstam et al., 1990). Keratinositlerin alt kısmında fonksiyonel bir dermal yapı oluşturulmak isteniyorsa kollajen jel içerisine dermal fibroblastlar eklenir (Lee et al., 2009). Bu epitelial-mezenkimal etkileşim sayesinde keratinositlerin kültürdeki üreme katsayısı artmaktadır (Tuan et al., 1994). Özellikle yara iyileştirilmesinde kullanılan bu modellerde, ortamda bulunan fibroblastlar ekstraselüler matriks bileşenlerini sentezlemektedirler (Coulomb et al.,1984; Smola et al.,1993;Lillie et al., 1988).



Şekil 2.15 Keratinositler tarafından oluşturulan organotipik kültür sistemi (Freshney R.I.,2002)

Deride bulunan IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF- α ve β , NGF ve PDGF gibi çeşitli büyüme faktörleri ve interlökinler, keratinosit ve fibroblast kültürlerinde de bulunmaktadır (Luger ve Schwarz, 1995, 1996). Bu faktörler immün reaksiyonlarda ve enflamasyon prosesinde kuvvetli aracı (mediyatör) maddelerdir. Yara oluşumu sonrasındaki deri tamirinde de bu maddeler etkin rol oynar.

Yapılan çalışmalar sonucu kokültüre edilmiş fibroblastların, keratinositler tarafından IL-1 salımı uyarıldığı zaman KGF (keratinosit büyüme faktörü) üretip depoladığı bilinmektedir (Maas-Szabowski et al.,1996). IL-1 alfa sinyalinin engellenmesi KGF salımını inhibe etmektedir.



Şekil 2.16 Fibroblastlar ile oluşturulan organotipik kokültürde keratinositlerin büyümesinin düzenlenmesinde karşılıklı parakrin yol izleri (Mass- Szabowski et al., 2000; Freshney R.I.,2002)

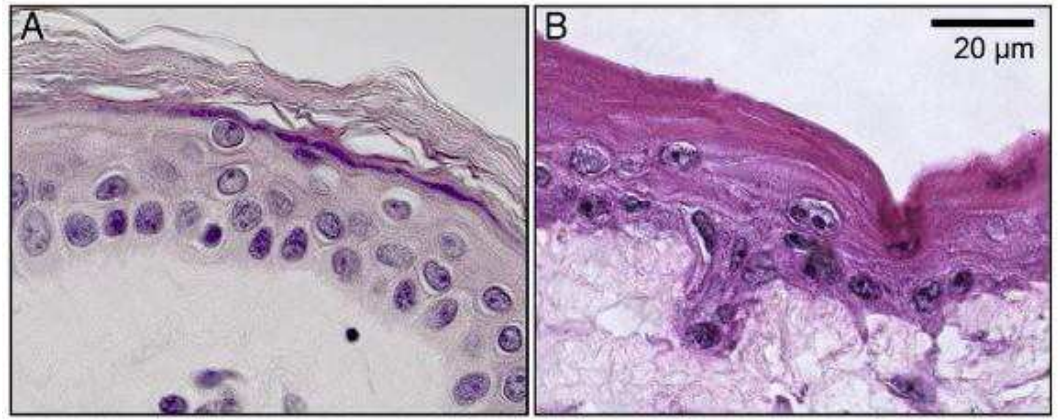
2.6.3.4 Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis Modeli

İnsan keratinositlerinin kültürü ilk kez Rheinwald ve Green tarafından 1970 yılında çalışılmıştır. Bu öncü çalışma neticesinde, kültüre edilmiş keratinosit greftleri yanıklarda ve kronik damar ülserleri gibi diğer yara oluşumlarında uygulanmaya başlanmıştır. Keratinosit kültür teknikleri, keratinositlerin çoğalmalarını ve koloni oluşturma kapasitelerini stimüle eden etkili maddelerin kullanılmasıyla her geçen gün gelişmektedir. Klinikte bu greftlerin kullanımı hala tatmin edici düzeyde değildir.

Doku iskelesi (scaffold) destekli keratinosit tabakaları beraberinde kırılabilirlik, kullanım, kasılma ve uygun yara yatağının hazırlanması gibi bir takım sorunlara yol açmaktadır. Ancak yapılan birçok çalışma, dermal bir tabaka varlığının kültüre edilen keratinositlerin büyümesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Günümüzde, deri dokusu mühendisliğinde fibroblast tutundurulmuş üç boyutlu ortamın keratinositlerin gerekli adhezyon ve ekstraselüler matriks proteinlerini *in vitro* ortamda eksprese etmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Çeşitli amaçlar doğrultusunda deri modeli oluşturulurken keratinositler, a) tip 1 kollajen jel içerisinde üreyen fibroblastlar, b) kimyasal ajanlar ile çapraz bağlanmış liyofilize kollajen – glikozaminoglikan (GAG) membranı, c) ölü domuz dermisi, d) epidermis içermeyen bazal laminası korunmuş insan dermisi gibi mezenkimal yapılar ile

biraraya getirilmektedir (Fleischmajer et al., 1993; Green et al., 1979; Groeber et al., 2011; Frizell et al., 2005; Dietmar et al., 2005)

Doğru yapılandırılmış üç boyutlu bir deri modelinin, klinikte dermal veya epitelial hasarların iyileştirilmesinde kullanımı mümkündür. Bell ve arkadaşları tarafından dizayn edilen Apligraf FDA tarafından onaylanmış ilk deri greftidir. Bu yapı tip 1 kollajen ve fibroblast karışımı üzerinde konfluent bir tabaka halinde kültüre edilen keratinositlerden meydana gelmektedir. (Perkins et al., 1999; Li et al., 1991)

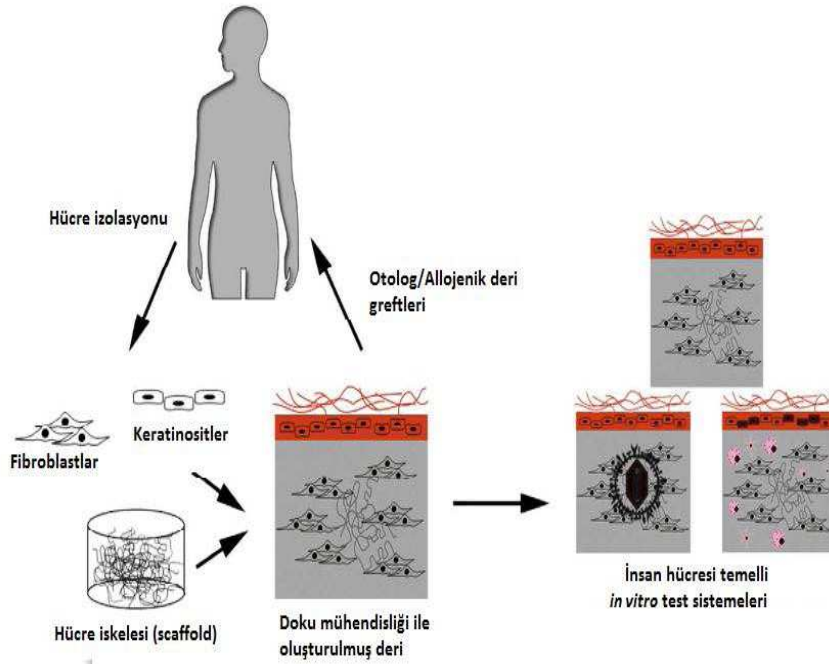


Şekil 2.17 Deri yapılarının karşılaştırılması; *In vivo* derinin (A) ve *in vitro*-mühendislik uygulamaları sonucu oluşturulan epidermal/dermal yapının (B) histolojik boyama görüntüsü (Groeber et al., 2011)

Normal insan keratinositlerinin geçirgen membranlar üzerinde hava – sıvı ara yüzeyinde tabakalandırılmaları sonucunda insan epidermis modeli oluşturulmaktadır. 14 günlük bu süreçte insertlerin altından yüksek Ca içeren serumsuz vasat ile besleme yapılmaktadır. Bu tabakalandırılmış kültür modeli *in vivo* epidermis ile benzer histolojik görünüm sergilemektedir (Sun et al., 2006; Poumay, 2004).

Yeniden yapılandırılmış insan epidermal modelleri, oluşturulmasının ve görüntülenmesinin kolaylığı bakımından tercih edilmektedir. Yapılan morfolojik çalışmalar bu modellerin epidermal farklılaşma belirteçlerini ifade ettiğini ve çok tabakalı bir epitelyum oluşturduğunu göstermektedir. İnsan epidermal modelleri, günlük hayatımızda topikal olarak uygulanan ürünlerin başta irritasyon olmak

üzere fototoksisite, deri aşınması (geri dönüşümsüz hasar), deri hassasiyeti (immünolojik mekanizmalar sonucu oluşan) gibi çeşitli potansiyellerinin belirlenmesinde avantajlar sağlamaktadır. (El Ghalbzouri et al., 2008). Bu epidermal modelleri çeşitli derecelerde ve sürelerde ısıya maruz bırakarak üzerlerinde yaralar oluşturulup yanık modeli olarak ta kullanılmaktadır (Sobral et al., 2007).



Şekil 2.18 Deri doku mühendisliği prensipleri; hücre iskelesi üzerine *in vitro* ortamda eklenmek amacıyla primer keratinosit ve fibroblastlar insan dokularından izole edilir. Tam bir deri yapısı geliştirirken, fibroblast ve matriks dermal kısmını oluşturmak üzere kullanılır. Keratinositler ise epidermal kısmı oluşturmak üzere dermis kısmı üzerine eklenir. Bu şekilde oluşturulmuş deri greftleri *in vitro* test sistemlerinde kullanılmaktadır (Groeber et al., 2011).

Çizelge 2.8 Ticari olarak piyasada bulunan *in vitro* deri yapıları ve epidermal malzemeler (Groeber et al., 2011).

Ürün ismi, Üretici firma	Hücre iskelesi malzemesi	Hücre tipi	Dermis	Test metodu
Episkin™/L'Oreal Nice, France	Kollajen	Keratinosit (estetik cerrahi sonucu karın dokusundan elde edilen)	Yok	Cilt irritasyonu Cilt aşınması
Skinethic™ RHE/L'Oreal, Nice, France	Polikarbonat membran	Keratinosit (yenidoğan sünnet derisi, yetişkin meme dokusu)	Yok	Cilt irritasyonu Cilt aşınması
Epiderm™/MatTek Corporation, Ashland MA, USA	Kollajen kaplanmış polikarbonat membran	Keratinosit (yenidoğan sünnet derisi, yetişkin meme dokusu)	Yok	Cilt irritasyonu Cilt aşınması
EpiDermFT™/MatTek Corporation Ashland MA, USA	Kollajen	İnsan keratinosit (yenidoğan sünnet derisi, yetişkin meme dokusu), insan fibroblast	Var	Tam olarak saptanmamış
EST-1000/CellSystems, Troisdorf, Germany	Polikarbonat membran	Keratinosit (yenidoğan sünnet derisi)	Yok	Cilt aşınması
AST-2000/CellSystems, Troisdorf, Germany	Kollajen	İnsan keratinosit, insan fibroblast	Var	Tam olarak saptanmamış
Phenion® FT Model/Henkel AG&Co.KGaA Duesseldorf, Germany	Liyofilize kollajen	İnsan keratinosit, insan fibroblast	Var	Tam olarak saptanmamış
StrataTest®/Stratatech Corporation Madison WI, USA	Kollajen 1	Ölümsüz, insan NIKS® Keratinosit, dermal fibroblast	Var	Tam olarak saptanmamış

2.6.3.5 İnsan Epidermal Modeli ile kozmetik maddelerin irritasyon potansiyelinin belirlenmesi

Tek tabakalı (monolayer) kültürler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar ile kimyasal bileşiklerin, hücre çoğalmasına karşı etkileri, toksisiteleri ve bazı moleküler parametreleri ortaya konulabilmektedir. Fakat kimyasalların topikal uygulanmaları sonucu derinin farklı bölümlerinde yol açtıkları etkiler tespit edilememektedir. Bu amaçla özellikle yeni bileşiklerin farmakolojik karakterizasyonu amacıyla mekanik olarak stabil epidermal modeller kullanılmaktadır (Zöller et al., 2008).

İrritasyon tespiti öncesinde oluşturulan epidermal modelin fonksiyonel analizleri (canlılık, bariyer fonksiyonu, morfoloji) gerçekleştirilmektedir (ECVAM, 2009; Kandarova et al., 2006).

Canlılık : Modelin canlılığını tespit etmek için MTT testi uygulanmaktadır. MTT; hücrelerin mitokondriyal enzim aktivitesini belirleyen kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerin mitokondriyal enzim aktiviteleri sayesinde sarı tetrazolyum tuzu 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl] 2,5 diphenyl tetrazolium bromit, mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir (Carmichael et al., 1987) .

Bariyer fonksiyonu: Oluşturulan epidermal modelin *st. korneum* yapısı ve lipit kompozisyonunun sitotoksik belirteç kimyasalların hızlı penetrasyonuna elverişli olması gerekmektedir. Bu amaçla SDS veya Triton X-100 doku üzerine uygulanarak IC₅₀ veya ET₅₀ değerleri tespit edilir. Bu değerler onaylanmış epidermal modellerin sonuçları ile karşılaştırılmaktadır.

Morfoloji: Epidermal modelin histolojik analizi (parafine gömme, hematoksilin&eosin boyama) gerçekleştirilmektedir (OECD, 2009; ECVAM, 2009).

Fonksiyonel analizler sonucu uygunluğu tespit edilen epidermal model kimyasalların iritasyon ve korozyon potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Kimyasalın dokuda meydana getirdiği iritasyonun potansiyelini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki kimyasal madde oluşturulan epidermal modelin üst kısmına (*St. corneum*'a) topikal olarak uygulanmaktadır. Çeşitli bekleme süreleri sonunda epidermal model PBS ile yıkanarak kimyasal ortamdan uzaklaştırılır. Uygulama sonrasında, epidermal model 42 saat süreyle inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyonun amacı ortamda bir iritasyon meydana gelmiş ise enflamatuvar sitokinlerin salınımının gerçekleşmesidir. İnkübasyon süresi sonunda modelin içinde bulunduğu vasat, daha sonra gerçekleştirilecek IL 1 α salınımının ölçülmesi amacıyla toplanmaktadır. Epidermal model üzerindeki hücrelerin mitokondriyal aktivitesi (MTT canlılık testi) ve inflamatuvar sitokinlerin (IL 1 α) salımı ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır (irritant yada irritant olmayan şeklinde) (Spiekstra et al., 2005). MTT canlılık testi gerçekleştirilirken

pozitif kontrol olarak %5 SDS ve negatif kontrol olarak distile su veya PBS uygulanmış epidermal modeller kullanılmaktadır (Uchino et al., 2009; El Ghalbzouri et al., 2008; Spiekstra et al., 2009; Perkins et al., 1999; Borlon et al., 2007).

Kimyasalın uygulandığı doku modelinde hücre canlılığının, kontrol grubuna nazaran %50' nin altına düşmesi, kimyasalı “irritan” olarak sınıflandırır (El Ghalbzouri et al., 2008). Kimyasalın uygulanması sonrasında aşağıdaki tabloya göre değerlendirme yapılmaktadır.

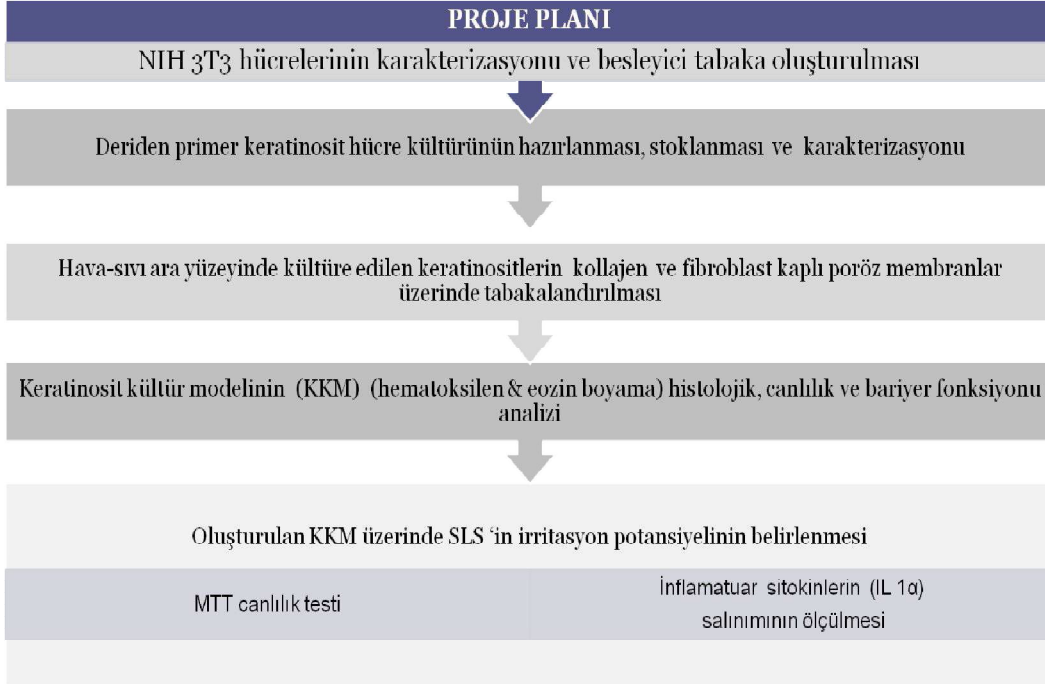
Eğer canlılık $\leq$ %50	irritan (R38)
Eğer canlılık $>$ %50	İrritan olmayan
Eğer IL-1 α salımı $>$ 50 pg/ml	İrritan
Eğer IL-1 α salımı $\leq$ 50 pg/ml	irritan olmayan

Rekonstrükte insan epidermis modelleri ile normal insan derisi arasındaki ana farklardan biri rekonstrükte insan epidermis modellerinde kimyasalın deriden nüfuz edebilme oranı normal insan derisine kıyasla daha fazladır. Bu fark RHE modellerinde irritasyonun tespitinde daha yüksek bir hassasiyet sağlamak ve hafif irritan kimyasalların tespitini kolaylaştırmaktadır (Jones et al., 2009).

İrritasyon mekanizmasının araştırılması ve *in vitro* epidermal modellerin oluşturulması sırasında *in vivo* çalışmalar sonucunda irritan olarak sınıflandırılmış kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu amaçla, kozmetik alanında da kullanılan ve irritan kabul edilen maddelerin başında sodyum lauril sülfat (SLS) ve türevleri gelmektedir (Fletcher et al., 2001; Fletcher and Basketter, 2006).

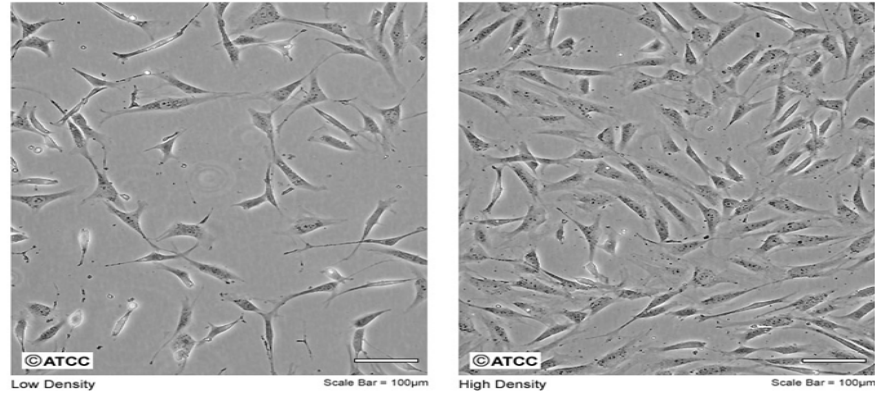
3. MATERYAL METOT

Bu tez projesi çerçevesinde gerçekleşen her türlü uygulamada kişinin ve oluşturulacak test düzeneğinin olası risklerden korunması amacıyla gerekli güvenlik önlemleri alınmıştır. Ege Üniversitesi İAEK 09-7.1/25 no' lu etik kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” imzalatılmıştır. Epidermal hücreler anti-HIV 1 ve 2, Hepatit C antikor ve Hepatit B antijen değerleri negatif olan gönüllü vericilerden temin edilmiştir. Epidermis ve epidermis ile etkileşim halinde olan materyaller ve vasatlar kullanım sonrasında dekontamine edilmiştir. Diseksiyon malzemeleri, kullanım öncesinde otoklav ile 121 °C’de 45 dakika sterilize edilmiştir. Tüm hücre kültürü işlemleri (hücre ekimi, besi ortamı değiştirilmesi, dondurma, çözme vb.) “Class 2” laminar akışlı biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Uygulamalarda pudrasız eldiven kullanılmıştır.



3.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin üretilmesi ve stoklanması

Hücrelerin çözündürülmesi: ATCC (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu, ABD)' den temşn edilen NIH 3T3 (CRL-1658, ATCC) hücre hattını içeren ampul sıvı azot tankından alınarak 37° deki su banyosunda kısmen çözündürüldü. Ampulün dış kısmı %70' lik etil alkol ile temizlendi ve laminar hava akışlı kabin (HERA Safe, Heraeus, Almanya) içerisine yerleştirildi. 5ml %10 FCS (Hyclone, SH30118.03, Utah), %1 HEPES (Biochrom, L1613, Almanya) içeren DMEM (Biochrom, F0445, Almanya) ile ampul içeriği santrifüj tüpüne toplandı. Santrifüj tüpüne aktarılan hücre süspansiyonu, içerisindeki kriyoprotektanın uzaklaştırılması için 4°C' de 800 rpm' de 5 dakika santrifüj (Eppendorf, 5810R, Almanya) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra santrifüj tüpünün alt kısmında bulunan hücre kümesi taze vasat ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonu 25 cm² yüzeyli kültür kaplarına (Biochrom, Cellstar,690175, Almanya) aktarılarak 37° deki CO₂'li etüvde (Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı.,



Şekil 3.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin farklı hücre yoğunluklarındaki mikroskop görüntüleri (<http://www.atcc.org/Attachments/1825.jpg>)

Hücre sayımı: Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması öncesinde istenilen sayıda hücrenin kullanılması için hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi (Sigma, T6146, Almanya) ve hemositometre (Neubauer, ISOLAB, Laborgerate, GmbH, Almanya) kullanılarak boya almama esaslı bu yöntem her türlü hücre kültürü işlemi öncesinde uygulanmaktadır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan

100 µl alınarak 100 µl tripan mavisi ile karıştırıldı ve homojenize edildi. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak hemositometrenin lamı ile lamelinin arasına yerleştirildi. Işık mikroskobu (Olympus CX31, Japonya) kullanılarak boya almayan canlı hücreler sayıldı ve aşağıdaki formülden yararlanılarak süspansiyondaki canlı hücre yoğunluğu “hücre/ml” olarak hesaplandı.

$$\frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{dilüsyon oranı} \times 10^4}{9 \text{ (sayımı yapılan büyük kare sayısı)}} = \text{canlı ya da ölü hücre yoğunluğu (hücre sayısı/ml)}$$

Hücrelerin pasajlanması: Fibroblastik yapı sergileyen NIH 3T3 hücreleri kültür kabının yüzeyi %70-80 oranında kaplandığı zaman pasajlama (sub-kültür) işlemine geçildi. Kültür kabı içerisinde bulunan kullanılmış vasat boşaltıldı. Kültür kabı yüzeyi Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS (Biochrom, 02L1835, Almanya) ile yıkandı ve sonrasında yüzeye tutunmuş hücreleri kaldırmak amacıyla kültür kabı içine 500µl %0,25 tripsin-EDTA (Biochrome AG, L2123, Almanya) eklendi. Kültür kabı 37° deki CO_2 'li inkübatörde bekletilerek hücrelerin enzimatik olarak yüzeyden kalkmaları sağlandı. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra tripsinin inaktivasyonu için ortama 5ml serum içeren vasat ilave edildi. Kültür kabı içeriği santrifüj tüpüne toplanıp 4°C' de 800 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra santrifüj tüpünün alt kısmında bulunan hücre kümesi taze vasat ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonu 1'e 3 oranında 25 cm² yüzeyli kültür kaplarına aktararak 37° deki CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 5.pasaja kadar çoğaltılarak her pasaj numarasında bir miktar hücre stoklanmak amacıyla donduruldu.

Hücrelerin dondurulması: Dondurulacak hücreler sayıldıktan (Neubaer, ISOLAB, Laborgerate, GmbH) sonra 300.000 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 4°C' de 800 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, sonrasında tüpün alt kısmında kalan hücre kümesi üzerine hazırlanan dondurma solusyonu [%10 FCS ve %90 dimetilsülfoksit, DMSO CryoSure, Wak-chemie medical GmbH, 1.1-33-30215, Almanya] eklendi. Homojenizasyon sonrasında hücre süspansiyonundan alınan 1ml hacimli örnekler kriyotüplere aktarıldı.

kriyotüpler 1 gece -86°C ' deki derindondurucuda bekletildikten sonra -196°C ' deki sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.1.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin Karakterizasyonu

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması: Hücre yoğunluklarının absorbans değerleri belirlenirken MTT yöntemi kullanıldı. MTT, hücrelerin mitokondriyal enzim aktivitesini belirleyen kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerin mitokondriyal enzim aktiviteleri sayesinde sarı tetrazolyum tuzu 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5 diphenyl tetrazolium bromit (Sigma Chemical Co., M5655, Almanya) , mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir (Carmichael et al., 1987) .

1. NIH 3T3 hücreleri, %0,25 tripsin-EDTA (Biochrome AG, Cat No: L2123, Almanya) kullanılarak hücreler enzimatik olarak kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve santrifüj tüpü içerisine hücre süspansiyonu toplandı. 4°C ' de 800 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Tripan mavisi kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı.
3. 96 gözlü pleytin 1. dikey sırasına $200 \mu\text{l}$ 1×10^7 hücre/ml sayıda fibroblast eklendi. Diğer kuyucuklara yarı yarıya dilüsyonlar gerçekleştirilerek fibroblastlar eklendi.
1. NIH 3T3 fibroblastlarının yüzeye tutunmaları için 96 gözlü pleyt 37° ' deki CO_2 'li inkübatöre yerleştirildi ve 2 saat inkübe edildi.
2. 2 saat sonra her bir göze $100 \mu\text{l}$ MTT (Sigma Chemical Co., M5655, Almanya) içeren taze kültür vasatı eklendi.
3. Hücreler karanlıkta 37°C ' deki %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 saat inkübasyona bırakıldı.

4. Bekleme süresi sonunda gözlerdeki kullanılmış MTT solusyonu pipetle çekildi. 96 gözlü pleytin her bir gözüne 200 µl DMSO (Merck, 8.02912.2500, Almanya) eklenerek hücrelerin içerisindeki MTT'nin mitokondriyal enzimlerle parçalanması sonucu ortaya çıkan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
5. Spektrofotometre (Molecular Devices, Spectra Max 190) ile 570-690 nm dalga boyunda absorbans saptandı.

Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayısı belirlenerek tablo oluşturuldu. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve ortalama değerler alındı.

Üreme kinetiğinin oluşturulması: Üreme kinetiği, hücrenin üreme, duran ve ölüm fazlarının ne kadar sürdüğü hakkında bize bilgi vermektedir.

1. 10 gün boyunca, hergün 2 petri deki canlı hücreler sayılacağı için toplamda 't₀' dahil olmak üzere 22 adet petri işaretlendi.
2. 22 x 35 mm' lik petrilerin (Greiner, Cellstar, Almanya) her birine 10⁴ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu pipetlendi.
3. Petriler 37°C' deki %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.
4. 2 saat sonunda inkübatörden 't₀' petrileri çıkartıldı ve petriye tutunmayan hücreler sayılarak, 10⁴ hücre/ml sayısından çıkartılarak yüzeye tutunan hücrelerin 'başlangıç hücre sayısı' belirlendi.
5. Sayım işlemi 10 gün boyunca devam ettirildi ve hücre sayısının zamana göre değişimi grafik haline getirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve ortalama değerler alındı.

3.1.2 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücreleri ile Besleyici Tabaka Oluşturulması

Besleyici tabaka oluşturmak üzere gereken Mitomisin C konsantrasyonunun belirlenmesi: Besleyici tabaka oluşturmak üzere gereken mitomisin C konsantrasyonu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlar test edildi.

1. DMEM (Biochrom, F0445, Almanya) ile dilüe edilerek farklı mitomisin C (Applichem, A2190, Almanya) konsantrasyonları (12,5µg/ml, 12µg/ml, 11µg/ml, 10µg/ml, 9µg/ml, 8µg/ml, 7,5µg/ml, 7µg/ml, 5µg/ml) hazırlandı.
2. 6 gözlü pleytlere NIH 3T3 fibroblastları eklendi ve 37°C' deki %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.
3. Ertesi gün % 70-80 oranında yüzeyi kaplamış NIH 3T3 fibroblastların kullanılmış vasatı ortamdan uzaklaştırıldı ve Ca⁺, Mg⁺ içermeyen PBS ile yıkama yapıldı.
4. 6 gözlü pleytin her bir gözüne hazırlanan farklı mitomisin C konsantrasyonlarından 2ml eklendi. Çalışma her konsantrasyon için 3 tekrarlı gerçekleştirildi.
5. Hücreler 37°C' deki %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 saat bekletildi.
6. Bekleme süresi sonunda mitomisin C ortamdan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı.
7. Her bir göze 2 ml taze vasat eklendi ve pleytler inkübatöre yerleştirildi.
8. Hergün inverted mikroskop ile morfolojik gözlem yapılarak hücrelerinin üremesini durdurup canlılıklarını koruyan en uygun mitomisin C konsantrasyonu belirlendi.

Yapılan denemeler sonrasında en uygun konsatrasyon 10µg/ml olarak tayin edildi. 10µg/ml mitomisin C uygulanmış hücreler dondurularak doku laboratuara geldiği zaman kullanılmak üzere -196 °C' deki sıvı azot tankına yerleştirilmiş ve stoklar oluşturuldu.

3.2 İnsan Kaynaklı Epidermal Keratinosit (İEK) İzolasyonu

Bu tez projesinde, Ege Üniversitesi İAEK 09-7.1/25 no' lu etik kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan ‘‘Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu’’ imzalatıldı. ANKA Özel Sağlık Hizmetleri bünyesinde bulunan Özel Dr. Cevdet Tuğrul Sağlık Polikliniği’nde herhangi bir bulaşıcı hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden elde edilen atık niteliğindeki deri parçaları, penisilin/streptomisin (Biochrome, A2213), gentamisin (Hyclone, SV30080, Utah) , amfoterisin B (Biochrome AG, A 2612, Almanya) , vankomisin (Meditera İlaç, Türkiye) içeren taşıma solusyonu içerisinde Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarı’ na getirildi. Taşıma kabının dış yüzeyi %70’ lik alkol ile temizlenerek kabin içerisine alındı. Genel keratinosit izolasyon prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. Kabin içerisine alınan doku parçası, yağ ve kan damarlarından ayrıldı. Steril Ca^{+} , Mg^{+} içermeyen PBS ile 3 kez yıkama gerçekleştirildi.
2. Epidermis tabakası altta olacak şekilde doku parçası, dispaz solüsyonu (BD, 354235, ABD) eklenmiş petrilerin içerisine yerleştirildi.
3. Petriler, $+4^{\circ}C$ ’ de 1 gece bekletildi.
4. Eş zamanlı olarak besleyici tabaka oluşturmak üzere stoklanmış hücrelerden 1 ampul 6 gözlü pleyte çözdürüldü. Pleyt $37^{\circ}C$ ’ deki %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirildi.
5. Ertesi gün, deri dokusu antibiyotikli PBS içerisine alındı ve pensetler yardımıyla epidermis - dermis ayrımı gerçekleştirildi.
6. Epidermis, petri içerisinde bistüri ile 1cm’den daha ufak parçalara ayrıldı.

7. Parçalara ayrılan epidermis tripsin- EDTA içeren 15ml' lik santrifüj tüplerine alındı.Santrifüj tüpleri 37 °C' de toplamda 15 – 20 dakika olacak şekilde inkübe edildi. Bu süre zarfında 5 dakikada 1 tüpler elde çalkalanarak doku parçalarının askıda kalması ve böylece tripsin-EDTA' nın daha etkin olması sağlandı.
8. Eşit hacimde %10 FBS içeren serumsuz keratinosit besi ortamı(KSFM; Invitrogen, 17005-034, Almanya) eklenerek enzim aktivitesi inhibe edildi.





Şekil 3.2 Deri dokusundan keratinosit izolasyonu: A-B-C; Deri dokusunundan yağ ve kan damarlarından uzaklaştırılması, D; Temizlenen deri parçasının enzim solusyonu içerisine konması, E; Parçalara ayrılan epidermisin enzim solusyonu içeren santrifüj tüpü içerisine toplanması ve enzim aktivitesinin gerçekleşmesi amacıyla 37 °C’ deki inkübatöre yerleştirilmesi, F; 5 dakika 800rpm’ de hücrelerin santrifüj edilmesi.

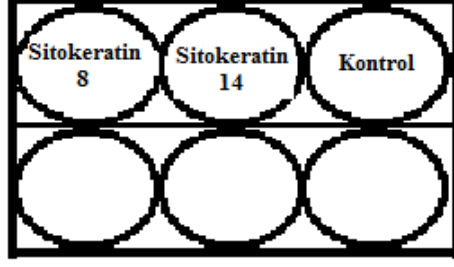
9. Bu hücre süspansiyonu, 70 µm gözenek çaplı hücre süzgecinden (BD, 352350) geçirilerek büyük dokular elimine edildi ve yeni bir santrifüj tüpüne alındı.
10. Hücre süspansiyonu +4 °C’ de 800 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü.
12. Santrifüj tüpünün dibinde bulunan pellet KSFM ile homojenize edildi ve NIH 3T3 fibroblastları tarafından oluşturulan besleyici tabaka üzerine aktarıldı.
13. Hücreler 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
14. 48 saat sonra vasat değiştirilerek pleytin yüzeyine tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı.

15. Sonraki günlerde düzenli olarak vasat değiştirilerek keratinositler inverted mikroskop ile gözlemlendi.

3.2.1 Epidermal Keratinositlerin Karakterizasyonu

İzole edilen keratinositlerin çalışmalarda kullanılabilmesi için karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu hücrelerin karakterizasyonu amacıyla monoklonal sitokeratin 8 ve 14 antikorları kullanılmıştır. Sitokeratin-8 erken keratinosit belirteci iken, sitokeratin-14 ise geç dönem ve tabakalanan keratinosit belirtecidir.

1. İzole edilen keratinositler, immünohistokimyasal karakterizasyonları amacıyla 6 gözlü pleytlerde kültüre edildi.
2. 6 gözlü pleytlerin içerisine uygun steril lameller yerleştirildi.
3. Lameller üzerinde bulunan keratinositler uygun hücre yoğunluğuna ulaştığı zaman öncelikle 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı.
4. Keratinositlerin üzerine paraformaldehit solüsyonu (%4) eklenip 30 dakika bekletilerek, hücreler tespit edildi.
5. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
6. 3.yıkama işlemindeki PBS ortamda bırakılarak pleyt sıkıca kapatıldı ve 6 gözlü pleyt CBÜ. Histoloji Embriyoloji AD. Laboratuvarına götürüldü.
7. Hücre membran lipidlerine etki ederek, membranda gözenekler açmak amacıyla 10 ml triton X-100 (Santa Cruz, sc-29112, Almanya) solüsyonu (%0,1) hazırlandı.
8. Keratinositlerin üzerine H₂O₂ solüsyonu (%3) eklenerek 10 dakika bekletildi.
9. 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Her göze 2ml triton X-100 solüsyonu (%0,1)eklenerek 15 dakika bekletildi.
10. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
11. Bloklama solusyonu eklendi ve 1 saat bekletildi.
12. İşaretlenen gözlere primer antikorlar (Sitokeratin-8, Santa Cruz, sc-8020, Almanya ve Sitokeratin-14 Genetex, GTX62683, USA) eklendi ve +4°C' de 1 gece bekletildi.



13. Üç kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
14. Biotinlenmiş sekonder antikor (Scytek, Sensitek HRP anti polyvalent lab pack, USA) uygulandı ve 30 dakika bekletildi.
15. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
16. Streptavidin (avidin-biyotin kompleksi) uygulandı ve 30 dakika bekletildi.
17. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. DAB/ AEC (diaminobenzidin) boyaması yapıldı.
18. Sitokeratin-8 (K8) ve sitokeratin-14 (K14) uygulanan gözler ve kontrol grubu 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
19. 1 kez PBS ile yıkama yapıldı. Sonrasında 3 kez 5'er dakika distile su ile yıkama gerçekleştirildi.
20. Hücreler inverted mikroskopta incelenerek resimleri çekildi.

3.3 Epidermal Kültür Modeli (EKM)' nin Oluşturulması

3.3.1 Gözenekli membran yapısının kollajen ile kaplanması

Doku modeli oluşturmak üzere çok gözlü tablalara yerleştirilecek poröz membranlar keratinositlerin yüzeye tutunmasını kolaylaştırmak ve yapay bir bazal membran yapısı oluşturmak üzere tip I kollajen ile kaplandı. Bu gözenekli membran sistemi keratinositlerin tabakalanması sırasında kültürün alttan beslemesine olanak vermektedir. Böylelikle keratinositler hava – sıvı ara yüzeyinde kültüre edilebilirler.

1. Son konsantrasyon % 0,1 (w/v) olacak şekilde kollajen (Sigma, C7661, Almanya) 0,1 M asetik asit ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1-3 saat arasında bekletilerek kollajenin çözünmesi sağlandı.
2. Kollajen solüsyonu, dip kısmında %10 kloroform bulunan cam şişe içerisine yerleştirilir. +4 °C' de 1 gece bekletildi ve ertesi gün şişenin üst kısmında bulunan kollajen solüsyonu aseptik koşullar altında alındı.
3. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olacak şekilde kollajen solüsyonundan 500 μl alınarak insertlerin üzeri kaplandı. Kollajen içerisindeki proteinlerin bağlanması için 37°C' de birkaç saat veya +4°C' de 1 gece bekletildi.



Şekil 3.4 Epidermal kültür modeli oluşturulurken kullanılan poröz membran (http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/ThinCert/ThinCerts_ApplGuide_new_2008.pdf)

4. Kaplı yüzeylerden açığa çıkan sıvı uzaklaştırıldı ve 1 gece kurumaya bırakıldı.
5. Sterilizasyon amacıyla kaplı insertler 1 gece UV altında bekletildi.
6. Kaplı insertlerin üzerine hücre eklenmeden önce PBS ile yıkama gerçekleştirildi.

3.3.2 Kollajen kaplı poröz membranlar üzerinde epidermal model oluşturulması

1. Tip I kollajen kaplı poröz membranların üzerine 1×10^5 hücre/ml sayıda fibroblast ekildi.
2. Poröz membranlar 24 saat 37°C ' deki CO_2 içeren etüvde inkübe edildiler. Bu süre sonunda fibroblastların üzerine bir kat daha tip 1 kollajen kaplanır ve 3 saat süresince inkübasyona bırakıldı.
3. Üst kısımda biriken sıvı toplanarak hazırlanan kültür modeli üzerine %10 FBS (Fötal sığır serumu, Biochrome, S0115, Almanya) ve 10 mg/ml gentamisin (HyClone, sv30080, Utah) içeren DMEM eklendi.
4. Ertesi gün oluşturulan modelin üzerine %5 FBS ve 10 mg/ml gentamisin içeren basal keratinosit vasatı (Keratinocyte SFM, 17005, Invitrogen, ABD) ile süspanse edilmiş $1,5 \times 10^5$ hücre/ml sayıda keratinosit eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı.
5. 2 saat sonunda (keratinositler yüzeye tutunduktan sonra) vasat %5 FBS , 15mg/500ml sığır hipofiz ekstraktı (BPE, Keratinocyte SFM Supplement, 37000-015, ABD) ve 0,1 μg /500ml epidermal büyüme faktörü (hEgF, Keratinocyte SFM Supplement, 37000-015, ABD) içeren basal keratinosit vasatı ile değiştirildi.
6. Kültür modeli üzerindeki vasat içerisindeki FBS miktarı %5' ten 0 oluncaya kadar hergün azaltılarak değiştirildi.
7. Ortamdan serumun uzaklaştırılmasının ardından poröz membranlar iç hacmi daha geniş olan 12 gözlü tablalara (Thinsert plate, Greiner, 665110, Almanya) geçirildi.
8. Hava – sıvı ara yüzeyinde kültüre edilen keratinositler poröz membranların alt kısmından 1,88Mm CaCl_2 , sığır hipofiz ekstraktı (BPE, 15mg/500ml) ve

epidermal büyüme faktörü (hEgF, 0,1 µG/500ml) içeren keratinosit vasatı ile kültüre edildiler.

9. Hava – sıvı ara yüzeyinde bulunan hücrelerin 7. ve 14. gününde vasat değiştirildi. Bu süre zarfında membranlar üzerinde bulunan keratinositler morfolojik olarak gözlemlenerek, tabakalanma süreci takip edildi.

3.3.3 Keratinosit Kültür Modelinin Histolojik Analizi

Oluşturulan epidermal kültür modelinin tabakalanmış yapısının ortaya konması amacıyla histolojik analizi gerçekleştirildi.

Boyama Öncesi İşlemler:

1. Üzerinde epidermal kültür modelinin oluşturulduğu poröz membranlar üzerinden vasat uzaklaştırıldı.
2. PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra 30 dakika formalin içerisinde bekletilerek fiksasyon gerçekleştirildi.
3. 2 kez 5' er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
4. Üçüncü kez PBS epidermal model üzerine eklendi ve doku modelleri Hematoksilen&Eosin (H&E) boyaması için CBÜ. Histoloji Embriyoloji AB. Laboratuvarına getirildi.
5. Burada üzerinde epidermal yapı oluşturulmuş poröz membran bistüri ile çıkartılarak agar içerisine gömüldü. Agarın katılaşmasının ardından membranların etrafından düzgün kareler kesilir ve normal parafine gömme takip işlemine geçildi.
6. Daha sonra aşağıdaki uygulamalar sırasıyla gerçekleştirildi.
 - %60'lık etil alkolde 30 dakika bekletildi.
 - % 70'lik etil alkolde 30 dakika bekletildi.
 - % 80'lik etil alkolde 30 dakika bekletildi.
 - % 100'lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
 - %100'lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
 - Ksilen - etil alkolde 30 dakika bekletildi.

- Ksilen I' de 1 saat bekletildi.
- Ksilen II' de 1 saat bekletildi.
- Etüv içerisindeki parafin – ksilen' de 30 dakika bekletildi.
- Parafin I' de 1 saat bekletildi.
- Parafin II' de 1 saat bekletildi.
- Çıkan örnekler parafine gömüldü(tam takip).

Buzdolabında donmaya bırakılan örnekler kesim için çıkarıldı ve aşağıdaki işlemler uygulandı:

- Bloklar traşlandı (trimleme).
- Bloklar sırasıyla mikrotoma yerleştirildi ve 5µm' lik kesitler alındı.
- Kesit alındıktan sonra lamlara alınan örnekler etüve yerleştirilip deparafinize olması sağlandı .



Şekil 3.5 Epidermal kültür modelinin histolojik analizi. A; Epidermal yapı oluşturulmuş poröz membranın bistüri ile çıkartılarak agar içerisine gömülmesi , B-C-D; Tam takip işlemi sonunda örneklerin parafine gömülüp blokların oluşturulması.

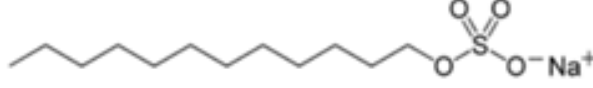
Hemotoksilen – Eozin Boyama:

- Etüvden çıkarılan örnekler ksilen I içerisinde 30 dakika bekletildi.
- Ksilen II içerisinde 30 dakika bekletildi.
- % 95’lik etil alkol içerisinde 2 dakika bekletildi.
- %80’lik etil alkolde 2 dakika bekletildi.
- % 70’lik etil alkolde 2 dakika bekletildi.
- % 60’lık etil alkolde 2 dakika bekletildi.
- Distile suda 5 dakika bekletildi.
- Hemotoksilen boyasında 2,5 dakika bekletildi.
- 5 dakika boyunca akar sudan geçirildi.
- Asit alkol içerisinde batırılıp çıkartıldı.
- 5 dakika boyunca akar sudan geçirildi.
- Eozin boyasında 1 dakika bekletildi.
- 5 dakika boyunca akar sudan geçirildi.
- % 80’lik etil alkolde 45 saniye bekletildi.
- % 95’lik etil alkolde 45 saniye bekletildi.
- Kurumaya bırakıldı.
- Ksilen içerisinde 1 saat bekletildi.
- Örnekler kurumaya bırakıldı.
- Entellan ile lamel kapatılıp ışık mikroskobunda örnekler incelendi.

3.4 Epidermal kültür modeli üzerine kimyasalların uygulanması ve irritasyon potansiyelinin tespiti

Keratinositler ile oluşturulan epidermal kültür modelinin, kozmetik maddelerin irritasyon potansiyelinin tespitinde kullanılabilmesi için çeşitli parametrelerinin ortaya konması gerekmektedir. Bu amaçla *in vitro* test modelini

oluştururken kozmetik ürünlerin bileşiminde sıkça kullanılan, cilt üzerinde irritasyona sebep olan sodyum lauril sulfat (SLS) tercih edildi.



Molekül ağırlığı: 288,38 [g/mol]

Molekül formülü: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OOSOONa}$

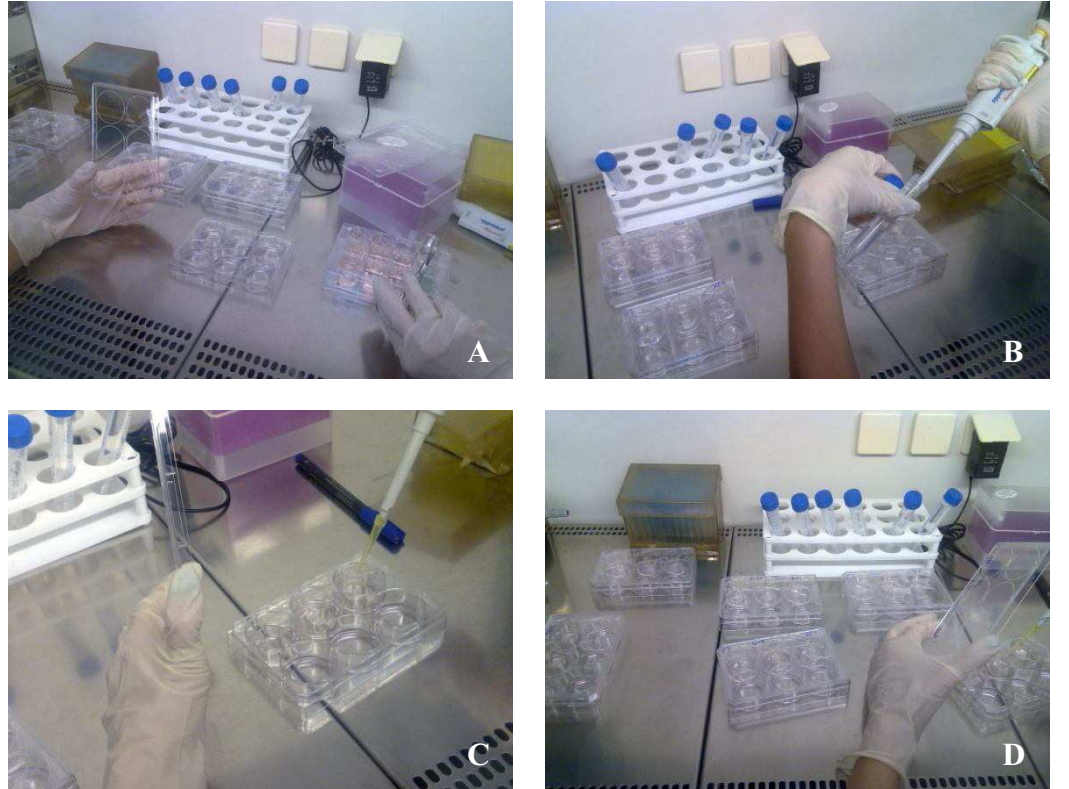
Şekil 3.6 SLS'in genel kimyasal yapısı

3.4.1 MTT Testi

Farklı konsantrasyonda hazırlanan SLS solusyonları, keratinosit kültür modelleri üzerine uygulandı. Denemelerde, negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak %5 (aq) SDS (sodyum dodeçil sulfat, Sigma, L3771, Almanya) kullanıldı. Farklı zaman aralıklarında kimyasal, doku modeli üzerinde bekletildi (EpiDerm, 2004, Kidd et al., 2007, Chatterjee et al., 2006).

1. 14. Gününü dolduran tabakalanmış dokular taze vasat içerisine alındı ve bir süre 37°C' de CO₂'li inkübatöre konuldu..
2. 25µl/ 25mg kimyasal madde (KM) veya negatif kontrol (NK) veya pozitif kontrol (PK)' ün her biri için 3 doku modeli kullanıldı.
3. Hazırlanan konsantrasyonlar doku modeli üzerine topikal olarak uygulandı ve oda sıcaklığında dokular bekletildi.
4. Bekleme süresi sonunda PBS ile yıkama yapılarak kimyasal madde ortamdan uzaklaştırıldı.

5. Dokular taze vasat içerisine aktarıldı ve 37 °C, %5 CO₂ içeren etüvde 27 saat inkübe edildi.
6. 27 saat dolmadan vasat IL-1 alfa analizi için kriyotüplere toplandı ve -86 °C' deki derin dondurucuya yerleştirildi.
7. Dokular kurutuldu ve içerisinde MTT vasatı bulunan 6 gözlü tablolara transfer edildi.



Şekil 3.7 Farklı SLS konsantrasyonlarının doku modeli üzerine uygulanması

8. 37 °C' de %5 CO₂ içeren etüvde 3 saat inkübe edildi.
9. MTT vasatı uzaklaştırıldı ve dokular PBS ile yıkandı.
10. Ekstraktan solusyonu (isopropanol) içerisine dokular yerleştirildi.

11. Dokuları içeren tablalar 2 saat oda sıcaklığında, formazanın ekstrakte edilmesi amacıyla karıştırılarak bekletildi.
12. Bu sürenin sonunda doku üzerindeki ve altındaki ekstrakt homojenize edilerek toplandı.
13. Her bir doku modelinden toplanan ekstrakt, 96 gözlü tablanın 2 gözüne aktarıldı ve 96 gözlü tabla spektrofotometre ile 570 nm' de okutuldu.

3.4.2 EC₅₀ / IC₅₀ ve ET₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

EC₅₀/IC₅₀; %50 maksimum etkinin gözlemlendiği kimyasal maddenin konsantrasyonunu ve dolayısıyla sitotoksisiteyi belirlemektedir. MTT testi sonucu hücre canlılığı kontrol grubunun %50 sinin altına düştüğü taktirde, uygulanan kimyasal irritan bir bileşik olarak kabul edilir.

ET₅₀; kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığını %50 azaltan kimyasal maddeye maruz kalınan süreyi belirten değerdir.

Farklı sürelerde epidermal doku modeli üzerinde bekletilen SLS konsantrasyonlarının MTT testi sonucu elde edilen absorbans değerleri ve kontrol grubunun absorbans değerleri kullanılarak kimyasal maddenin % canlılık değerleri hesaplandı.

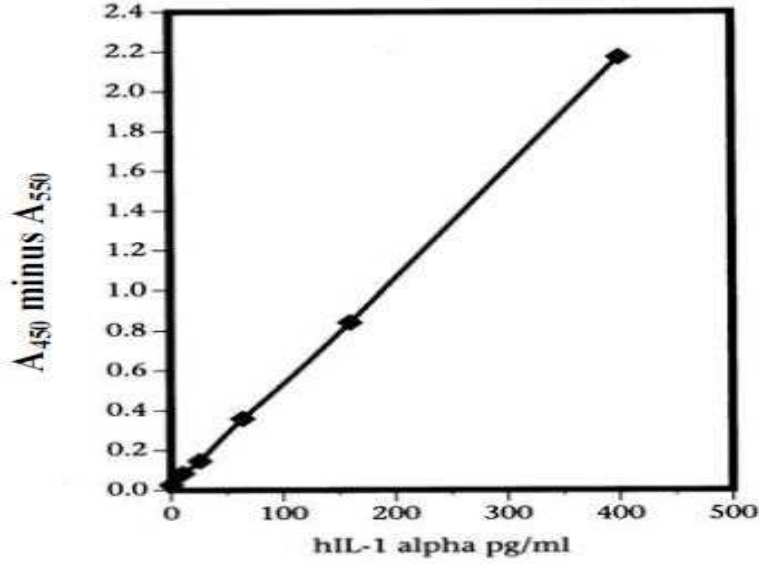
$$\text{Test kimyasalının \% canlılık değeri} = \frac{\text{Test kimyasalının absorbans değeri}}{\text{Negatif kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

3.4.3 İnsan interlekin 1- α (hIL-1- α) Analizi

SLS' in irritasyon potansiyelini ve oluşturulan modelin yeterliliğini ortaya koymak amacıyla MTT öncesinde ortamdan toplanan kültür süpernatantı IL-1 alfa analizi için kullanıldı. MTT sonucu kontrol grubunun % 50'sinin ölümüne yol açan SLS konsantrasyonları irritasyon varlığının desteklenmesi amacıyla IL-1 alfa analizine tabi tutuldu. Tez projesinin amacı irritasyon tespit modelinin geliştirilmesi olduğu için kontrol grubunun % 50'sinin ölümüne neden olmayan diğer SLS konsantrasyonları da test edildi. Tüm örnekler ve reaktifler çalışılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Örnekler, kültürde kullanılan vasatın aynısı ile seyreltilti.

1. Test edilecek her süpernatanttan pleytin 2 gözüne 50 μ l eklendi.
2. Pleytin üzeri kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
3. Pleytin her gözüne 50 μ l biyotinlenmiş antikor reaktifinden (Human IL-1 α ELISA Kit, Thermo Scientific, EH2IL1A, ABD) eklendi.
4. Pleytin üzeri kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
5. Pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
6. Pleytin her gözüne 100 μ l hazırlanan streptavidin –HRP eklendi.
7. Pleytin üzeri kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
8. Pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
9. Pleytin her gözüne 100 μ l önceden karıştırılmış TMB substrat solüsyonu eklendi.
10. Pleytin üzeri kapatıldı ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
11. 100 μ l durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
12. 450 ve 550 nm dalga boylarında UV spektrofotometrede absorbanslar belirlendi.

Şekil 3.8 ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.8 ELISA kalibrasyon eğrisi (www.thermo.com/pierce.)

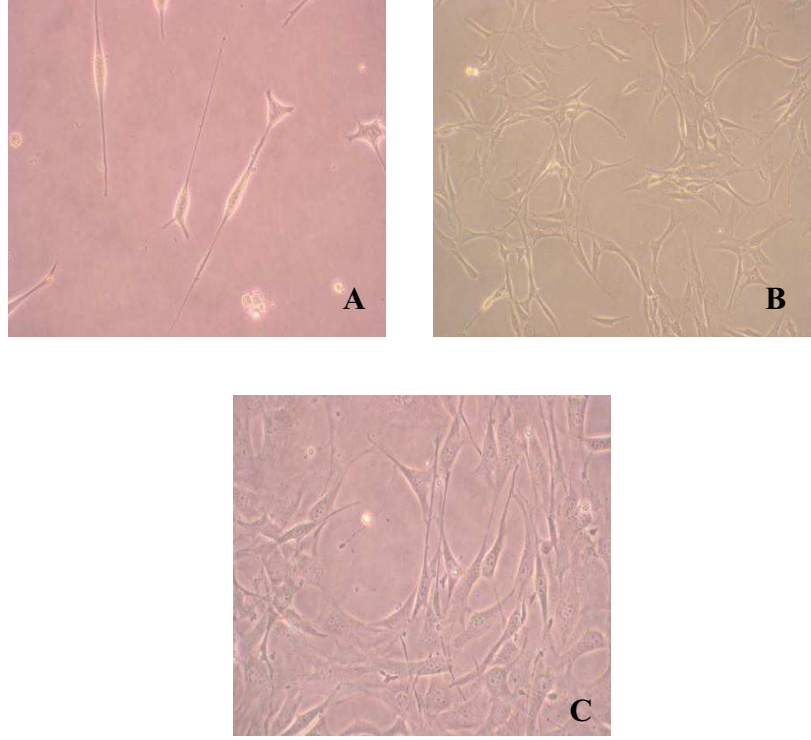
3.5 İstatiksel Değerlendirme

Çalışmadaki istatistiksel değerlendirmeler SPSS 16 istatistiksel analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Deneme sonunda elde edilen veriler tek yönlü varyans (one-way ANOVA) analizi ve t-test gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmaktadır.

4. BULGULAR

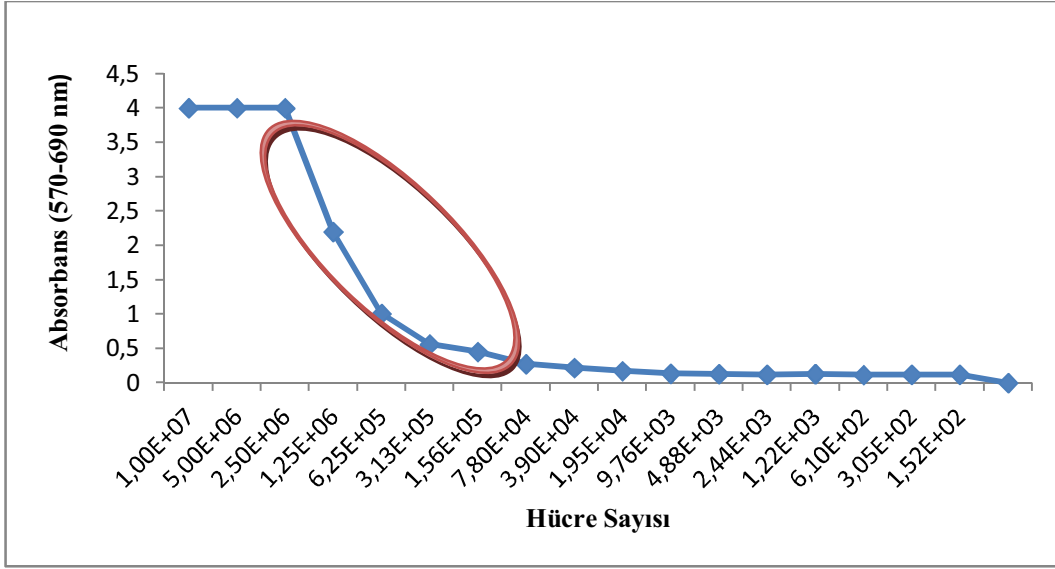
4.1 NIH 3T3 Hücrelerinin Karakterizasyonu

Yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda NIH 3T3 hücrelerinin fibroblastik bir yapı sergilediği, kültürde göç ederek homojen bir gelişim gösterdiği saptandı.



Şekil 4.1 NIH 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast) Hücrelerinin inverted mikroskop (Olympus, Japonya) altındaki görüntüleri; A)P/O' daki NIH 3T3,(20x), B)Subkültür işleminden sonraki 2.gündeki NIH3T3 (10x), C)Kültür kabında %70 yoğunluğa ulaşmış NIH 3T3 (10x)

MTT yöntemi kullanılarak absorbans ölçümü gerçekleştirildi ve bu veriler doğrultusunda kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.2). Oluşturulan kalibrasyon eğrisi sayesinde testlerde kullanılacak NIH 3T3 fibroblastlarının absorbansa karşılık gelen anlamlı hücre sayısı aralığı belirlendi. Bu aralık $2,50E+06 > x > 7,80E+04$ şeklinde değerlendirildi. NIH 3T3 hücrelerinin karakterize edilmeleri amacıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisinde, absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları Çizelge 4.1.' de gösterildi.

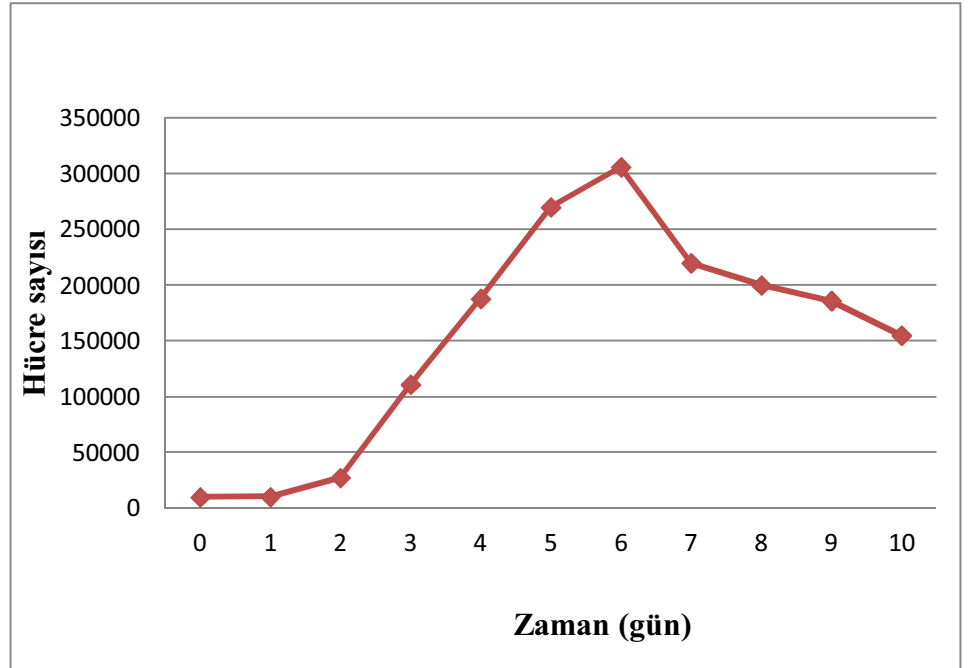


Şekil 4.2 NIH 3T3 hücrelerinin kalibrasyon eğrisi; absorbansa karşılık gelen anlamlı hücre sayısı aralığı $2,50E+06 > x > 7,80E+04$ kırmızı halka içinde gösterildi.

Çizelge 4.1 Absorbans değerlerine karşılık gelen NIH 3T3 hücre sayıları

Absorbans değeri	NIH 3T3 hücre sayısı
4,00	10.000.000
4,00	5.000.000
4,00	2.500.000
2,20	1.250.000
1,00	625.000
0,56	312.500
0,45	156.000
0,27	78.000
0,22	39.000
0,18	19.500
0,14	9.760
0,13	4.880
0,12	2.440

NIH 3T3 fibroblastlarının üreme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan üreme kinetiğinde (Şekil 4.3), hücrelerin maksimum üremeyi gerçekleştirdiği log fazı (1-6 günler arasında), durağan faz (6.gün) ve üreyen hücrelerin sayısının azaldığı ölüm fazı (6. Günden sonrası) ortaya kondu.



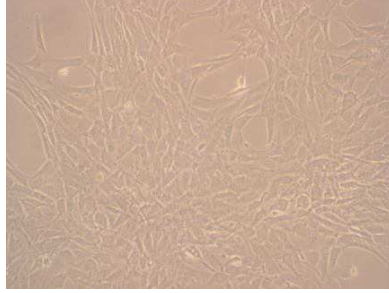
Şekil 4.3 NIH 3T3 hücrelerinin üreme kinetiği. O. Günde 1×10^4 hücre/ml yoğunluğunda ekimden itibaren zamana karşı hücre sayısı değişimi gösterilmiştir.

4.2 Mitomisin C Konsantrasyonunun Belirlenmesi

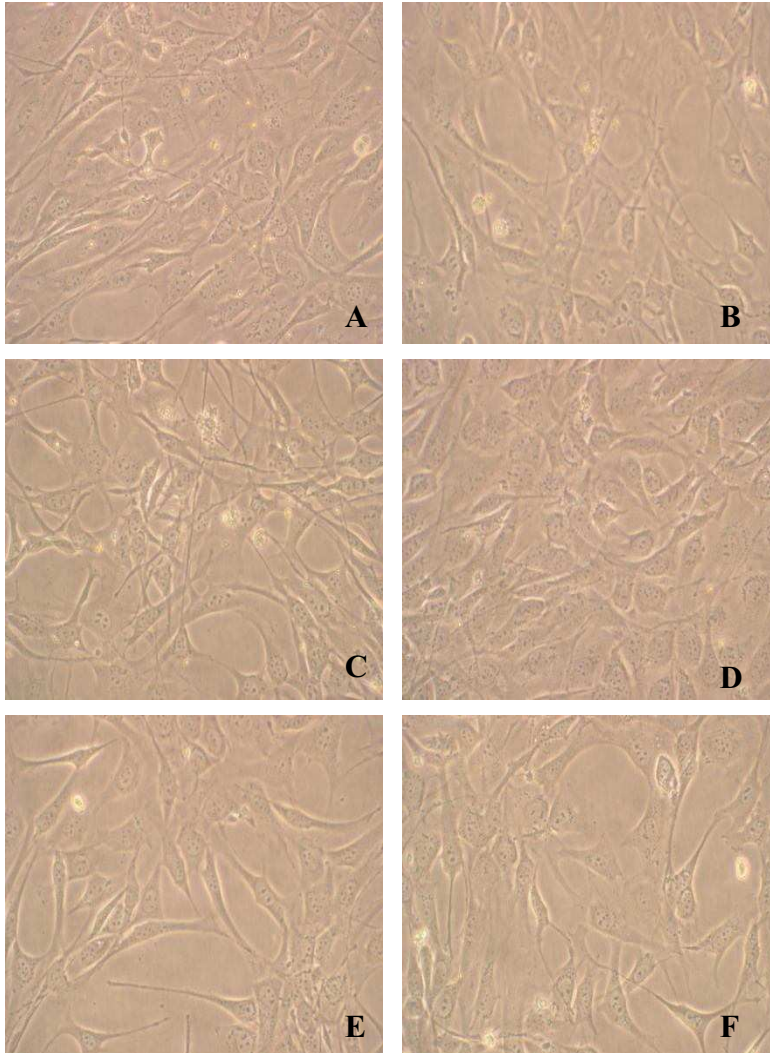
Deri dokusundan keratinositlerin izolasyonu sırasında besleyici tabaka oluşturmak üzere uygun mitomisin c konsantrasyonu belirlendi. 6 gözlü pleytlerde kültüre edilen NIH3T3 fibroblastlar, kültür kabı yüzeyini %60-70 oranında kapladı. Sonrasında farklı mitomisin c konsantrasyonları yüzeye uygulandı. Farklı konsantrasyonların NIH3T3 fibroblastları üzerinde yol açtıkları etki Şekil 4.4 ve 4.5'te ve Çizelge 4.2'de görsterildi.

Yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda hücrelerin canlılıklarını ve morfolojik yapılarını korunduğu en uygun mitomisin c konsantrasyonu $10 \mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi.. $10 \mu\text{g/ml}$ altındaki mitomisin c konsantrasyonlarında

üremenin devam ettiği, 10 µg/ml üzeri konsantrasyonlarda ise hücre çekirdeğinde ve sitoplazmasında granüllü yapıların meydana geldiği belirlendi.



Şekil 4.4 Mitomisin C uygulaması öncesinde NIH 3T3 hücreleri (10x) (Olympus, Japonya)



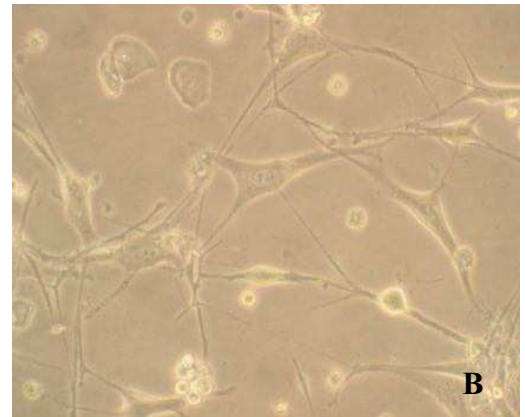
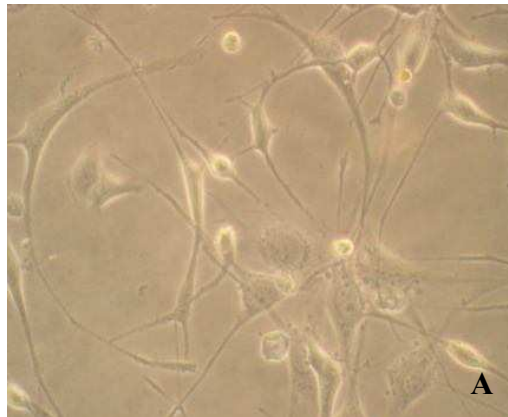
Şekil 4.5 Mitomisin C uygulaması sonrasında NIH 3T3 hücrelerinin görünümü; A- 7µg/ml, B- 8µg/ml, C- 9µg/ml, D- 10µg/ml, E- 11µg/ml, F-12µg/ml mitomisin C uygulanmış NIH3T3 (10x) (Olympus, Japonya)

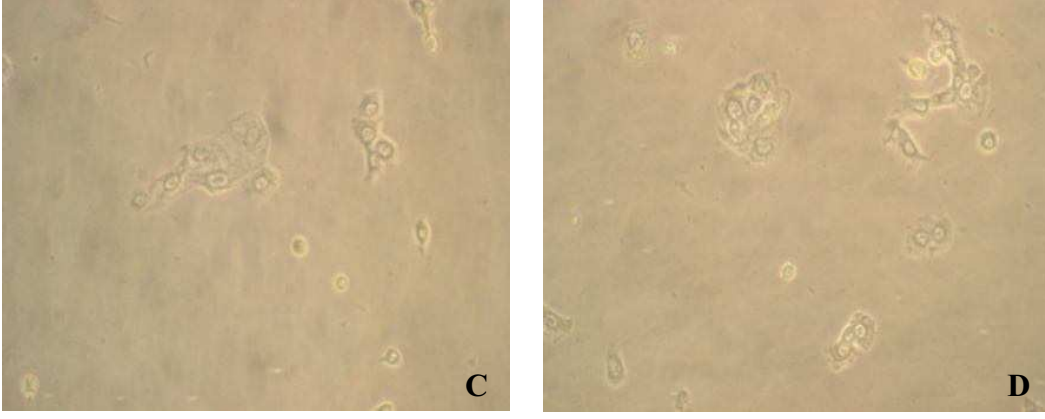
Çizelge 4.2 Farklı mitomisin C konsantrasyonunun NIH3T3 fibroblastları üzerine etkisi.

Mitomisin C konsantrasyonu		Mitomisin C konsantrasyonu	
12,5 µg/ml	Hücrelerde granüllü yapı, morfolojik değişim	8 µg/ml	Hücreler üremeye devam etti
12 µg/ml	Hücrelerde granüllü yapı, morfolojik değişim	7,5 µg/ml	Hücreler üremeye devam etti
11 µg/ml	Hücrelerde granüllü yapı, morfolojik değişim	7 µg/ml	Hücreler üremeye devam etti
10 µg/ml	Hücre morfolojisi korunmuyor, üremenin engellendi	5 µg/ml	Hücreler üremeye devam etti
9 µg/ml	Hücre morfolojisi korunmuyor, riskli görüldü		

4.3 Deri Dokusundan İEK İzolasyonu ve Morfolojik Özellikleri

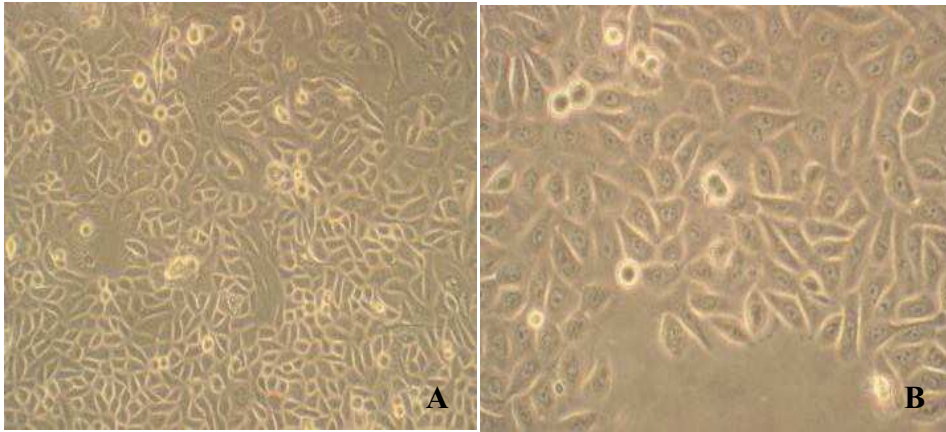
İnsan deri dokusundan izole edilen keratinositler çalışma süresince inverted mikroskop ile morfolojik olarak incelendi. Kültürde yüzeye tutunma eğilimi gösteren keratinositler, kültür kabının çoğunlukla kenarlarında gelişti. Besleyici tabaka olarak kullanılan NIH 3T3 fibroblastları zamanla vasat değişimi sırasında kültürden elimine oldu. Keratinositler, ilk izolasyon gününü takiben 18-20' nci günlerde kültürde dış çeperleri belirgin, köşeli görünüm ve kümeleşme sergiledi. Şekil 4.6' da İEK lerin kültürdeki görüntüleri verildi.





Şekil 4.6 İEK' lerinin morfolojik görüntüsü. A- B; NIH 3T3 hücrelerinin oluşturduğu besleyici tabaka üzerinde deri dokusundan izole edilen primer keratinositlerin görüntüsü (20x) , C- D; Deri dokusundan elde edilen keratinosit kültürlerin 20. gün'deki görüntüleri (10x) (Olympus, Japonya).

Kültürde ilk keratinosit kümeleri oluşmasından sonraki 4- 5 gün içerisinde keratinositlerin kültür kabı yüzeyini %70-80 oranında kapladığı (konfluent hale geldiği) ve pasajlanma aşamasına geldiği gözlemlendi. Düşük Ca içeren KSFM ile kültüre edilen keratinositler serum içeren vasata oranla daha hızlı bir gelişim gösterdi. Serumsuz keratinosit vasatının, izolasyon sonrasında ortamda bulunan dermal kaynaklı fibroblastların uzaklaştırılmasında da etkili olduğu saptandı.

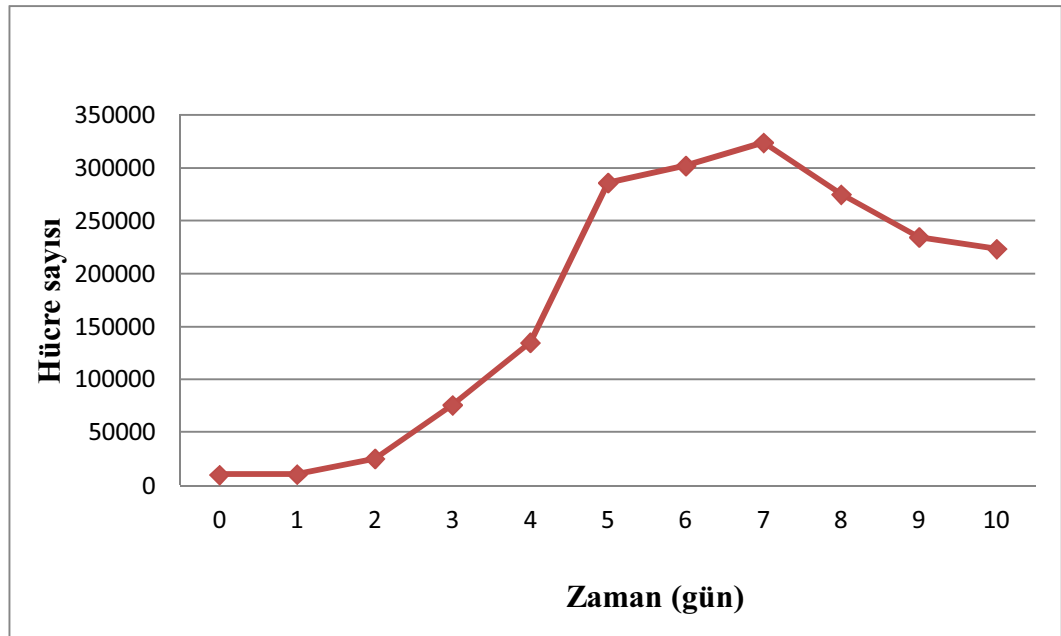


Şekil 4.7 Deri dokusundan elde edilen keratinosit kolonilerinin görüntüleri; A-10x büyütmedeki görüntü, B-20x büyütmedeki görüntü (Olympus, Japonya).

4.4 İnsan Epidermal Keratinositlerin (İEK) Karakterizasyonu

4.4.1 İEK ‘ lerinin Üreme Kinetiği

İnsan epidermal keratinositlerinin üreme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan üreme kinetiğinde (Şekil 4.8), hücrelerin maksimum üremeyi gerçekleştirdiği log fazı (1-7 günler arasında), durağan faz (7.gün) ve üreyen hücrelerin sayısının azaldığı ölüm fazı (7. günden sonrası) ortaya kondu. Bu verilerden daha sonraki EKM oluşturma aşamalarında faydalanıldı.

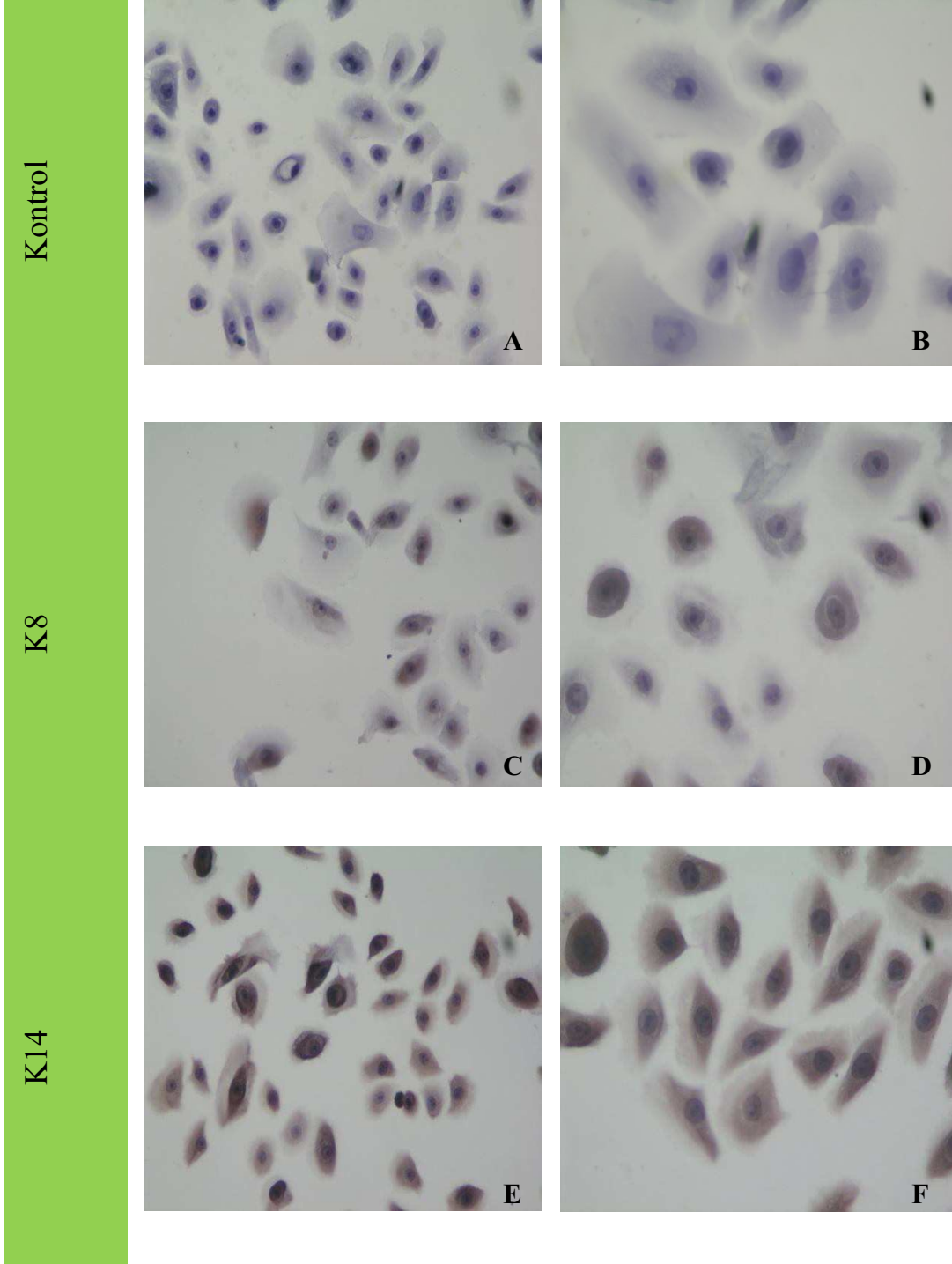


Şekil 4.8 İEK lerin üreme kinetiği. O. Günde 1×10^4 hücre/ml yoğunluğunda ekimden itibaren zamana karşı hücre sayısı değişimi gösterilmiştir.

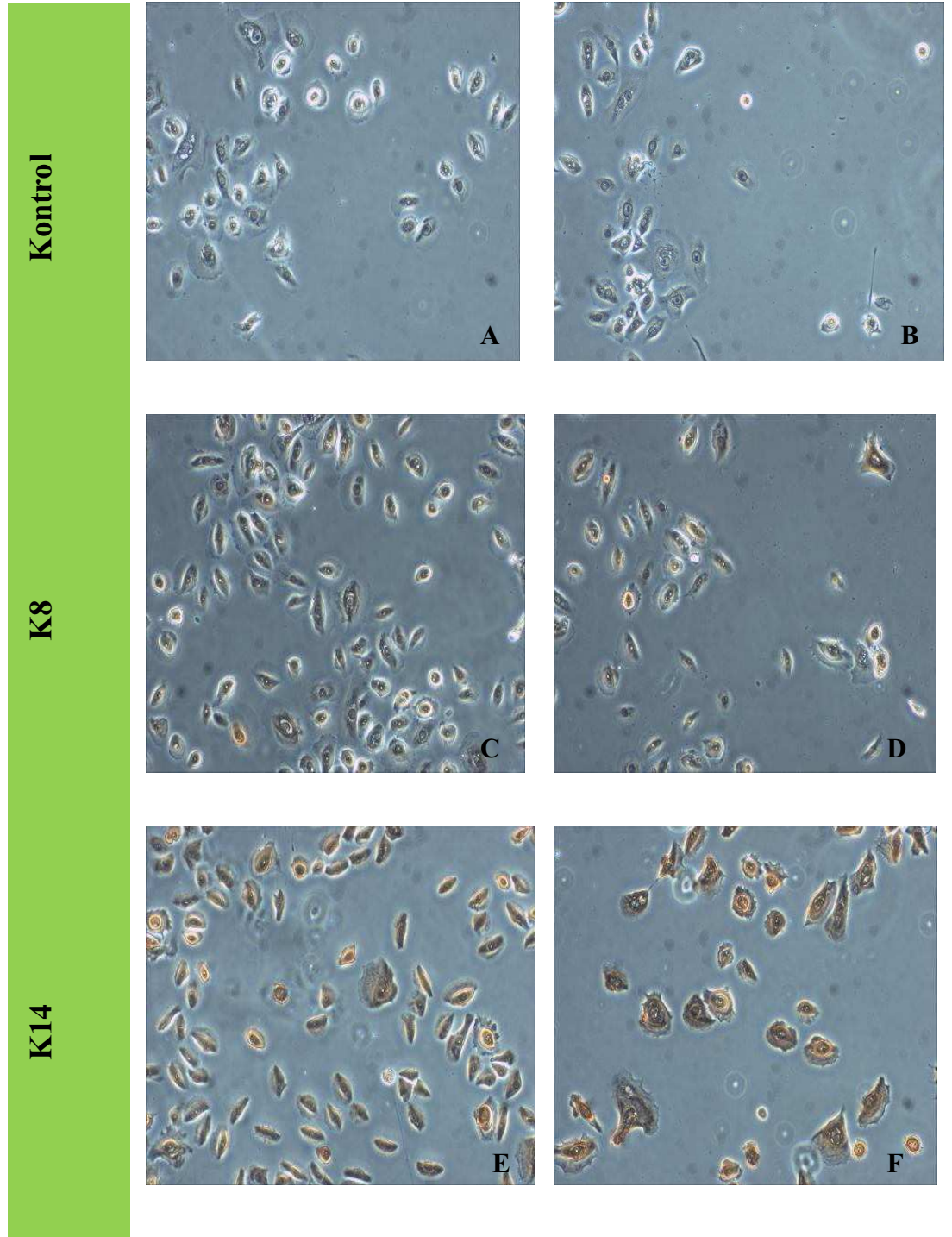
4.4.2 İEK’lerin İmmünohistokimyasal Özellikleri

İEK’ nin karakterizasyonu amacıyla immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Pasaj 2’ de bulunan İEK ler, keratinositler için spesifik sitokeratin 14 (K14) ve sitokeratin 8 (K8) monoklonal antikorları kullanılarak Mayers hematoksilin ve diaminobenzidin (DAB) ile boyandı (Şekil 4.9, 4.10).

Yapılan çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslayınca K14 bulunan gözlerin daha koyu renkte boyandığı belirlendi. Bunun sonucunda İEK lerin yüksek oranda tabakalanma belirteci K14 ve düşük oranda K8 eksprese ettiği sonucuna varıldı.



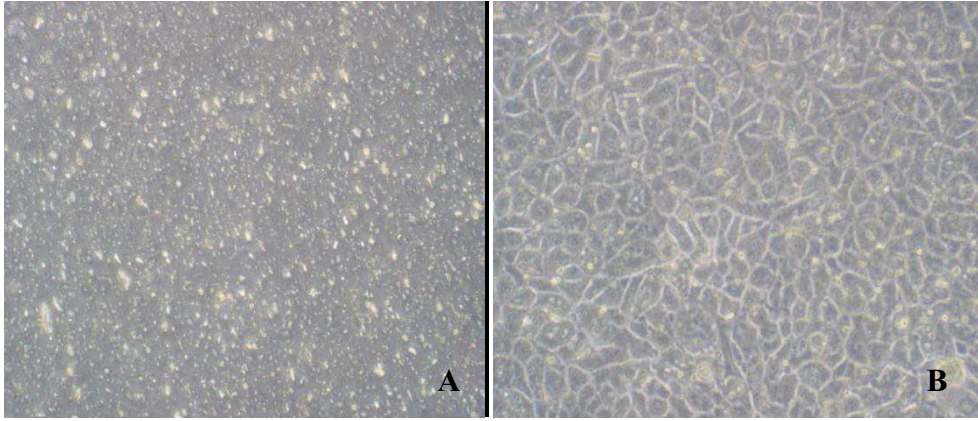
Şekil 4.9 İEK' lerin (P/2) Mayers hematoksilen Boyama görüntüsü; A-Kontrol (10x), B-Kontrol (20x), C-K8 (10x), D-K8 (20x), E-K14 (10x), F-K14 (20x) (Olympus, Japonya).



Şekil 4.10 İEK'lerin (P/2) DAB (diaminobenzidin) boyama görüntüsü; A-B; Kontrol (10x), C-D; K8 (10x), E-F; K14 (10x) (Olympus, Japonya).

4.5 İEK'nin Poröz Membranlar Üzerinde Geliştirilmesi

Epidermal kültür modeli oluşturmak amacıyla gözenekli membranların üzerine $1,5 \times 10^5$ hücre/ml sayıda keratinosit ekildi. 2-3 gün içerisinde keratinositlerin yüzeyi tamamen kapladığı, 7. günden itibaren inverted mikroskop görüntülerinde alttaki membran yapısındaki gözeneklerin görülmediği saptandı. Bu veriler doğrultusunda, kültürdeki keratinositlerin zamanla üstüste tabakalanarak alttaki membran yapısının görüntülenmesini engellediği belirlendi.



Şekil 4.11 0,4µm gözenek çaplı membran yapısı üzerine keratinositlerin ekilmesi. A- Gözenekli membranın inverted mikroskop altındaki görünümü (20x), B- Poröz membran üzerinde gelişen keratinositlerin 7.gün görüntüleri (20x) (Olympus, Japonya).

4.6 Epidermal Kültür Modelinin Histolojik Analizi

İEK leri kullanılarak oluşturulan epidermal kültür modelinin H&E boyaması yapılarak gerçekleştirilen histolojik analizinde, modeli oluşturan keratinositlerin çekirdekleri mavi-mor renkte boyandı. Boyanan hücre çekirdekleri görüntülendiğinde, keratinositlerin tabakalanarak en az 6 sıra oluşturduğu saptandı. Epidermal kültür modeli, hassas bir yapı olduğu için etrafı agar ile kaplanarak takip işlemi gerçekleştirildi. Bunun sonucunda bloklardan alınan kesitler boyandığında modelin üst kısmında bulunan *St. korneum* tabakası oluşumu görüntülenemedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Tabakalanmış epidermal kültür modelinin H&E boyaması; A- EKM (10x), B- EKM' ni çevreleyen agar yapısı ve model içerisinde bulunan keratinositlerin çekirdekleri (40x) (Olympus, Japonya).

4.6.1 Epidermal Kültür Modelinin Bariyer Fonksiyon Analizi

Triton X-100 sol. (%1) piyasada bulunan ticari modellerin onaylanması sürecinde ECVAM tarafından bariyer fonksiyon tespitinde kullanılmaktadır. Ticari epidermal modellerden EpiDerm' in bariyer fonksiyonu değerlendirilirken, triton X-100 sol. (%1) uygulanması sonucu ET_{50} değerleri 4,8- 8,7 saat arasında belirlenmiştir (OECD, 2004).

Bu bilgilerden faydalanarak, oluşturulan epidermal kültür modelinin bariyer fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla model üzerine triton X-100 sol. (%1) uygulandı. 4 ve 8 saat bekleme süresinin ardından MTT analizi gerçekleştirilerek hücre canlılığı saptandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 EKM üzerinde farklı sürelerde bekletilen Triton X-100 sol. (%1) sonrası canlılık değerleri (%)

Triton X-100 (%1)	Canlılık (%)	Süre (saat)
	32	4 saat
	21,7	8 saat

4 ve 8 saat aralığındaki bekleme süresi sonunda EKM’ndeki hücrelerin canlılığının %50 dolaylarında olması beklenirken yapılan MTT analizi sonunda %21,7 ve 32 olmak üzere daha düşük bir canlılık oranı saptandı. Bu sonuç EKM’ndeki hücrelerin %50 sinin ölümüne yol açan ET_{50} değerinin 4 saatin altında olduğunu gösterdi. EKM kullanılarak elde edilen canlılık değerleri (%) EpiDerm ile kıyaslandığında, oluşturulan epidermal modelin kimyasal maddelere karşı hassasiyetinin daha yüksek olduğu olduğu belirlendi.

4.7 EKM kullanılarak SLS’ ın İritasyon Potansiyelinin Belirlenmesi

SLS’ ın iritasyon potansiyeli belirlenirken ECVAM ve OECD tarafından kabul gören iritasyon parametreleri kullanıldı(Çizelge 4.5).

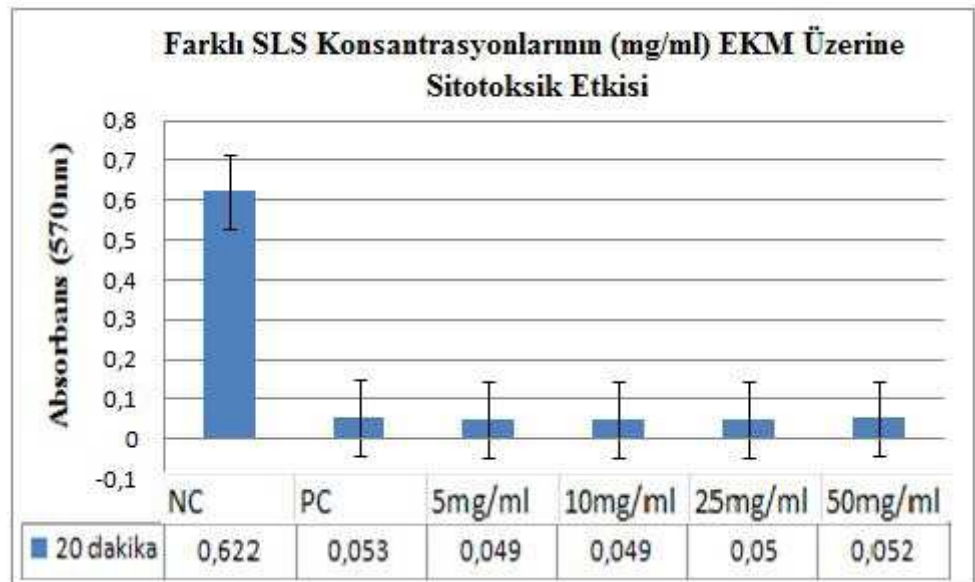
Çizelge 4.3 İritasyon parametreleri (ECVAM, 2007)

Canlılık $\leq$ %50	İritan (R38)
Canlılık $>$ %50	İritan olmayan
IL-1 α salımı $>$ 50 pg/ml	İritan
IL-1 α salımı $\leq$ 50 pg/ml	İritan olmayan

4.7.1 MTT Analizi

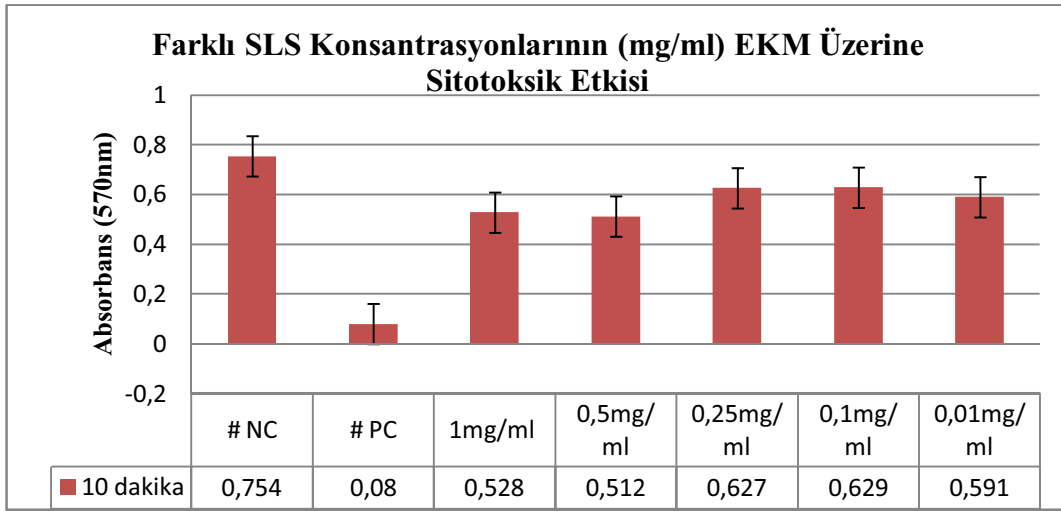
Oluşturulan epidermal kültür modeli , sodyum lauril sülfatın irritasyon potansiyelinin tespiti amacıyla kullanıldı. Çalışmada SLS' ın farklı konsantrasyonlarının (0,01mg/ml, 0,1mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml 2mg/ml, 3mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml) farklı zaman aralıklarında (10, 15, 20 dakika) yol açtığı irritasyon, hücrelerin canlılığını ortaya koyan MTT yöntemi kullanılarak test edildi. Kimyasal, oluşturulan keratinosit kültür modeli üzerine topikal olarak uygulanmasının ardından ölçülen absorbans değerleri ve karşılığı olan SLS konsantrasyonları belirlendi. . Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 'da absorbans değerlerine karşılık gelen SLS konsantrasyonları gösterilmiştir.

EKM üzerinde bekletilen 5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml SLS konsantrasyonları, 20 dakika bekleme süresi sonunda model üzerindeki hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre kaybı yaşanmasına neden oldu. Bunun sonucunda gerçekleştirilen MTT analizinde pozitif kontrole yakın absorbans değerleri elde edildi (Şekil 4.13).

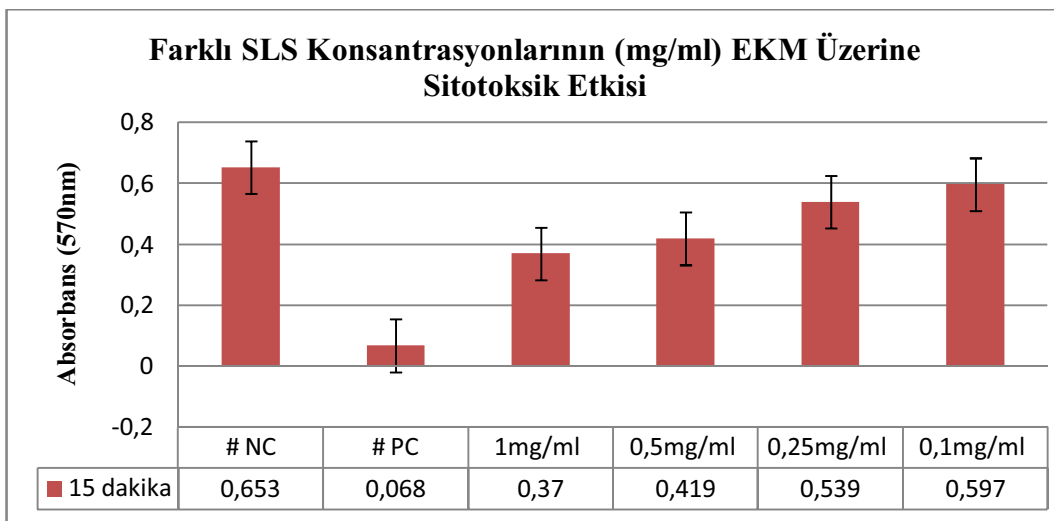


Şekil 4.13 Epidermal kültür modeli üzerinde 20 dakika bekletilen SLS konsantrasyonları (5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml) sonrasında model üzerinde MTT ile canlılık ölçümü

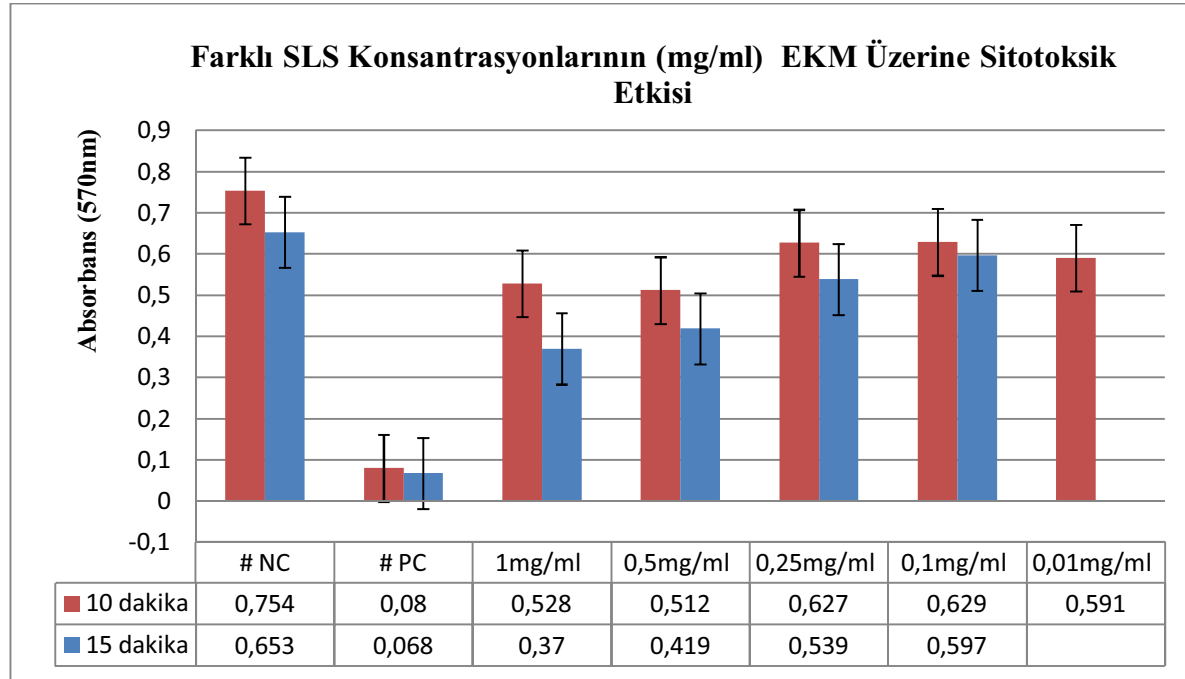
EKM üzerinde bekletilen 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml SLS konsantrasyonları, 10 dakika bekleme süresi sonunda model üzerinde sitotoksositeye sebep oldu. EKM üzerinde oluşan sitotoksitenin oranı değerlendirildiğinde, iritan bir madde konsantrasyonu saptanmadı (Şekil 4.14). Aynı SLS konsantrasyonları 15 dakika model üzerinde bekletildiğinde, sürenin uzamasına paralel olarak EKM'in canlılık oranının azaldığı belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.14 Epidermal kültür modeli üzerinde 10 dakika bekletilen SLS konsantrasyonları (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) sonrasında model üzerinde MTT ile canlılık ölçümü

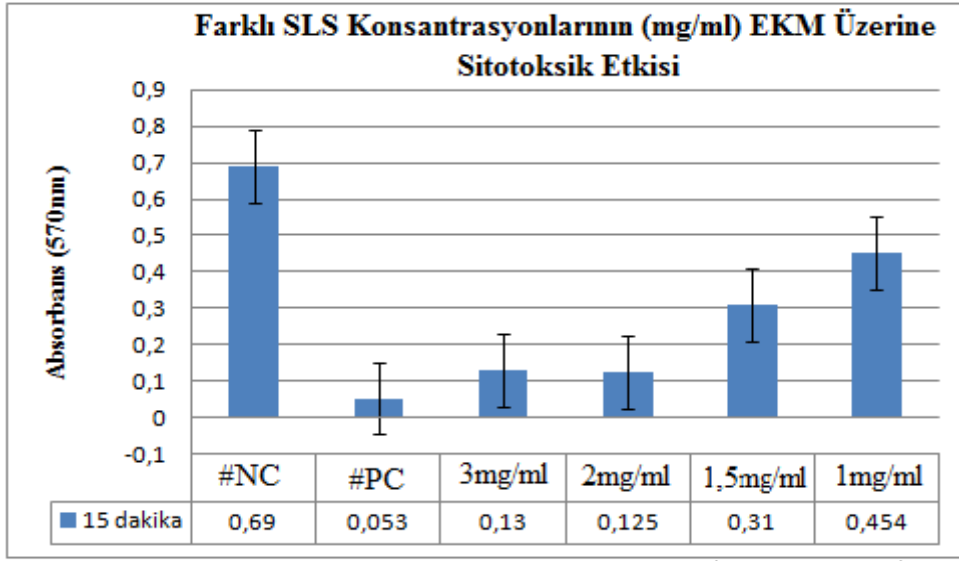


Şekil 4.15 Epidermal kültür modeli üzerinde 15 dakika bekletilen SLS konsantrasyonları (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) sonrasında model üzerinde MTT ile canlılık ölçümü



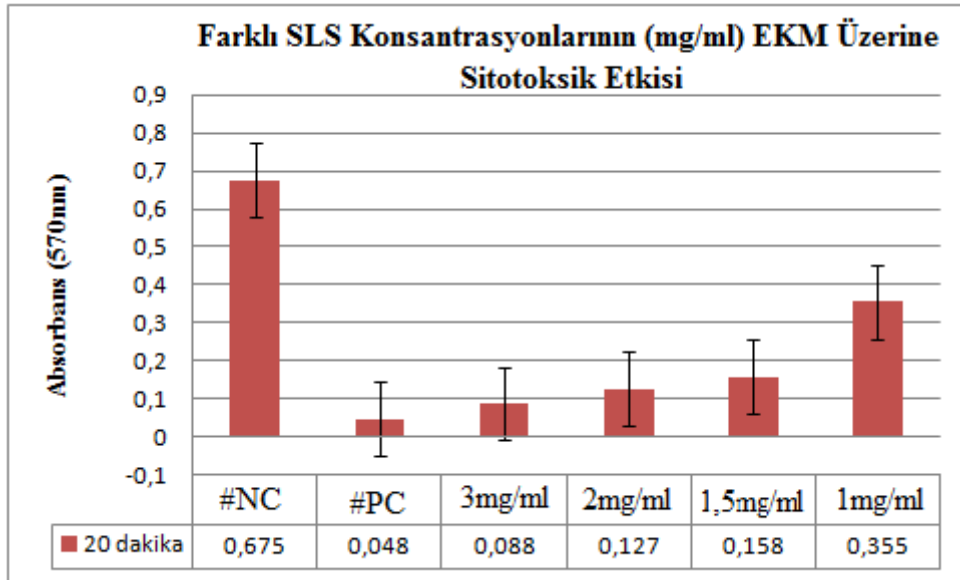
Şekil 4.16 Epidermal kültür modeli üzerinde 10 ve 15 dakika bekletilen SLS konsantrasyonlarının (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) MTT analiz sonuçlarının karşılaştırılması

EKM üzerinde bekletilen 3mg/ml, 2mg/ml, 1,5mg/ml SLS konsantrasyonlarında, 15 dakika bekleme süresi sonunda model üzerinde hücre canlılığının %50' sinin ölümüne yol açan düzeyde sitotoksosite saptandı. 1mg/ml SLS konsantrasyonunda sitotoksosite varlığı tespit edildi. Ancak veriler hesaplandığında irritasyon belirlenmedi (Şekil 4.17).

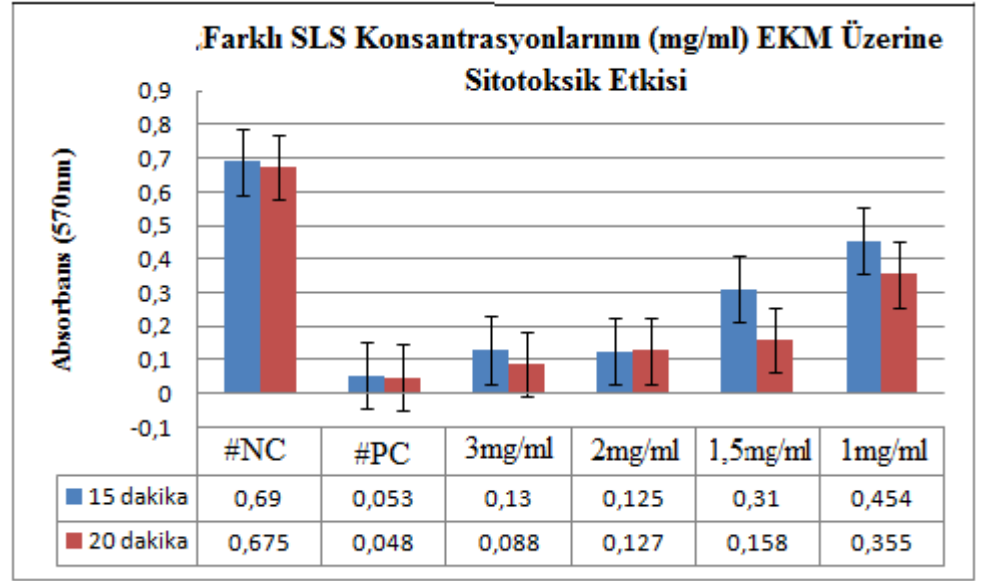


Şekil 4.17 Epidermal kültür modeli üzerinde 15 dakika bekletilen SLS konsantrasyonları (3mg/ml, 2mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml) sonrasında model üzerinde MTT ile canlılık ölçümü

Aynı SLS konsantrasyonları EKM üzerinde 20 dakika bekletildiğinde, 1mg/ml SLS konsantrasyonunun hücre canlılığının %50'sinin ölümüne yol açtığı 1mg/ml üzerindeki konsantrasyonların pozitif kontrole yakın oranlarda sitotoksisteye neden olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Epidermal kültür modeli üzerinde 20 dakika bekletilen SLS konsantrasyonları (3mg/ml, 2mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml) sonrasında model üzerinde MTT ile canlılık ölçümü



Şekil 4.19 Epidermal kültür modeli üzerinde 15 ve 20 dakika bekletilen SLS konsantrasyonlarının (3mg/ml, 2mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml) MTT analiz sonuçlarının karşılaştırılması

4.7.2 EC₅₀ / IC₅₀ ve ET₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

Gerçekleştirilen denemeler sonucu elde edilen veriler negatif kontrol ile karşılaştırılarak EKM' nin canlılık değerleri hesaplandı. Canlılığın %50' nin altına düşmesine sebep olan SLS konsantrasyonları ve süreleri (EC₅₀ / IC₅₀ ve ET₅₀) (Çizelge 4.4). Çalışmanın sonucunda EC₅₀ / IC₅₀ değeri 1mg/ml SLS; ET₅₀ değeri 20 dakika olarak hesaplandı.

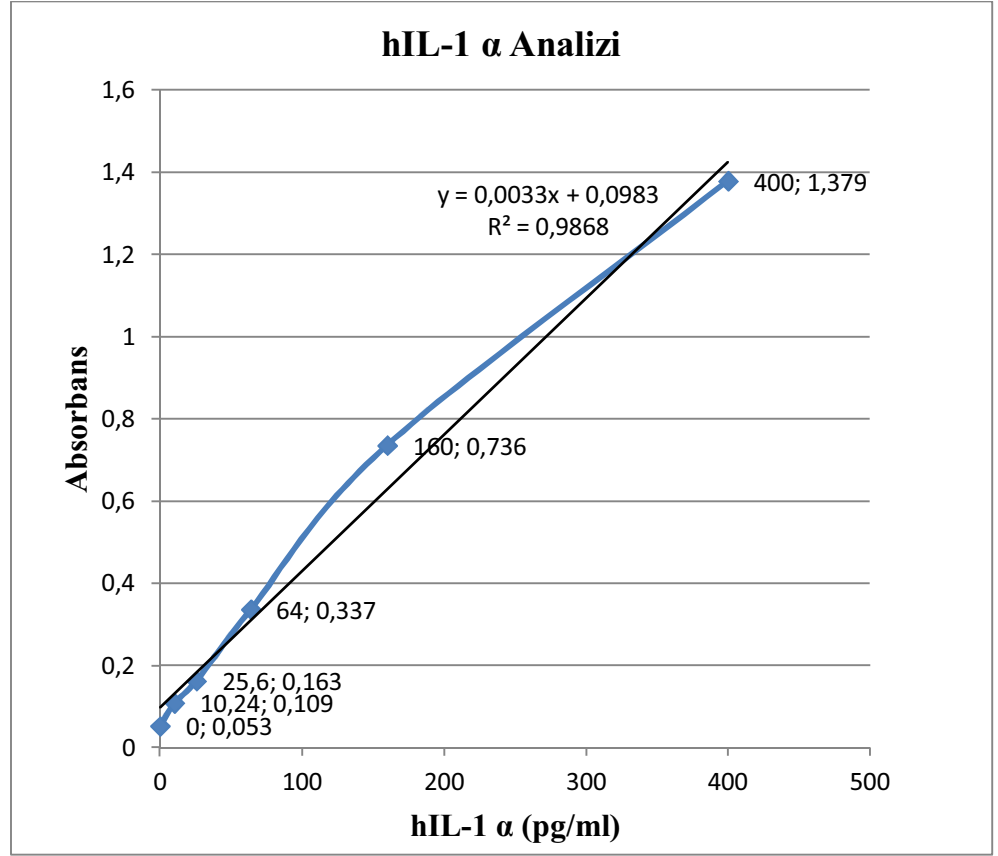
Çizelge 4.4 Farklı SLS konsantrasyonlarının EKM üzerindeki canlılık değerleri (%)

SLS			
	Konsantrasyonu (mg/ml)	Canlılık Değeri (%)	Süre (dakika)
Deneme 1	50*	8,36	20
	25*	8	20
	10*	7,88	20
	5*	7,88	20
Deneme 2	1	70,02	10
	0,5	67,9	10
	0,25	83,15	10
	0,1	83,42	10
	0,01	78,38	10
Deneme 3	1	56,66	15
	0,5	64,16	15
	0,25	82,54	15
	0,1	91,42	15
Deneme 4	3*	18,84	15
	2*	18,11	15
	1,5*	44,92	15
	1	65,79	15
Deneme 5	3*	13,03	20
	2*	18,81	20
	1,5*	23,40	20
	1	52,59	20

*canlılık değeri (%) 50'nin altında olan iritan madde konsantrasyonları

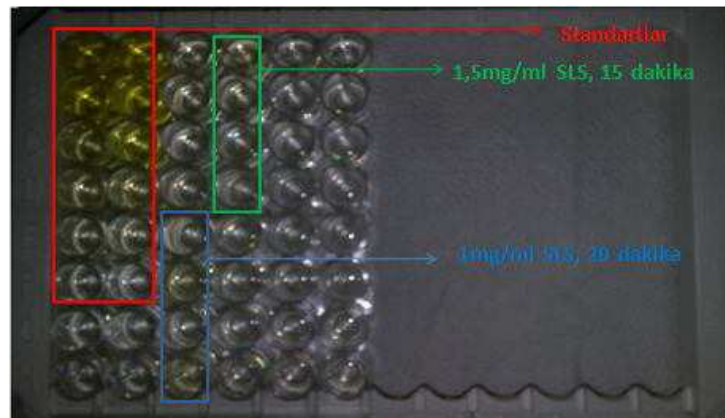
4.7.3 hIL-1 α Analizi

Çalışmada, MTT analizi sonucu canlı hücre miktarının %50'nin üzerinde olduğu 0,5mg/ml SLS konsantrasyonu ve altındaki konsantrasyonlarda iritan olarak nitelendirilecek bir IL-1 α salımı ölçülmedi. 1 mg/ml ve üzerindeki SLS konsantrasyonlarında IL-1 α salımı analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, standartların absorbansa bağlı IL-1 α salım ölçümleri kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.20). İritan kabul edilebilecek IL-1 α değeri saptanmadı.



Şekil 4.20 Örneklerin değerlendirilmesinde kullanılan ELISA kalibrasyon eğrisi; IL-1 α miktarları belli standartların absorbans değerleri (0 pg/ml;0.053, 10.24 pg/ml;0.109, 25.6 pg/ml; 0.163, 64 pg/ml;0.337, 160 pg/ml; 0.736, 400 pg/ml; 1.379) kullanılarak oluşturulmuştur.

IL-1 α salımı ölçümü sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.5 ve 4.6' da, ELISA pleytinin görünümü Şekil 4.21'de gösterildi.



Şekil 4.21 SLS'in irritasyon potansiyeli tespit edilirken IL-1 α analizinde kullanılan ELISA pleytinin görünümü

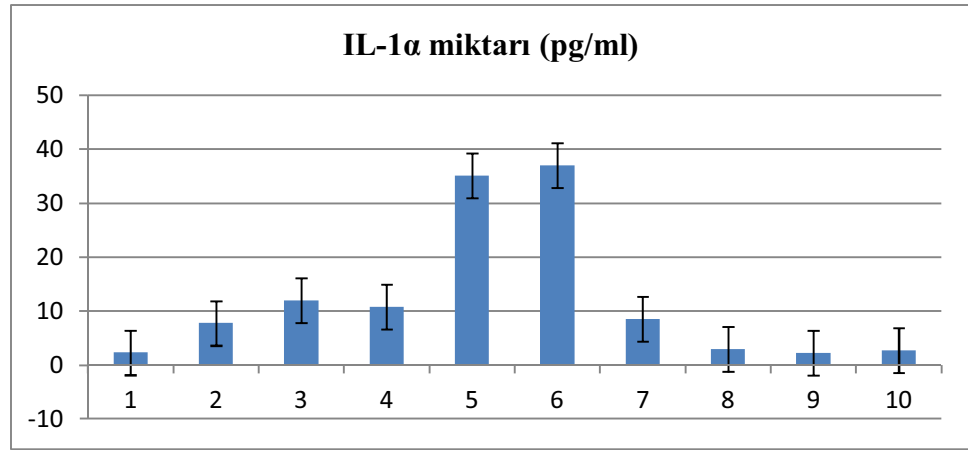
Çizelge 4.5 Farklı SLS konsantrasyonlarının EKM’nde yol açtığı IL-1 α salım ölçümü;10 ve 15 dakika zaman aralıklarında bekletilen farklı SLS konsantrasyonları sonucunda EKM’nde ELISA analizi sonucu belirlenen absorbansa bağlı insan IL-1 α salımları

		NC	PC	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	0,1mg/ml	0,01mg/ml
10 dakika	Absorbans (450nm)	0,058	0,054	0,124	0,095	0,056	0,051	0,059
	hIL-1 α (pg/ml)	0	0	7,78	0	0	0	0
15 dakika	Absorbans (450nm)	0,062	0,063	0,138	0,106	0,06	0,064	0,055
	hIL-1 α (pg/ml)	0	0	12,03	2,33	0	0	0

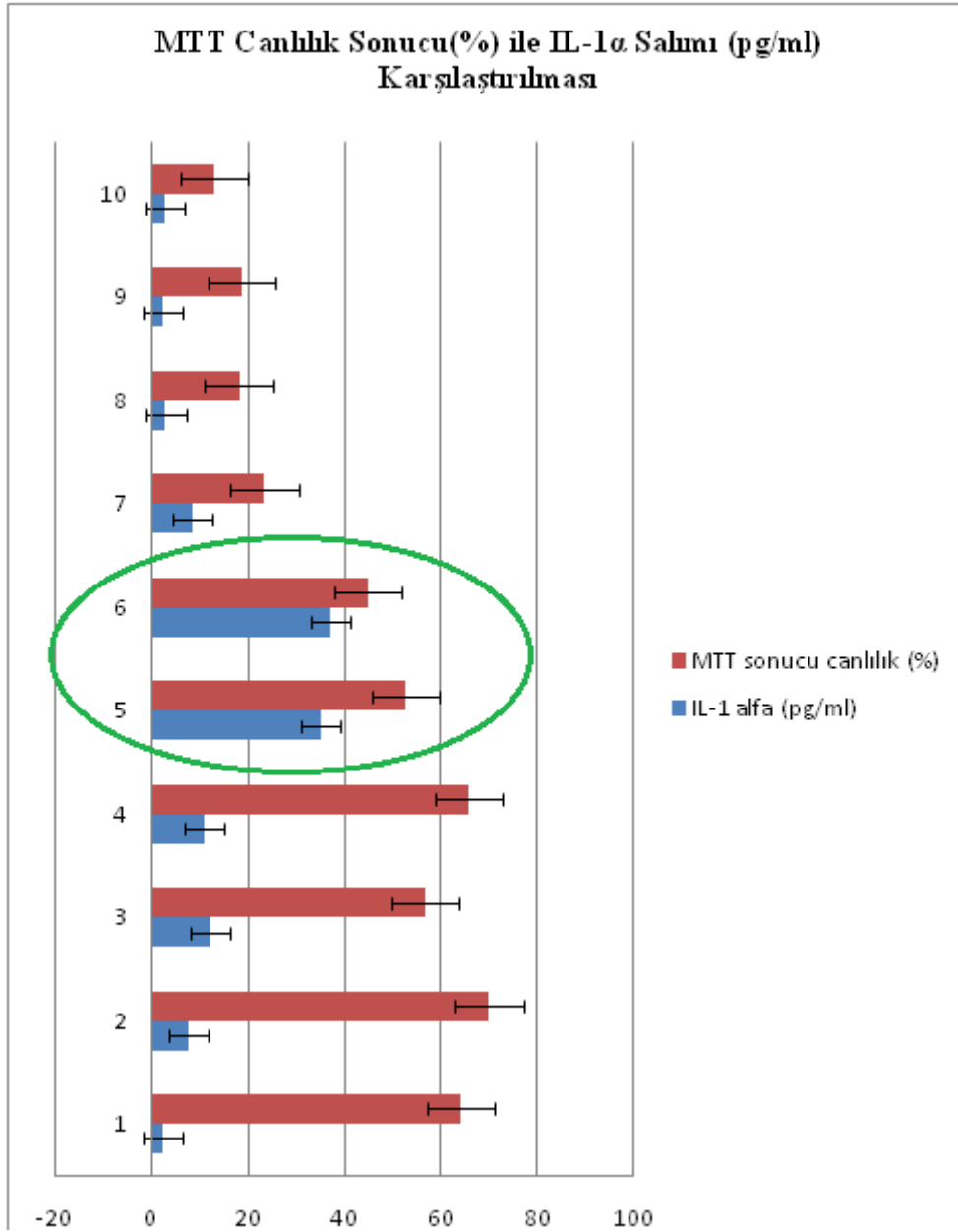
Çizelge 4.6Farklı SLS konsantrasyonlarının EKM’nde yol açtığı IL-1 α salım ölçümü;15 ve 20 dakika zaman aralıklarında bekletilen farklı SLS konsantrasyonları sonucunda EKM’nde ELISA analizi sonucu belirlenen absorbansa bağlı insan IL-1 α salımları

		NC	PC	1mg/ml	1,5mg/ml	2mg/ml	3mg/ml
15 dakika	Absorbans (450nm)	0,050	0,049	0,125	0,235	0,092	0,079
	hIL-1 α (pg/ml)	0	0	10,85	37	2,95	0
20 dakika	Absorbans (450nm)	0,045	0,051	0,227	0,116	0,089	0,091
	hIL-1 α (pg/ml)	0	0	35,09	8,6	2,23	2,71

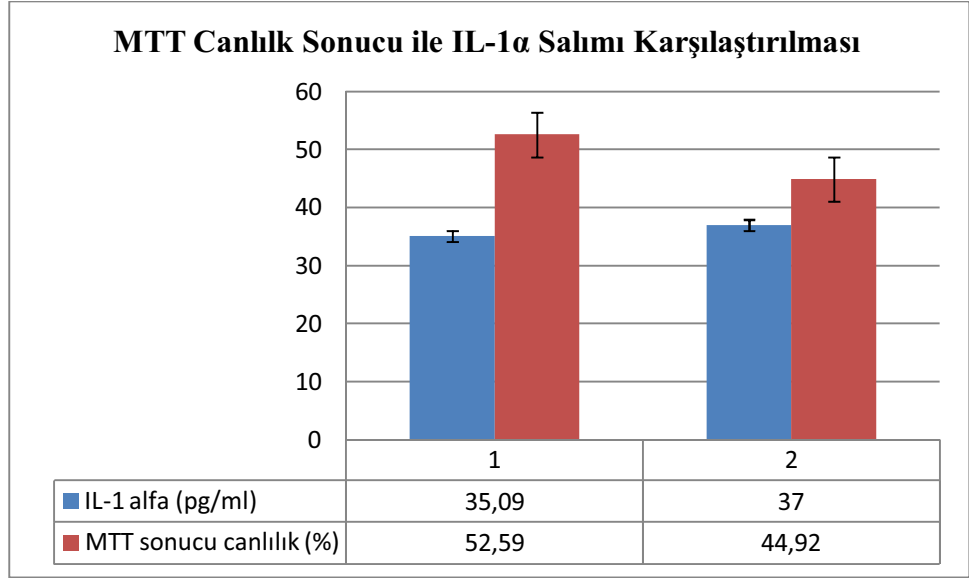
1,5mg/ml ve üzerindeki SLS konsantrasyonlarının epidermal model üzerine uygulanması ve bekleme süresi sonrasında modelin hücresel yapısında bozulmalar gözlemlendi. Epidermal model yüzeyinden ayrılan bu hücrelerin, yıkama aşamasında ortamdan elimine olmaları, 1,5mg/ml ve üzerindeki SLS konsantrasyonlarında düşük IL-1 α seviyesi ölçülmesine neden oldu. Şekil 4.22’de farklı sürelerde ve SLS konsantrasyonlarda IL-1 α salım değerleri gösterildi. Şekil 4.23 ve 4.24’te bu değerlerin MTT sonuçları ile karşılaştırılması gösterildi.



Şekil 4.22 Farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda SLS’in IL-1 α salım değerleri. 1)0,5mg/ml SLS;15dakika, 2)1mg/ml SLS;10dk., 3)1mg/ml SLS;15dk., 4) 1mg/ml SLS;15dk., 5) 1mg/ml SLS;20dk., 6) 1,5mg/ml SLS;15dk., 7) 1,5mg/ml SLS;20dk., 8) 2mg/ml SLS;15dk., 9) 2mg/ml SLS;20dk., 10) 3mg/ml SLS;20 dk.



Şekil 4.23 Farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda SLS'in IL-1 α salım değerleri ve MTT sonuçları; 1)0,5mg/ml SLS;15dakika, 2)1mg/ml SLS;10dk., 3)1mg/ml SLS;15dk., 4) 1mg/ml SLS;15dk., 5) 1mg/ml SLS;20dk., 6) 1,5mg/ml SLS;15dk., 7) 1,5mg/ml SLS;20dk., 8) 2mg/ml SLS;15dk., 9) 2mg/ml SLS;20dk., 10) 3mg/ml SLS;20 dk.



Şekil 4.24 Şekil 4.23’ teki yeşil halkanın büyütülmüş şekli; 1)1mg/ml SLS; 20dk., 2)1,5mg/ml SLS;15dk.

1mg/ml SLS; 20dk., 1,5mg/ml SLS;15dk. denemelerinde MTT analizi ile IL-1 α salım sonuçları birbirini destekler nitelikte ve anlamlıdır. Bu konsantrasyonların üzerinde EKM’ in hücre bütünlüğünün bozulması sebebiyle benzer sonuçlar elde edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Kozmetik maddelerin yol açtığı dermatolojik sorunların en başında cilt irritasyonu gelmektedir. Cilt hasarına yol açan farklı irritan kimyasalların mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve bu maddelerin tespiti için yöntemlerin geliştirilmesi kozmetoloji ve dermatolojinin ortak konusudur. Etik ve güvenlik nedenler doğrultusunda çoğu zaman irritasyon testlerinin insanlar üzerinde yapılması uygun değildir. Bu sebeple testlerin uygulanmasında deney hayvanı kullanılmaktadır. İrritasyon tespitinde uygulanan yöntemlerin başında Draize testi gelmektedir (Alepee et al., 2010). Bu test sırasında deney hayvanı acı çekmekte ve çeşitli dokuları hasara uğramaktadır. Bunun yanında deney hayvanı kullanılarak gerçekleştirilen testler sonucunda elde edilen veriler her zaman insanda meydana gelen etkiler ile uyuşmamaktadır (Borlon et al., 2007).

İrritasyonun tespiti konusunda en ümit verici alternatif test metotları yeniden yapılandırılmış insan deri modelleri oluşturularak gerçekleştirilenlerdir ki bunlar ECVAM tarafından onaylanmaktadır (Golla et al., 2009). *In vitro* epidermal modeller kullanılarak her türlü kozmetik madde içeriğini ve son ürünün sitotoksitesini belirlemek mümkündür. Yapılan çalışmalar EpiDerm gibi *in vitro* yeniden yapılandırılmış epidermal modellerin irritasyon oluşumunun belirlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir (Kojima et al., 1998; Fletcher et al., 2001,2006).

Dünya piyasasında bu amaçla kullanılan EpiDerm ve benzeri doku materyalleri, aksesurları ile birlikte “Ex – Works / FOB” ortalama 1 500 ABD doları düzeyinde satılmaktadır. Kısa süreli kullanımlı olduklarından nakliyelerinde özel tedbirler alınması gerekmektedir ve kullanım süreleri (raf ömrü) sınırlıdır. Bu durum da “fire” olasılığını artırmaktadır. Sonuç olarak, bir set (24 kullanımlık) dokunun Türkiye deki maliyeti 2 500 dolar civarında hesaplanmaktadır. Buna göre birim maliyet 100 dolar dolayındadır. Topikal uygulanan kozmetik ve ilaçların test maliyetlerini azaltabilmek için ülkemizde bu *in vitro* test modellerinin geliştirilmesini gereklidir. Bu tez projesinde oluşturulan EKM (24 kullanımlık) dünya piyasasında bulunan *in vitro* doku modellerine alternatif olabilecek düzeydedir ve 1000 ABD doları dolaylarında bir maliyettedir. Burada, testlerde kullanılacak olan MTT analizi ve IL 1- α belirleme kiti gibi

irritasyon tespiti için gerekli malzemelerin maliyet kaynakları her iki uygulamada da söz konusu olduğundan karşılaştırma dışında tutulmuştur.

Kozmetik sektöründe en yaygın kullanılan surfaktanların (yüzey aktif deterjan maddelerin) başında gelen SLS, *in vitro* test modelleri ile irritasyon mekanizmasının çalışılmasında kullanılmaktadır. Cilt İrritasyon potansiyeli belirlenmiş SLS, irritasyon çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Özellikle *in vitro* epidermal kültür modelleri oluşturulurken ve parametreleri belirlenirken tercih edilmektedir (Fletcher et al., 2006; 2001; NICNAS, 2007).

Yapılan çalışmalar EpiDerm gibi *in vitro* yeniden yapılandırılmış epidermal modellerin irritasyon oluşumunun belirlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir. *In vivo* ve *ex vivo* şartlarda gözlemlenen irritasyona yol açan madde konsantrasyonları, EpiDerm kültürlerinde daha düşük oranlarda irritasyona sebep olmaktadır (Gibbs et al., 2002). Gibbs ve ekibi (2002), farklı SLS konsantrasyonlarını topikal olarak uygulamış ve 8 saat bekleme süresi sonunda 50mg/ml SLS'in (%5 sol.) *ex vivo* şartlarda bulunan deri parçasında toksik etki gösterdiğini, buna karşın aynı süre zarfında *in vitro* EpiDerm kültüründe ise 2mg/ml SLS (%0,2 sol.) konsantrasyonun toksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Farklı SLS konsantrasyonlarının (0,01 – 20mg/ml) farklı sürelerde (30 dakika - 24 saat) EpiDerm kültür modeli üzerine uygulanması sonrasında gerçekleştirilen MTT analizi, histolojik analiz ve EC₅₀ verileri sonucu 1mg/ml SLS konsantrasyonu , toksik olmayan doz sınırı olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan tüm zaman aralıklarında 10 ve 20mg/ml SLS konsantrasyonlarının doku (Çizelge 4.6) modeli içindeki hücresel yapıları bozduğu bildirilmektedir (Fletcher and Basketter, 2006).

EpiDerm kültür modeli üzerinde uygulanan SLS konsantrasyonlarının farklı bekleme süreleri sonunda EC₅₀ değerleri; 30 dakika – 1 saat arasında > 100mg/ml, 2 saat sonunda 12.9±3mg/ml, 3saat sonunda 3.7±0.5mg/ml, 4 saat sonunda 5.2±0.6mg/ml, 24 saat sonunda 2.1±0.9mg/ml şeklinde hesaplanmıştır (Fletcher et al., 2001).

Bu çalışmada, ECVAM tarafından kabul gören ticari insan deri modellerinde uygulanan irritasyon prosedürü, oluşturulan epidermal kültür modeli kullanılarak gerçekleştirildi. Özellikle kozmetik alanda kimyasalların irritasyon potansiyelini belirlemek amacıyla kullanılan, OECD tarafından standart uygulama prosedürü belirlenmiş test optimize edildi. Oluşturulan kültür modelinin doku yapısı, bariyer fonksiyonunu histokimyasal analizler, mikroskopi teknikleri ve MTT kullanılarak ortaya kondu. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler piyasada bulunan ticari modeller ile karşılaştırıldı.

Oluşturulan EKM üzerinde farklı konsantrasyonlardaki SLS uygulanması sonucunda kritik konsantrasyon seviyesi 1mg/ml belirlendi. 1,5mg/ml üzerindeki SLS konsantrasyonlarında EKM' in hücre bütünlüğünün bozulması sebebiyle MTT sonucu düşük çıkan SLS konsantrasyonlarının uygulanması sonrasında destekleyici parametre olan IL-1 α salım değerleri düşük çıkmıştır. 15 dakika bekleme süresi sonunda 1,5mg/ml SLS ile 20 dakika bekleme süresi sonunda 1mg/ml SLS konsantrasyonu denemelerinde MTT analizi ile IL-1 α salım sonuçları birbirini destekler nitelikte ve anlamlıdır. Çalışmanın sonucunda EC₅₀ değeri 1mg/ml konsantrasyondaki SLS; ET₅₀ değeri ise 20 dakika olarak tespit edildi. EKM' nin piyasada bulunan ticari epidermal model (EpiDerm) ile karşılaştırılması sonucunda, EKM' nin test edilen edilen SLS karşısında daha hassas olduğu belirlendi.

6. SONUÇ

- Bu çalışmada, insan derisinden izole edilen epidermal keratinositleri karakterizasyon basamaklarından geçirilerek *in vitro* test modeli geliştirilmek üzere membran sistemi üzerinde tabakalandırılmıştır. Kozmetik alanda kullanılan kimyasal maddelerin irritasyon potansiyelini belirlemek amacıyla deney hayvanı kullanımına alternatif bir yöntem geliştirildi.
- Oluşturulan test modeli üzerine, hücre canlılığının % 60-70' inin ölümüne yol açan iritan kimyasal madde konsantrasyonları uygulanması sonrasında epidermal kültür modelinin doku bütünlüğü bozulmakta ve yıkama işlemi sırasında hücre kaybı yaşanmaktadır. Bunun sonucunda beklenen oranda IL-1 α salımı gerçekleşmemektedir.
- 15 dakika bekletilen 1,5mg/ml ve 20 dakika bekletilen 1mg/ml üzerindeki SLS konsantrasyonlarında irritasyon tespit edilmiş ve MTT analizi ile IL-1 α salım sonuçları birbirini destekledi.
- Oluşturulan EKM' nin piyasada bulunan ticari epidermal model (EpiDerm) ile karşılaştırılması sonucunda, EKM' nin test edilen SLS karşısında daha hassas olduğu belirlendi.
- Çalışmanın sonucunda EC₅₀ / IC₅₀ değeri 1mg/ml konsantrasyondaki SLS; ET₅₀ değeri ise 20 dakika olarak bulundu.

7. ÖNERİLER

Çalışma süresince elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

- insan dokusundan primer hücre izolasyonu sırasında doku ve çevresel faktörlerden kaynaklanan yüksek kontaminasyon riskinin bulunması ve zamanla bu kontaminasyonun kültürde açığa çıkma durumu göz önünde bulundurulduğunda karakterize edilmiş bir keratinosit hücre hattı ile test çalışmalarının sürdürülmesinin zaman ve maliyet bakımından yarar sağlayacağı,
- EKM oluşturulurken daha küçük hacimlerde çalışılmasının aynı anda daha fazla kimyasal madde konsantrasyonunun test edilmesine olanak sağlayacağı ve çalışma süresini kısaltacağı

öngörülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Alenius H., Roberts D.W., Tokura Y., Lauerma A., Patlewicz G. and Roberts M.S., 2008, Skin, drug and chemical reactions, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5 (2):211-220

Alepee N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.H., Doucet O., Pachot J., Meloni M. and Fraissinette A.B., 2010, A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthicTM RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test, *Toxicology in vitro*, 24:257-266pp.

Bell E., Ehrlich H.P., Buttle D. and Nakatsuji T., 1981, Living tissue formed in vitro and accepted as aksin equivalent tissuse of full thickness, *Science*, 211:1052-1054pp.

Bernstam L.I., Vaughan F.L. and Bernstein I.A., 1990, Stratified cornified primary cultures of human keratinocytes grown on microporous membranes at the air-liquid interface, *Journal of Dermatological Science*, 1(3):173-181pp.

Berthaud F., Narancic S. and Boncheva M., 2011, *In vitro* skin penetration of fragrances: Trapping the evaporated material can enhance the dermal absorption of volatile chemicals, *Toxicology in vitro*, 25:1399-1405pp.

Borlon C., Godard P., Eskes C., Hartung T., Zuang V. and Toussaint O., 2007, The usefulness of toxicogenomics for predicting acute skin irritation on *in vitro* reconstructed human epidermis, *Toxicology*, 241:157-166p.

Boyce S.T., Christianson, D.J. and Hansbrough J.F., 1988, Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes, *J.Biomed. Mater. Res.*, 22:939-957pp.

Boyce S.T., Supp A.P., Swope V.B. and Warden G.D., 2002, Vitamin C regulates keratinocyte viability, epidermal barrier, and basement membrane *in vitro*, and reduces wound contraction after grafting of cultured skin substitutes, *J Invest Dermatol*, 118:565-572pp.

Brisson P., 1974, Percutaneous absorption, *CMA Journal*, 18(110)1182-1185pp.

Bronaugh R.L. and Maibach H.I., 1991, From in vitro percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications, CRC Press

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cazedey E.C.L., Carvalho F.C., Fiorentino F.A.M., Gremiao M.P.D. and Salgado H.R.N., 2009, Corrositex, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45:759-766pp.

Chatterjee A., Babu R.J., Klausner M. and Singh M., 2006, In vitro and in vivo comparison of dermal irritancy of the jet fuel exposure using EpiDerm™ (EPI-200) cultured human skin and hairless rats, *Toxicology Letters*, 167:85-94pp.

Dietmar W. Hutmacher K. W. Ng, and H. L. Khor, 2005, Skin Tissue Engineering Part1, Unit 27, *CRC Press*

Draelos Z.D., 2010, Cosmetic Dermatology, Products and Procedures, *Wiley*

ECVAM Final Version , 2007, Performance Standarts for Applying Human Skin Models to In vitro Skin Irritation Testing, 25 May 2007

ECVAM, (2008-2009), Technical Report on the Status of Alternative Methods for Cosmetics Testing **ECVAM**, Invitox Protocol No:127, Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay

ECVAM, Invitox Protocol No:80, Chicken Enucleated Eye Test (CETT)/ Isolated Chicken Eye (ICE) Test

El Ghalbzouri A., Siamari R., Willemze R. and Ponc M., 2008; Leiden Reconstructed Human Epidermal Models as a Tool for The Evaluation of the Skin Corrosion and Irritation Potential According to the EVCAM Guidelines, *Toxicology In Vitro*, 22: 1311-1320

EpiDerm™ -200 Model, 2004, In vitro skin irritation test: Human skin model, Draft standart operating procedure

Eppler A.R., Kraeling M.E.K., Wickett R.R. and Bronaugh R.L., 2007, Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using *in vitro* diffusion cell techniques, *Food and Chemical Toxicology*, 45:2109-2117pp.

Eroschenko V.P., 2008, Histoloji Atlası, Fonksiyonel İlişkileriyle, *di Fiore*, 10;185-201s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fleischmajer R., Macdonald E.D., Contard P. and Perlish J.S., 1993, Immunochemistry of akeratinocyte-fibroblast co-culture model for reconstruction of human skin, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(9)1359-1366pp.

Fletcher S.T., Baker V.A., Fentem J.H., Basketter D.A. and Kelsell D.P., 2001, Gene expression analysis of EpiDerm™ following exposure to SLS using DNA microarrays, *Toxicology in vitro*, 15:393-398pp.

Fletcher S.T. and Basketter D.A., 2006, Proteomic analysis of the response of EpiDerm™ cultures to sodium lauryl sulfate, *Toxicology in vitro*, 20:975-985pp.

Freshney R.I., 2005, Culture of Animal Cells, 5th Edition, *Wiley-Liss*, USA,

Frizell L., Vaughan and Ludmila I. Bernstam, 2005, Isolation, Purification, and Cultivation of Murine and Human Keratinocytes, Methods in Molecular Biology, vol.290: Basic Cell Culture Protocols, Third Edition (Methods in Molecular Biology), *Humana Press*, Totowa

Funchs E. and Raghavan S., 2002, Getting under the skin of epidermal morphogenesis, *Nature Reviews Genetics* 3, 199-209pp.

Gautheron P., Dukik M., Alix D. and Sina J. F., 1992, Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: An *in Vitro* Assay of Ocular Irritancy, *Toxicol. Sci.*, 18 (3): 442-449pp.

Gawkrodger DJ., 2002, Dermatology, An Illustrated Colour Text. 3rd ed. *Churchill Livingstone*, Edinburgh

Gerberick G.F., Ryan C.A., Dearman R.J. and Kimber I., 2007, Local Lymph Node Assay (LLNA) for Detection of Sensitization Capacity of Chemicals, *Elsevier*, Methods 41, 54-60pp.

Gibbs S., Vietsch H., Meier U. and Ponc M., 2002, Effect of skin barrier competence on SLS and water-induced IL-1 α expression, *Experimental dermatology*, 11(3):217-223pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Golla S., Madihally S., Robinson R.L. and Gasem K.A.M., 2009, Quantitative structure-property relationships modeling of skin irritation, *Toxicology in vitro*, 23:176-184pp.

Green H., Kehinde O. and Thomas J., 1979, Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76(11):5665-5668pp.

Groeber F., Holeiter M., Hampel M., Hinderer S. and Schenke-Layland K., 2011, Skin tissue engineering- In vivo and in vitro applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, (in press)

Gumbiner B., Stevenson B. and Grimaldi A., 1988, The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex, *The Journal of Cell Biology*, 107:1575-1587pp.

Heppenheimer A., Poth A., Fautz R. and Fuchs A., 2007, Comparative evaluation of cosmetic formulations with different alternative methods for eye irritation, *AATEX 14, Special Issue*, 505-507pp.

Hoffmann S., Cole T. and Hartung T., 2005, Skin irritation: prevalence, variability, and regulatory classification of existing *in vivo* data from industrial chemicals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41:159-166pp.

Hoffmann S., Saliner A.G., Patlewicz G., Eskes C., Zuang V. and Worth A.P., 2008, A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals, *Toxicology Letters*, 180: 9-20pp.

Jennemann R., Sandhoff R., Langbein L., Kaden S., Rothermel U., Gallala H., Sandhoff K., Wiegandt H. and Gröne H.J., 2007, Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5):3083-3094pp.

Jones P., Goebel C Macfarlane. and Dufour E., 2009; A Tiered Approach to the Use of Alternatives to Animal Testing for the Safety Assessment of Cosmetics: Skin Irritation, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54: 188-196

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kandarova H., Liebsch M., Spielmann H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., Wever B. and Rosdy M., 2006, Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in vitro*, 20:547-559pp.

Kidd D.A., Johnson M. and Clements J., 2007, Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDermTM skin model, *Toxicology in vitro*, 21:1292-1297pp.

Kierszenbaum A.L., 2006, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, *Palme yayıncılık*

Knust E., 2000, Control of epithelial cell shape and polarity, *Current Opinion in Genetics & Development*, 10:471-475pp.

Knust E., 2000, Control of epithelial cell shape and polarity, *Current Opinion in Genetics & Development*, 10:471-475pp.

Kojima H., Sato A., Hanamura A., Katada T. and Konishi H., 1998, Evaluation of skin irritation in a reconstituted human dermal model (3-D model) using water insoluble fatty acids, fatty alcohols and hydrocarbons, *Altern. Animal Test Experiment*, 5: 201-210pp.

Lee W., Debasitis J.C., Lee V.K., Lee J., Fischer K., Edminster K., Park J. and Yoo S., 2009, Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication, *Biomaterials*, 30:1587-1595pp.

Li L., Margolis L.B. and Hoffman R.M., 1991, Skin toxicity determined in vitro by three-dimensional, native-state histoculture, *Medical Sciences*, 88:1908-1912pp.

Lillie J.H., MacCallum D.K. and Jepsen A., 1988, Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices: long-term culture, *The Journal of Investigative Dermatology*, 90(2):100-109pp.

Liu P.T., 2001, Extremely small sample size in some toxicity studies: an example from the rabbit eye irritation test, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33:187-191pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Luchi S., Dabelsteen S., Easley K., Rheinwald J.G. and Green H., 2005, Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells, *PNAS*, 103(6):1792-1797pp.

Luger T. A. and Schwarz, T., 1996, *Epidermal Growth Factors and Cytokines*, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong

Luger, T. A. and Schwarz, T., 1995, The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. *Allergy*, 50:292-302pp.

Maas-Szabowski N. and Fusenig N. E., 1996, Interleukin 1 induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts, *J. Invest. Dermatol*, 107:849-855pp.

Maas-Szabowski N. and Stark H. J., Fusenig N.E., 2000, Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts, *J Invest Dermatol*, 114:1075–1084Ppp.

Macfarlane M., Jones P., Goebel C., Dufour E., Rowland J., Araki D., Costabel-Farkas M., Hewitt N.J., Hibatallah J., Kirst A., McNamee P., Schellauf F. and Scheel J., 2009, A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54:188-196pp.

Maheswaran S., Speight P.M. and Hammond P., 2007, Epithelial cell behavior and organization, *Transactions on Nanobioscience*, (6):1:77-83pp.

Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C., Sok J., Asselineau D. and Bernerd F., 2006, Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin, *Journal of Investigative Dermatology*, 126:971-979pp.

Momma J., Kitajima S. and Inoue T., 1998, The guinea-pig skin sensitization test revisited: an evaluation Formula to predict possible sensitization levels for eight chemicals used in household products, *Toxicology*, 126:75-82pp.

NICNAS Australian Government Department of Health and Ageing, 2007, Existing chemical information sheet cas no: 151-21-3, Australia.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No : 404, 2002, Acute Dermal Irritation/Corrosion, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No: 402, 1987, Acute Dermal Toxicity, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No: 405, 1987, Acute Eye Irritation/Corrosions, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No: 406, 1992, Skin Sensitisation, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No: 429, 2010, Skin Sensitization. Local Lymph Node Assay, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals No: 431 2004, *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Perkins M.A., Osborne R. and Johnson G.R., 1996, Development of an *in vitro* method for skin corrosion testing, *Fundamental and Applied Toxicology*, 31:9-18pp.

Perkins M.A., Osborne R., Rana F.R., Ghassemi A. and Robinson M.K., 1999, Comparison of *in vitro* and *in vivo* human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential, *Toxicological Sciences*, 48:218-229pp.

Poniec M., 2002, Skin constructs for replacement of skin tissue for *in vitro* Testing, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:19-30pp.

Poumay Y., Dupont F., Marcoux S., Leclercq-Smekens M., Herin M. and Coquette A., 2004, A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies, *Arch Dermatol Res*, 296:203-211pp.

Rheinwald J.G. and Beckett M.A., 1981, Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblastic support cultured from human squamous cell carcinomas, *Cancer Research*, 41:1657-1663pp.

Rheinwald J.G. and Green H., 1975, Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma, *Cell*, 6:317-330pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rheinwald J.G. and Green H., 1975, Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell*, 6:331-344pp.

Rheinwald J.G. and Green H., 1977, Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature*, 265(5593)421-424pp.

Robinson M.K., Osborne R. and Perkins M.A., 1999, Strategies for the assessment of acute skin irritation potential, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 42:1-9pp.

Shikiji T., Minami M., Inoue T., Hirose K., Oura H. and Arase S., 2003, Keratinocyte can differentiate into eccrine sweat ducts *in vitro*: involvement of epidermal growth factor and fetal bovine serum, *Journal of Dermatological Science*, 33:141-150pp.

Simonsen L., Petersen M.B. and Groth L., 2002, *In vivo* skin penetration of salicylic compounds in hairless rats, *Pharmaceutical Sciences*, 17:95-104pp.

Smola H., Thiekötter G. and Fusenig N.E., 1993, Mutual induction of cell growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction, *Journal of Cell Biology*, 122:417-429pp.

Sobral C.S., Gragnani A., Cao X., Morgan J.R. and Ferreira L.M., 2007, Human keratinocytes cultured on collagen matrix used as an experimental burn model, *Journal of Burns and Wounds*, 7:53-59pp.

Spiekstra S.W., Santos G.G., Scheper R.J. and Gibbs S., 2009, Potential method to determine irritant potency *in vitro* – Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency, *Toxicology in Vitro*, 23: 349-355p.

Spiekstra S.W., Toebak M.J., Sampat-Sardjoeppersad S., van Beek P.J., Boorsma D.M., Stoof T.J., von Blomberg B.M.E., Scheper R.J., Bruynzeel D.P., Rustemeyer T. and Gibbs S., 2005, Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure, *Experimental Dermatology*, 14:109-116p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sun T., Jackson S., Haycock J.W. and MacNeil S., 2006, Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents, *Journal of Biotechnology*, 122:372-381pp.

Tornier C., Amsellem C., Fraissinette A.B. and Alepee N., 2010, Assessment of the optimized SkinEthicTM Reconstructed Human Epidermis (RHE) 42 bis skin irritation protocol over 39 test substances, *Toxicology in vitro*, 24:245-256pp.

Tuan T., Keller L., Sun D., Nimni M.E. and Cheung D., 1994, Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels, *Journal of Cell Science*, 107: 2285-2289pp.

Tuncer I. D., 2006, New Tools and Approaches for Predicting Skin Permeability, *Drug Discovery Today*, 11, (11/12): 517-523pp.

Uchino T., Takezawa T. and Ikarashi Y., 2009, Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane, *Toxicology in vitro*, 23: 333-337pp.

Ura H., Takeda F. and Okochi H., 2004, An in vitro outgrowth culture system for normal human keratinocytes, *Journal of Dermatological Science*, 35:19-28pp.

Victor P. Eroschenko., 2008, di Fiore, Histoloji Atlası,Fonksiyonel İlişkileriyle,şehir Bölüm 10- Deri, 185-201s.

Wang C.S., Goulet F., Tremblay N., Germain L., Auger F. and Tetu B., 2001, Selective culture of epithelial cells from primary breast carcinomas using irradiated 3T3 cells as feeder layer, *Pathology Research and Practice*, 197:175-181pp.

Welss T., Basketter D.A. and Schröder K.R., 2004, In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicology in vitro*, 18:231-24300.

WHO; World Health Organisation, Environmental Health Criteria 235

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wilhelmus K.R., 2001 The Draize Eye Test, *Survey of Ophthalmology*, 45:493-515pp.

Yourick J.J., Jung C.T. and Bronaugh R.L., 2008, In vitro and in vivo percutaneous absorption of retinol from cosmetic formulations: Significance of the skin reservoir and prediction of systemic absorption, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231: 117-121pp.

Zöller N.N., Kippenberger S., Thaçi D., Mewes K., Spiegel M., Sattler A., Schultz M., Bereiter-Hahn J., Kaufmann R. and Bernd A., 2008, Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model, *Toxicology in vitro*, 22:747-759pp.

S. YELİZ TUĞRUL

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir, 13/01/1984

Email: seliz_tug@yahoo.com

Tel: +90 505 456 46 77

EĞİTİM

(2008 -) Yüksek Lisans Eğitimi; Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir

(2002- 2007) Lisans Eğitimi; Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

(1998-2002) Lise; Bornova Anadolu Lisesi, Almanca Bölümü

KATILDIĞI KONGRE, SEMPOZYUM ve KURSLAR

Biotech METU 2009, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 27-30 Eylül 2009 (Tübitak kongre katılım bursu)

Vth International Bioengineering Congress, Tepekule, İzmir, 16-19 Haziran 2010

The 4th International Student Conference on Advanced Science and Technology, ICAST 2010, Ege Üniversitesi, İzmir, 25-26 Mayıs 2010

Flow Cytometry and Confocal Cytometry; As New Cellular Pharmacology Tool, Ege Üniversitesi, İzmir, 1-2 Ekim 2009

Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi, İzmir,
7 Mart 2008

KURS ve SERTİFİKALAR

III. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Mikroskopik Uygulamaları Kursu,
KOU- KöK Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli,
13-17 Ekim,2008

Uygulamalı Flow Sitometri Kursu, KOU- KöK Hücre ve Gen Tedavileri
Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli, 17 Ekim,2008

Uygulamalı Konfokal Mikroskop Kursu, KOU- KöK Hücre ve Gen
Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli, 16 Ekim,2008

Deney Hayvanı Kullanımı Sertifika Kursu, Ege Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, İzmir,

Temel Hücre Kültürü ve Kök Hücre Teknikleri Kursu, Ege Üniversitesi,
Biyomühendislik Bölümü, İzmir, 12-16 Ekim 2009