TÜBİTAK MAM

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
MARMARA ARAŞTIRMA MERKEZİ
GEN MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

TÜRKAK Test TS EN ISO/IEC 17025 AB-0378-T

AB-0378-T
6484
09-21

TEST/ANALİZ/ÖLÇÜM RAPORU

(Endüstriyel Teknik Destek Hizmeti)

Rapor no : 16563500-125.05- 127 / **6484**

Rapor tarihi : **29.09.2021**

Talep eden : TEDOB PRODÜKSİYON SAĞLIK VE GIDA SAN. TİC. LTD. ŞTİ
Adres : ZÜHTÜPAŞA MH. KÖRDERE SK. SERDAR APT. NO:19/1 KADIKÖY/İSTANBUL

Konusu : BİYOUYUMLULUK TESTLERİ KAPSAMINDA "VAKUM BELL" ÜRÜNÜ İÇİN GERÇEKLEŞTİRİLEN SİTOTOKSİSİTE(*), İRİTASYON(*) VE SENSİTİZASYON(*) TESTİ

Bu raporda yer alan sonuçlar, sadece incelenen numunelere aittir.

Onaylayan

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL
GMBE Endüstriyel Hizmetler Sorumlusu

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz. Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçersizdir.**Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü TÜRKAK'tan AB-0378-T ile TS EN ISO/IEC 17025:2017 Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel gereklilikler standardına göre akredite edilmiştir. Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) deney raporlarının tanınırlığı konusunda Avrupa Akreditasyon Birliği (EA) ve Uluslararası Laboratuar Akreditasyon Birliği (ILAC) ile Karşılıklı Tanınma Anlaşması'nı imzalamıştır.**
Deney ve/veya ölçüm sonuçları, genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri (olması halinde)ve deney metodları bu sertifikanın tamamlayıcı kısmı olan takip eden sayfalarda verilmiştir.

K - Q TSE-ISO-EN 9000 TSE-ISO-EN 14000

Rapor no : 16563500-125.05- 127 / **6484**
Talep eden : TEDOB PRODÜKSİYON SAĞLIK VE GIDA SAN. TİC. LTD. ŞTİ
Talep edenin adresi : ZÜHTÜPAŞA MH. KÖRDERE SK. SERDAR APT. NO:19/1 KADIKÖY/İSTANBUL

Örnek	: Tek tip numune	**Son kullanım tarihi**	: --
Örnek sayısı	: 10 adet	**Enstitü örnek kayıt no**	: 21/81-GMBE
Örneğin getiriliş şekli	:Kargo	**Kabul tarihi ve saati**	: 18/08/2021
Kabul anındaki durumu	: Kapalı orijinal ambalaj içinde steril koşullarda temin edilmiştir.	**Analiz tarihi**	: 09.08.2021- 20.09.2021

Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye iade ( ) Şahit numune mevcut ( ) Şahit numune alınmamıştır

1- Örnekler

TEDOB PRODÜKSİYON SAĞLIK VE GIDA SAN. TİC. LTD. ŞTİ.'nin 18/08/2021 tarih ve 3989 sayılı başvurusuyla sitotoksisite(*), iritasyon(*), sensitizasyon(*), testi yapılmak üzere 10 adet numune üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1: Testi gerçekleştirilen ürünlerin özellikleri

Örnek	Özellik	Adet
Vakum Bell		10

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar: 53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.

Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.

İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

2- Deri İçi İritasyon Testi (*)

Deri içi iritasyon testi "ISO 10993-10: 2010 Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity" uluslar arası protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında, "ISO 10993-2: 2006 Animal Welfare Requirements" ve "ISO-10993-12: 2012 Sample Preparation and Reference Materials" standartları da dikkate alınmıştır.

2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Standart protokolde önerildiği üzere deney hayvanı olarak 8-12 haftalık (ağırlıkları arasındaki fark ± 20%'den az) ve 2 kg'dan az olmayan 3 adet dişi Yeni Zelanda albino tavşanı kullanılmıştır. Deneyde kullanılan tavşanlar tesadüfen seçilerek tek tek işaretlenip uygulamadan 24 saat önce ayrı kafeslere alınmıştır. Uygulamaya alınmadan önce deney hayvanlarında herhangi bir deformasyon olup olmadığı ve genel sağlık durumları kontrol edilmiştir.

Barınma koşulları oda sıcaklığı 22°C (± 3°C), nem 30% - 70% arasında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Beslenme için normal laboratuvar diyeti ve sınırsız su sağlanmıştır. Deneyde kullanılan tavşanlar test süresince ayrı kafeslerde tutulmuştur.

2.2. Numunelerin Hazırlanması

ISO 10993-12: 2012 başlıklı belgede belirtildiği üzere doğrudan uygulanmayacak numuneler için önerilen ekstraksiyon protokolü tatbik edilmiştir. Bunun için ürünün, form ve yapısına uygun olarak 0,2 gr/ml ağırlık/hacim oranı uygulanmış olup 37°C'de 72 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Polar çözücü olarak PBS (phosphate buffer saline) ve non-polar çözücü olarak pamuk yağı (cotton oil) kullanılmıştır. Ekstraktlarda partikül, çökelti gibi oluşumlar gözlenmemiş olup santrifüj ve filtreleme gibi işlemler uygulanmamıştır. Ekstraktlar bekletilmeden doğrudan testte kullanılmıştır.

2.3. Uygulama Protokolü

Deney hayvanları yeteri uygulama alanı sağlanacak kadar traş edildikten sonra örnekler Şekil 1'de gösterildiği gibi intradermal enjeksiyonla uygulanmıştır. Her test bölgesinde 5 farklı noktaya toplam 0,2 ml madde tatbik edilmiştir. Yine Şekil 1'de görüldüğü üzere 2 no'lu bölgeye polar ekstrakt, 4 no'lu bölgeye non-polar ekstrakt, 3 no'lu bölgeye polar çözücü kontrol ve 5 no'lu bölgeye non-polar çözücü kontrol uygulanmıştır. Enjeksiyon alanlarının çevresi işaretlenerek belirlenmiştir. Uygulamayı takiben 24, 48 ve 72' nci saatlerde her enjeksiyon bölgesi gözlenerek Tablo 2'de belirtilen kriterlere göre değerlendirilerek skorlanmıştır.

2.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Test edilen numune ve kontroller için *skor değeri* hesaplanırken her gözlem zamanı için elde edilen kızarıklık ve ödem değerleri toplanıp 15'e (3 gözlem zamanı X 5 gözlem bölgesi) bölünür. Test ve kontroller için *genel ortalama skor*, elde edilen skor değerinin hayvan sayısına yani 3'e bölünmesiyle elde edilir. *Son test örneği skoru* ise eğer kontrol için bir değer elde edilmiş ise bu değerin test örneği için elde edilen skordan çıkarılması ile elde edilir.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

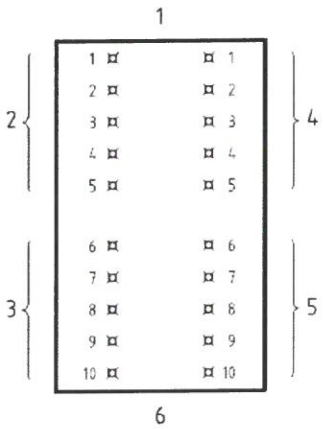
Sorumlu İmzalar: 53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

Eğer herhangi bir gözlem periyodunda test örneklerine ait ortalama reaksiyon derecesi şüphe uyandıracak şekilde kontrol örneklerinin ortalama reaksiyon derecesinden yüksek ise test 3 ilave tavşan kullanılarak tekrar edilir.



Şekil 1. 1; deney hayvanının baş tarafı, 2; test bölgesi, 3; negatif kontrol bölgesi, 4; test bölgesi, 5; pozitif kontrol bölgesi, 6; deney hayvanının kuyruk tarafı.

Reaksiyon	Skor
Kızarıklık ve skar formasyonu	
Kızarıklık yok	0
Çok hafif kızarıklık (zorlukla fark edilir)	1
Fark edilir derecede kızarıklık	2
Orta derece kızarıklık	3
Ciddi derecede kızarıklık ve skar formasyonu	4
Ödem	
Ödem yok	0
Çok hafif ödem (zorlukla fark edilir)	1
Fark edilir derecede ödem	2
Orta derece ödem (yaklaşık 1 mm)	3
Ciddi derecede ödem (1 mm'den büyük)	4
İritasyon için olabilecek toplam skor	8
Deride gözlemlenebilecek istenmeyen diğer değişiklikler de kaydedilmeli ve raporlanmalıdır.	

Tablo 2. Değerlendirme kriterleri ve puanlama.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53192 53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

2.5. Gözlem Sonuçları

Elde edilen tüm gözlem puanları ve genel ortalama skorları Kısım 2. 4'de açıklandığı şekilde hesaplanarak sırasıyla Tablo 3 ve 4'de sunulmuştur.

ID	Örnekler	Bölge	Skor
1	*Vakum Bell (polar)*	*Sol Ön Bölge*	0
	Vakum Bell (non-polar)	*Sağ Ön Bölge*	0
	Polar Çözücü Kontrol	*Sol Arka Bölge*	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	*Sağ Arka Bölge*	0
2	*Vakum Bell (polar)*	*Sol Ön Bölge*	0
	Vakum Bell (non-polar)	*Sağ Ön Bölge*	0
	Polar Çözücü Kontrol	*Sol Arka Bölge*	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	*Sağ Arka Bölge*	0
3	*Vakum Bell (polar)*	*Sol Ön Bölge*	0
	Vakum Bell (non-polar)	*Sağ Ön Bölge*	0
	Polar Çözücü Kontrol	*Sol Arka Bölge*	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	*Sağ Arka Bölge*	0

Tablo 3. Değerlendirme sonuçları.

Örnekler	Bölge	Genel Ortalama Skor	Son Test Örneği Skoru
Vakum Bell (polar)	*Sol Ön Bölge*	0	0
Vakum Bell (non-polar)	*Sağ Ön Bölge*	0	0
Polar Çözücü Kontrol	*Sol Arka Bölge*	0	-
Non-polar Çözücü Kontrol	*Sağ Arka Bölge*	0	-

Tablo 4. Genel ortalama skor değerleri.

Açıklamalar: Ürünü tanımlayan bilgiler firma tarafından beyan edilmiştir.

Sorumlu İmzalar: ~~53006~~

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

2.6. Sonuç

Test materyali için ifade edildiği üzere iki farklı kriter için üç farklı gözlem gerçekleştirildikten sonra (Tablo 3) elde edilen değerlerin ortalaması alınarak genel ortalama skor elde edilmiştir (Tablo 4). Test edilen örnekler için yapılan gözlemler ve elde edilen skor değerleri doğrultusunda, ISO 10993-10: 2010 belgesinde belirtilen protokol ve değerlendirme kriterlerine göre test edilen ürünün **deri içi iritan (tahriş edici) özelliğe sahip olmadığı tespit edilmiştir**.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

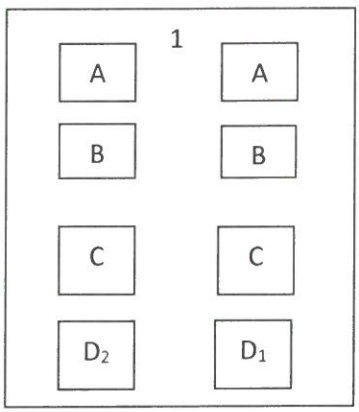
P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

3- Cilt Sensitizasyon Testi (*)

Sensitizasyon testi "ISO 10993-10: 2010 Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity" standart protokolü dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Ürün doğrudan testte kullanılmıştır. Sensitizasyon testi 300-500 gr arası guinea pig (*Cavia porcellus*) soyuna ait erişkin hamile olmayan ve emzirmeyen dişi kobaylar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ISO 10993-10: 2010 başlıklı belgede belirtildiği üzere test edilecek materyal deri altına 0,1 ml miktarda muamele edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamadan sonraki 7. gün elde edilen gözlemler neticesinde intraskapular bölgeye öncelikle %10'luk SDS tatbik edilmiştir. Bunun ardından 24 saat sonra topikal indüksiyon fazı gerçekleştirilmiştir. Topikal indüksiyon fazı başlangıcından 14 gün sonra indüksiyon fazında kullanılmayan bir bölge kullanılmak üzere challenge fazı gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra uygulama bölgeleri gözlenerek değerlendirmede bulunulmuştur. Bunun için deney hayvanları üzerinde tatbik edilen uygulama planı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.

1- Deney hayvanının baş tarafı.

A- Freund's Complete Anjuvant (FCA) ve serum fizyolojik çözeltisi 50:50 oranında karıştırılarak muamele edilen test bölgeleri.

B- Sadece test materyali ile muamele edilen test bölgeleri.

C- A bölgesinde uygulanan örnek ile B bölgesinde uygulanan test metaryelinin 50:50 oranında karıştırılarak muamele edilen test bölgeleri.

D- Topikal uygulaması intraskapular bölge ye 0.3 ml olmak üzere test materyali yapılmıştır.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

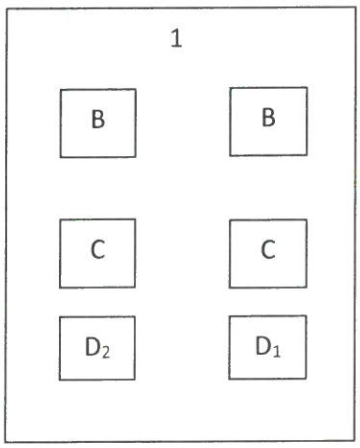
Bu rapor 13 sayfa olup, 2 asıl (1 asıl müşteriye, 1 asıl Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

A,B,C bölgelerine yapılan uygulamalar her bir hayvana sağ ve sol bölgelere olmak üzere bir çift 0,1 ml'lik enjeksiyon yapılmıştır.
D bölgesinde ise 7. günde sol bölgeye (D_1) 21. günde ise sağ topikal bölgeye (D_2) uygulama yapılmıştır.

Negatif Kontrol
Negatif kontrol 2 farklı bölgede 2 farklı uygulamada karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3.
1- Deney hayvanının baş tarafı.
B- Serum Fizyolojik 0,1 ml.
C- (FCA) ve serum fizyolojik çözeltisi 50:50 oranında karıştırılarak uygulanmıştır.
D- Topikal bölgelere 0.3 ml serum fizyolojik uygulanmıştır.

Deney hayvanlarında yeterli uygulama alanı sağlanacak şekilde traş edildikten bir gün sonra test materyalleri Şekil 2'de gösterildiği gibi, kontrol hayvanlarında ise Şekil 3'de gösterildiği gibi uygulanmıştır. Tüm uygulamalar deri altına 0.1 ml olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası bölgeler herhangi bir şekilde kapatılmamıştır. Topikal uygulama da ise deney hayvanlarında test materyali, kontrol hayvanlarında ise 0.3 ml serum fizyolojik deri üzerine uygulanmış olup, uygulama sonrası bölge steril gazlı bez ile kapatılmış ve tüm uygulama alanları elastik bandaj ile sarılmıştır. Gazlı bezlerin bölgeye 48 saat süre teması sağlanmıştır. Uygulama süresi sonunda bandajlar açılmış ve deri üzerinde oluşan reaksiyonlar not edilmiştir. İkinci topikal uygulama bundan 14 gün sonra gerçekleştirilmiş olup aynı deneysel işlemler takip edilmiştir.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

Uygulanan test materyali
Uygulamada test materyali için 20 adet, kontrol için 5 adet hayvan kullanılmıştır. Bir adet test materyali olduğu için bu testte toplam 25 adet hayvan kullanılmıştır.

Test Materyali: Vakum Bell

Reaksiyon	Sınıflandırma Skalası
Gözle görülür bir değişim yok	0
Belirli ya da yamalı kızarıklık	1
Orta veya konfluent kızarıklık	2
Yoğun kızarıklık ve kabarma oluşumu	3

Tablo 5. Değerlendirme kriterleri ve puanlama.

Deney Grupları	ID	24. saat	48. saat	Ortalama	Grup Ortalaması	Skor
Erkek Test	1	0	0	0	0,4	0,4
	2	0	1	0,5		
	3	1	0	0,5		
	4	1	0	0,5		
	5	1	0	0,5		
Dişi Test	1	1	0	0,5	0,4	
	2	1	0	0,5		
	3	1	1	1		
	4	0	0	0		
	5	0	0	0		
Negatif Kontrol	1	0	0	0	0,4	0,4
	2	1	0	0,5		
	3	1	0	0,5		
	4	1	0	0,5		
	5	1	0	0,5		

Tablo 6. Polar ektsrakt için elde edilen skor değerleri.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

Deney Grupları	ID	Topical Induction Phase	Challenge Phase	Ortalama	Grup Ortalaması	Skor
Erkek Test	1	0	0	0	0,4	0,4
	2	0	0	0		
	3	1	1	1		
	4	1	0	0,5		
	5	1	0	0,5		
Dişi Test	1	0	0	0	0,4	
	2	0	1	0,5		
	3	1	1	1		
	4	0	1	0,5		
	5	0	0	0		
Negatif Kontrol	1	0	0	0	0,4	0,4
	2	1	0	0,5		
	3	1	0	0,5		
	4	0	1	0,5		
	5	1	0	0,5		

Tablo 7. Apolar ektsrakt için elde edilen skor değerleri.

Değerlendirme Ortalama

Örnekler	Sonuç
Vakum Bell	0,4
Negatif Kontrol Uygulaması	0,4

Tablo 8. Ortalama skor değerleri.

Sonuç

Test ve kontrol numuneleri için gerçekleştirilen deneyde ifade edildiği üzere Tablo 5'deki değerlendirme ve puanlama kriterleri göz önünde alınarak gözlemler skorlanmıştır. Yapılan değerlendirmede "Vakum Bell" ekstraktı uygulanan gruptaki hayvanların derilerinde herhangi bir yamalı kızarıklıklara rastlanmamıştır. Gözle görülür derecede herhangi başka bir değişiklik de gözlenmemiştir. Yapılan gözlemler neticesinde sensitizasyon skoru olarak 0,4 büyüklüğünde (Tablo 8) bir değer elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, ISO 10993-10: 2010 belgesinde belirtilen protokol ve değerlendirme kriterlerine göre test edilen materyalin **sensitif (maddeye duyarlı) özelliğe sahip olmadığı** tespit edilmiştir.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar:

53006

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

4- Sitotoksisite Testi (*)
Medikal ürünlerin biyolojik değerlendirmesi: ISO 10993-5 "İn Vitro Sitotoksisite Testi" ve ISO 10993-12 "Örnek Hazırlama ve Referans Materyaller" standartları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Testin başlama tarihi: 06.09.2021

Testin bitiş tarihi: 10.09.2021

Örneğin tanımlanması: "Vakum Bell" örneğinin özellikleri madde 1'de açıklandığı gibidir. Örnekler "TEDOB PRODÜKSİYON SAĞLIK VE GIDA SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ." firması tarafından temin edilmiştir.

Kullanılan hücre soyu ve nedeninin açıklaması: Fare fibroblast hücre soyu, L929 (NCTC clone 929) kullanılmıştır. ISO 10993-5 tarafından tavsiye edilen hücre soylarından biri olduğu için ve memeli sistemini temsil etmeye uygunluğu dolayısı ile seçilmiştir.

Kullanılan besi yerinin temin edildiği firmanın adı, parti numarası, eklenilen serum ve antibiyotikler: Besi yeri olarak Minimum Essential Medium (MEM, Sigma Cat # D0547, lot # SLBH5487) ve katkı maddeleri %10 Fetal bovin serum (FBS, heat inactivated, Gibco, #10500-064) + 1% antibiotic-antimycotic solüsyon (Gibco, #15240-062), 1% Non-Essential Amino Acids, (NEAA, Gibco, #11140050), 1% GlutaMAX™ (Gibco, #35050061), 1% Sodium Pyruvate (Gibco, #11360070) kullanılmıştır.

Test metodu: Ekstraksiyon metodu

Rasyonel: Sıvı içinde çözünen katı maddelerin hücre ile teması sonucu oluşabilecek toksik etkisinin analiz edilmesi.

Ekstraksiyon protokolü: "Vakum Bell" örneği steril olmayan şekilde temin edildikten sonra yüzey alanı dijital bir kaliper yardımı ile hesaplanarak kesilmiştir. UV altında steril edillerek ve ISO 10993-12'de Tablo 1'de (Standart yüzey alanları ve ekstrakt sıvı hacimleri) belirtilmiş olan oranlara uygun olarak kalınlık > 1,0 mm için belirtilen özelliklerde elastomerik closures örneği 1,25 cm^2/ml esasına göre ekstrakt edilmiştir. Hazırlanan örnekler hesaplanan hacimde, serum içeren besi yeri içinde 37°C inkübe edilmiş 120 rpm'de 24 saat süre ile çalkalanarak ekstraktlar hazırlanmıştır.

Deney protokolü: L929 hücreleri sayılarak 10 × 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96'lık kuyulara ekilmiştir ve 24 saat 37°C'de %5 CO_2 inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnek ve kontrollerin ekstraktları hiç bekletilmeden hücrelerin üzerine eklenmiş ve 37°C, %5 CO_2'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 5 µg/ml MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma #5655) içeren besiyeri kuyulara eklenerek 4 saat inkübasyondan sonra oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyulara 100 µl DMSO eklenerek 2 saat çalkalayıcıya bırakılmıştır. 96'lık plaka canlılık testi için mikroplate okuyucuda 570 nm ve 650 nm referans dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Sitotoksisite Ölçüm metodu: MTT hücre canlılığı analizi (Kolorimetrik)

Rasyonel: Hücre canlılığının tutarlı ve duyarlı ölçülebilmesi

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar: **53618** **54377**

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz. Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

Negatif, pozitif ve diğer kontroller:

Kontroller:

Kontrol 1- Hiçbir işlem uygulanmamış serum içeren taze besi yeri, MEM fresh.

Kontrol 2- Ekstraksiyon işlemine paralel olarak %5 CO_2, 37°C'de ve 120 rpm 24 saat inkübe edilmiş besi yeri, MEM ekstrakt.

Pozitif kontrol: ZnSO4, 2mM (CAS 7733-02-0, Sigma)

SONUÇ:

Hücre cevabı ve diğer gözlemler:

Kalitatif Değerlendirme: Tablo 9'da verilen değerlendirme kriterlerine göre L929 hücre kültürü 24 saat "Vakum Bell" ekstraktına maruz bırakılarak kontrole göre hücre ölümüne sebep olma potansiyeli inverted mikroskopta incelenmiştir. Hücreler yuvarlaklaşmış, zayıf tutunma gösteren ve/veya intrasitoplazmik granülleri olmayan, morfolojik değişiklik gösteren, aralarda lize olmuş hücrelerin varlığı %20'nin altında görülmüştür.

	Derece		Derece
"Vakum Bell"	0	**Kontrol 1,** MEM fresh	0
		Kontrol 2, MEM ekstrakt	0
		Pozitif Kontrol, ZnSO4, 2 mM	4

Tablo 9. Sitotoksisite testi için değerlendirme kriterleri ve puanlama.

Derece	Reaktivite	Durumu
0	Yok	İntrasitoplazmik granüller belirgin, hücre lizisi yok, hücre büyümesinde etkilenme yok.
1	Az	Yuvarlaklaşmış, zayıf tutunma gösteren ve/veya intrasitoplazmik granülleri olmayan, morfolojik değişiklik gösteren, aralarda lize olmuş hücrelerin varlığı %20'nin altında
2	Hafif	Yuvarlaklaşmış, intrasitoplazmik granülleri hiç olmayan hücre oranı %50'nin altında, kapsamlı hücre lizisi yok; büyüme inhibisyonu %50'nin altında
3	Orta	Hücrelerin %70'inden azı yuvarlanmış veya lize olmuş durumda; ve büyüme inhibisyonu %50'den fazla değil
4	Ciddi	Hücrelerin hepsi veya tümüne yakını tahrip olmuş durumda

Kantitatif Değerlendirme: Hücre ölümünü, hücre büyümesinin veya proliferasyonunun inhibisyonunu belirler. Hücre sayısı, protein miktarı, enzimlerin salınımı, vital boyanın salınması, vital boyanın redüksiyonu gibi ölçülebilir parametrelerle ölçülebilir.

Hücre canlılığının % 30'dan fazla azalması, sitotoksik bir etki olarak kabul edilir.

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

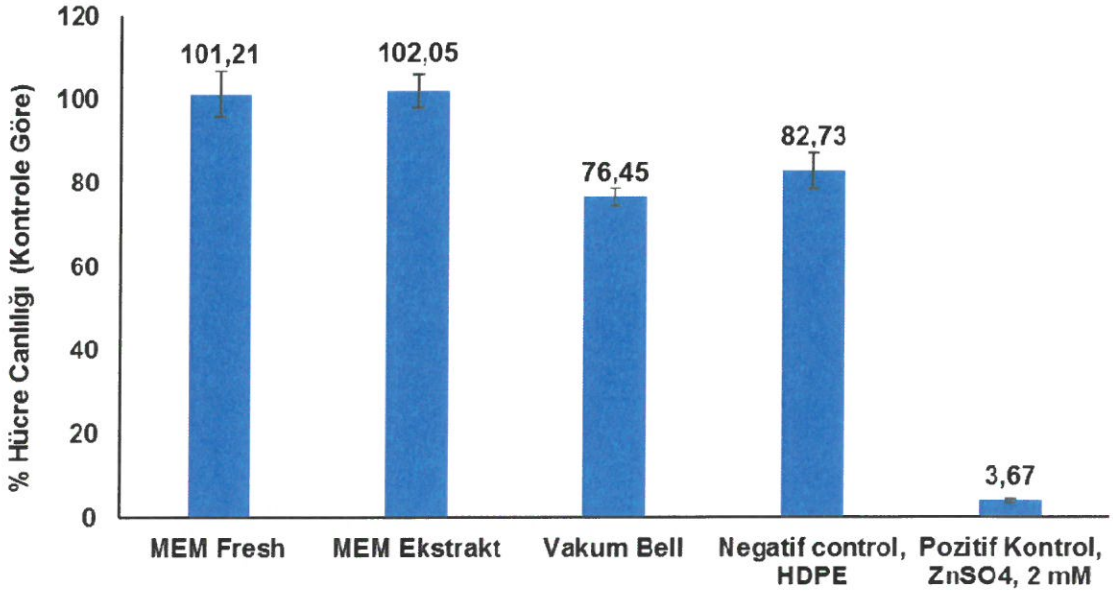
Sorumlu İmzalar: **53618** **54377**

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir..

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr

Rapor no: 16563500-125.05- 127 / **6484**

Tablo 9'da verilen değerlendirme kriterlerine göre L929 hücre kültürü 24 saat "Vakum Bell" ekstraktına maruz bırakılarak kontrole göre hücre ölümüne sebep olma potansiyeli incelenmiştir ve **biyouyumluluk kapsamında yapılan ISO 10993-5 sitotoksisite testi sonucunda kontrole göre hücre canlılığı % 76,45 ± 2,04 olarak bulunmuştur.**



Şekil 4. "Vakum Bell" olarak adlandırılan örneklerden hazırlanan ekstraktların 24 saat maruziyet sonunda kontrole göre L929 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.

"Vakum Bell" sitotoksisitesi; Örneklerin absorbans değerleri %100 canlılık için hiçbir uygulama yapılmayan MEM besiyeri absorbans değerleri kullanılarak normalize edilmiştir.

Her bir örnek için elde edilen veriler bir numuneden rastgele olarak seçilen 3 adedine ait ekstraktların deneylerde 3 tekrarlı olarak çalışılması sonucu elde edilmiştir.

DEĞERLENDİRME:
"Vakum Bell" örneği - ekstraksiyon metoduyla yapılan MTT hücre canlılığı testine göre L929 hücreleri üzerine **sitotoksik değildir.**

Açıklamalar: Bu raporun hazırlanmasında müşteri tarafından sağlanan "ürünü tanımlayıcı bilgiler" kullanılmıştır. Laboratuvar, müşteri tarafından sağlanan bilgi/veriden sorumlu tutulamaz.

Sorumlu İmzalar: 53618 54377

Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.
Raporda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir.
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

P.K.21, 41470 GEBZE – KOCAELİ
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09
http://mam.tubitak.gov.tr