



**DUADERM BARIYER KREMİ ÜRÜNÜNÜN
IN VITRO SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU
(EN ISO 10993-5:2009)**

Rapor No: : 2025.05.14

Tüm hakları saklıdır. Aksi belirtilmedikçe, bu raporunun herhangi bir bölümü herhangi bir şekilde ya da fotokopi ve mikrofilm dahil aşağıda adresi verilen firmadan yazılı izin alınmaksızın ya da dokümanı talep edenin yazılı izni olmaksızın elektronik veya mekanik herhangi bir yolla çoğaltılamaz ya da kullanılamaz. İmzasız ve mühürsüz analiz sonuç raporları geçersizdir.

İÇİNDEKİLER

DOĞRULAMA BEYANI	3
1. TEST ÜRÜNÜ BİLGİSİ	4
2. DENEY YÖNTEMİ TANIMI	5
2.1. Özüt Hazırlama Protokolü	5
2.2. Hücre Kültürü Şartları	5
2.3. Doz Uygulama Konsantrasyonları	6
3. EKİPMANLAR	6
4. REAKTİFLER.....	6
5. DENEY KABUL KRİTERİ.....	6
6. SİTOTOKSİK ETKİNİN DEĞERLENDİRME HESAPLANMASI	6
7. SONUÇ	8
8. KAYIT ARŞİV	8
9. GİZLİLİK SÖZLEŞMESİ	8
10. SAPMA BEYANI	8
REFERANSLAR	8
ONAY	8

DOĞRULAMA BEYANI

Bu çalışma, karşılıklı olarak üzerinde anlaşmaya varılan çalışma test ürününün üzerinde gerçekleştirilmiştir. ISO standartlarına uygun olarak çalışma tamamlanmıştır. Bu rapor elde edilen sonuçların gerçek ve doğruluğunu kanıtlar.

Dr. Oğuz ÖZTÜRK

Laboratuvar Müdürü

Deney Sonuç Tarihi

15.05.2025



1. TEST ÜRÜNÜ BİLGİSİ

Talepte Bulunan Firma-Enstitü	Akra Group Kozmetik ve İlaç San. Tic. A.Ş.
Talepte Bulunan Firma-Enstitü Adresi	Yakuplu Mh. 228. Sk. No:18 İç Kapı: 3 Beylikdüzü/İstanbul
Test Ürünü Adı	Duaderm Barrier Cream
Lot Numarası	LOT 1235-01
Referans Numarası	-
Üretim Tarihi	
Son Kullanma Tarihi	01/2028
Renk	
Fiziksel Durumu	
Ürün Sterilitesi	-
Depolama Koşulları	
Test Ürünü Kabul Tarihi	01.03.2025
Deney Başlama-Bitiş Tarihi	01.05.2025 / 05.05.2025
Deney Rapor Tarihi	15.05.2025
Test Sonucu	MTT yöntemi sonuçlarına göre; test ürününde 100 µg/ml konsantrasyonda % 90,71 canlılık oranı tespit edilmiştir. EN ISO 10993-5:2009 standardına göre test ürünü sitotoksik potansiyele sahip değildir.

2. DENEY YÖNTEMİ TANIMI

MTT yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]: Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir. Sitotoksitesite test çalışması için ATCC firmasından temin edilen L-929 fare fibroblast hücre hattı (NCTC clone 929: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC] USA) kullanıldı.

2.1. Özüt Hazırlama Protokolü

Test materyali (Bkz. Madde 3.0), negatif ve pozitif gruplarının özütlemesi EN ISO 10993-12:2021 standartlarına uygun olarak yapıldı. Test ürününün tamamı özütlemeye kullanıldı. Negatif, pozitif ve test materyali özütlemesi aynı koşullarda ve sıcaklıklarda yapıldı. EN ISO 10993-12:2021 standardı madde 10.3.3 Tablo 1'e belirtilmiş oranlar baz alınarak test ürününden hazırlanan örneklerin özütlenmesi için MEM (Eagle minimum essential medium) kullanıldı. Test ürünü 22 ± 2 saat ve 37 ± 1 °C'de çalkamalı inkübatörde 200 rpm de bekletilerek özüt hazırlandı ve %100 özüt olarak tanımlandı. Diğer özütlerin yüzdeleri MEM %10 FCS seyreltilme ile oluşturuldu. Özütlenme sonunda özüt berraktı, renk değişikliği veya partikül gözlenmedi. Bu nedenle filtrasyon, santrifüj, pH gibi ek işlemlere gerek kalmadı. Özüt 25 dakika içinde kullanıldı ve bu süre zarfında stabil olarak kabul edildi. Renk değişimi gözlenmedi (Laboratuvar içi test metodu).

Negatif Kontrol (NK)

Yüksek Yoğunluklu Polietilen Materyali (HDPE) 3 cm ²/ml olacak şekilde MEM + 10% FCS ile özütlenme yapıldı.

Pozitif Kontrol (PK)

DMSO (Dimetilsülfoksit) seri dilusyonları (10-30 v/v) MEM+ %10 FCS ile yapıldı.

Test Ürünü (TÜ) konsantrasyonları

Test materyali özütü 100 -30-10 -3-v/v olarak MEM+ %10 FCS ile seyreltildi

Blank (Kör Numune)

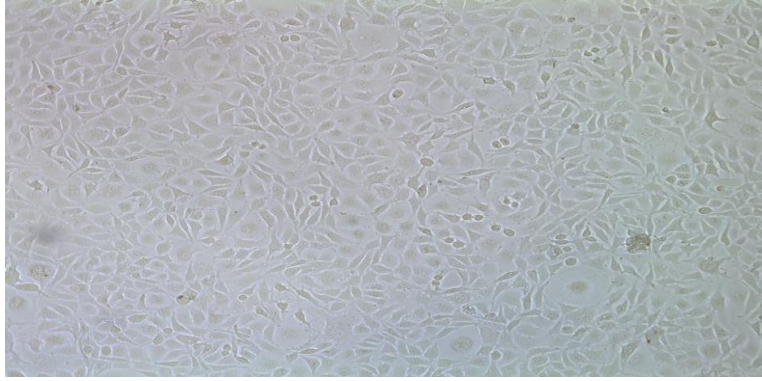
Deney numunesinin özütlemesi esnasında tabi tutulduğu şartların aynısına tabi tutulan deney numunesini içermeyen özütlenme aracıdır (MEM+ %10 FCS).

NOT:

- EN ISO 10993-12:2021 standart metodu 10.3.3 tablo 1'de yer alan standart yüzey alanları ve ekstrakte sıvı hacimlerine göre polietilen materyali (PE), düzensiz şekilli katı cihazlar (emici olmayan kalıplanmış ürün) ve Madde 3.0 Test Materyali ise kalınlık <0,5 mm (film, levha, boru duvarı) grubu dikkate alınarak örnek/ml hesaplaması yapılmıştır.

2.2. Hücre Kültürü Şartları

Sitotoksitesite test çalışması için L-929 fare fibroblast hücre hattı (NCTC clone 929: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC] kullanıldı. Stok kültürlerde mikoplazma gözlemlenmedi (**Bkz. Resim 1**). %10'luk FCS (Fötal buzağı serumu) ve %2 L-glutamin ile desteklenmiş MEM (Eagle minimum essential medium) besiyerinde çoğaltılarak, 24 saatlik %5 CO₂'li etüvde 37°C'de % 90 nemde inkübe edildi. MEM sterilite testi ile temiz olduğu saptanmıştır. MEM pH değeri 7,2 ile 7,4 arasında ölçümlenmiştir. L-929 fare fibroblast hücre hattı kullanım talimatlarına göre hücrelerin tripsinasyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücreler kültür medyumunu içerisinde süspanse edilerek 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 µl aktarıldı.

Resim 1. L929 fare fibroblast hücre hattı mikroskop görüntüsü

2.3. Doz Uygulama Konsantrasyonları

24 saatlik hücre kültürü şartlarından sonra kültür üzerindeki medyum uzaklaştırılarak 100 µl test materyali, pozitif ve negatif kontrol özütlerinden eklendi. Tüm dozlar en az 5 tekrar olacak şekilde uygulandı. 24 saatlik %5 CO₂'li etüvde 37°C'de % 90 nemde bekleme sonunda plateler incelendikten sonra kültür medyumunu uzaklaştırıldı. Platelerin mikroskopik olarak incelenmesinden sonra kültür ortamı kuyucuklardan uzaklaştırıldı. 50 µl MTT (1mg/ML) çözeltisi onun bir testi kuyucuğuna ilave edildi. Plateler 2 saat 37°C inkübe edildi. Sonra MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl izopropanol ilave edildi. 570 nm filtre içeren mikropilaka okuyucu ile absorbans ölçümleri yapıldı ve değerlendirme yapıldı.

3. EKİPMANLAR

Otoklav (Hanshin 60 VD)

CO₂ İnkübatörü 37 °C, nemli, 5 % CO₂/hava. (Mettler INCO 108 MED)

Ters Faz Konstrat Mikroskopu (Zeiss primovert)

Terazi (SHIMADZU ATC224)

Laminer Akış Kabini, Standart "mikrobiyolojik güvenlik kabin (Nukleon)

Mikropilak Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Spectrum)

Su Banyosu 37 °C (JSR, Model: Jswb-11t, Seri no: 140612-04)

Hücre sayıcı veya hemositometre

4. REAKTİFLER

MEM (Eagle minimum essential medium) (Ref: 01-340-1B, Lot: 2013239)

MTT (3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniletrozolyum bromür) (SIGMA, Lot No: MK.BS4732V)

Tripsin EDTA Solusyon (GiBco, Parti No: 1786548)

Penisilin, Streptomisin sülfat (GiBco, Parti No: 1665735) MEM (GiBco, Parti No: 8116016)

FCS (Fetal buzağı serumu) (NTC, Lot No: NTC-HK007)

L-glutamin (Marka: Biological industries, Ref: 03-020-1C, Lot:2028523)

5. DENEY KABUL KRİTERİ

A- Mikroskopik değerlendirme altında, negatif kontrol ile test ürününe maruz kalan kültürler herhangi bir sitotoksik yanıt (*derece 0*) göstermedi . Pozitif kontrole sahip hücreler ise şiddetli sitotoksikite (*derece 4*) gösterdi Bu nedenle, deney geçerli olarak kabul edildi.

B- Bir deney, kör numunelerin ortalama OD570 değerleri $\geq 0,2$ olduğunda, kabul ölçütlerini karşılamış olur. Test materyalinin %100 canlılık değerinin, kör numuneden elde edilen değer ≥ 70 'in üstünde olması sitotoksik potansiyeli olmadığını gösterir. Pozitif kontrol numunesinin yüzde >30 'dan fazla sitotoksik etki göstermesi gerekir.

6. SİTOTOKSİK ETKİNİN DEĞERLENDİRME HESAPLANMASI

% canlılık değeri aşağıda bulunan formüle göre belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{100 \times \text{OD570}^{\text{TM}}}{\text{OD570}^{\text{b}}}$$

OD_{570TM} = Deney numunesinin %100 özütlerinin ölçülen optik yoğunluğunun ortalama değeridir.

OD_{570b} = Kör numunelerin ölçülen optik yoğunluğunun ortalama değeridir.

Tablo 1. Hücrelerin nitel morfolojik gözlemleri (kültür durumları)

Gruplar	Reaksiyon	Aşılama Öncesi	Özüt uygulanmadan önce	Özüt uygulamasından 24 saat sonra
Negatif Kontrol	YOK (DERECE 0)	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok.	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok.
Test Ürünü	YOK (DERECE 0)	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok.	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok
Pozitif Kontrol	ŞİDDETLİ (DERECE 4)	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok.	Ayrık intrasitoplazma atik granüller, hücre parçalanması yok, hücre büyümesinde azalma yok	Ayrık intrasitoplazma atik granüller var hücre parçalanması var.

Tablo 2. Negatif Kontrol (NK), Kör Numune (b), Test Ürünü (TM) ve Pozitif Kontrol (PK) gruplarının absorbands değerleri

TEKRAR (n)	NK	B	TM100 %	TM30%	TM10%	TM 3%	PK 30%	PK 10%
1	0,655	0,587	0,554	0,504	0,604	0,525	0,300	0,174
2	0,524	0,606	0,449	0,636	0,625	0,506	0,225	0,168
3	0,544	0,559	0,537	0,549	0,517	0,578	0,110	0,271
4	0,533	0,502	0,582	0,427	0,442	0,586	0,091	0,174
5	0,507	0,589	0,457	0,511	0,517	0,583	0,081	0,252

Tablo 3. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniletrozolyum bromür) Testi ile sitotoksik etkilerin nicel ölçümü sonuçları.

	Optik yoğunluk (OD) ortalama değeri 570 nm ± Standart Sapma (SS)				Canlılık %			
	% Dilusyon konsantrasyonları (v/v)				% Dilusyon konsantrasyonları (v/v)			
	100	30	10	3	100	30	10	3
Test Ürünü (Ort.)	0,516±0,053	0,525±0,068	0,541±0,066	0,556±0,03	90,71	92,40	95,15	97,71
Kör Numune (Ort.)	0,569±0,037				100,0			
Pozitif Kontrol (Ort.)		0,161±0,086	0,208±0,044			28,39	36,55	

Negatif Kontrol (Ort.)	0,553±0,053		97,19			
------------------------	-------------	--	-------	--	--	--

7. SONUÇ

EN ISO 10993-5:2009 standardı MTT yöntemi direktifleri doğrultusunda yapılan bu çalışmada test ürünü yüzde canlılık değeri;

% 100 µg/ml konsantrasyon için % **97,71** olarak bulunmuştur.

8. KAYIT ARŞİV

Bu çalışmaya ait tüm ham veriler ve nihai raporun bir kopyası arşivimizde 5 yıl süresince saklanmaktadır.

9. GİZLİLİK SÖZLEŞMESİ

Gizlilik beyanları, çalışma başlamadan önce kararlaştırılmıştır.

10. SAPMA BEYANI

Onaylanmış çalışma protokolünden, verilerin geçerliliğini etkilediğine karar verilen herhangi bir sapma yoktur.

REFERANSLAR

- 1.Biological Evaluation of Medical Devices - Part 1, Evaluation and Testing within a Risk Management Process, EN ISO 10993-1:2018.
2. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5, Tests for in vitro Cytotoxicity, EN ISO 10993-5:2009.
3. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 12, Sample Preparation and Reference Materials, EN ISO 10993-12:2021.
4. OECD Principles of Good Laboratory Practice. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring No. 1. ENV/MC/CHEM (98)17. 5. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025:2017(E).
6. Use of International Standard ISO 10993-1, “Biological Evaluation of Medical Devices, ISO 10993 - Part 1. Evaluation and Testing Within a Risk Management Process. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. September 4, 2020.

ONAY

