

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKSTRAKTE EDİLEMİYEN TIBBİ CİHAZLARIN
SİTOTOKSİSİTE VE İRRİTASYON POTANSİYELLERİNİN
ALTERNATİF DOKU MODELLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Betülây GÜMÜŞ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**ANKARA
2026**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKSTRAKTE EDİLEMİYEN TIBBİ CİHAZLARIN
SİTOTOKSİSİTE VE İRRİTASYON POTANSİYELLERİNİN
ALTERNATİF DOKU MODELLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Betülây GÜMÜŞ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Suna Sabuncuoğlu**

ANKARA

2026

**EKSTRAKTE EDİLEMEYEN TIBBİ CİHAZLARIN SİTOTOKSİSİTE VE
İRRİTASYON POTANSİYELLERİNİN ALTERNATİF DOKU MODELLERİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Öğrenci: Betülây GÜMÜŞ

Danışman: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Bu tez çalışması 05.06.2026 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Gözde GİRGİN*

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU*

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ*

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

14 Haziran 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCI ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

05/06/2026
Ecz. Betül GÜMÜŞ

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Betülây GÜMÜŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, tez konumun belirlenmesinden çalışma süreçlerimin her aşamasına kadar sabırla, anlayışla ve yapıcı eleştirileriyle bana yol gösteren; öğrencisi olmaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, kendimi çok şanslı hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Eğitimime katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deney sürecinde destek olan Arş. Gör. Berivan Ezgi KAYA, Arş. Gör. Ecz. Erdem Beşlioğlu ve Ecz. Şilan ÇATAK'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bu süreci yönetebilmem için imkân sağlayan, bilgi ve birikimleri ile bana destek veren Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ve Onaylanmış Kuruluşlar ve Klinik Araştırmalar Dairesi yönetici ve çalışanlarına,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de sevgi, anlayış ve destekleriyle daima yanımda olan annem Hüsniye GÜMÜŞ, babam Süleyman GÜMÜŞ ve ablam Begüm Aygen GÜMÜŞ'e

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Gümüş, B. Ekstrakte Edilemeyen Tıbbi Cihazların Sitotoksosite ve İritasyon Potansiyellerinin Alternatif Doku Modelleri ile Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Tıbbi cihazların biyoyoumluluk değerlendirilmesi, ürünlerin güvenli bir şekilde piyasaya arz edilebilmesi için kritik öneme sahip bir süreçtir. Sitotoksosite, iritasyon ve duyarlılık, tüm tıbbi cihazlar için değerlendirilmesi gereken temel biyolojik riskler arasında yer almaktadır. Bu risklerin belirlenmesinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan hayvan deneyleri; etik kaygılar, yüksek maliyet, zaman gereksinimi ve standardizasyon sorunları nedeniyle yerini giderek alternatif *in vitro* yöntemlere bırakmaktadır. Özellikle ekstrakte edilmesi güç veya mümkün olmayan sıvı, jel, partikül ve krem formundaki tıbbi cihazların *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmesine ilişkin verilerin sınırlı olması, bu alandaki araştırmaları önemli hale getirmektedir. Bu tez çalışmasında, farklı risk sınıflarında yer alan ekstrakte edilemeyen tıbbi cihaz örneklerinin sitotoksosite ve iritasyon potansiyelleri *in vitro* alternatif yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında seçilen tıbbi cihaz örneklerinin sitotoksosite değerlendirmeleri 3T3 hücre kültüründe MTT yöntemi ile gerçekleştirilmiş, iritasyon potansiyelleri ise OECD 439 kılavuzlarına uygun şekilde yeniden yapılandırılmış insan epidermisi (Reconstructed Human Epidermis, RhE) modeli kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca iritasyon yanıtının daha kapsamlı değerlendirilmesi amacıyla RhE doku kültür medyumlarında TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Sitotoksosite değerlendirmelerinde test edilen cihaz örneklerinin konsantrasyona bağlı olarak farklı hücresel yanıtlar oluşturduğu belirlenmiş; bazı örneklerin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterirken, daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırdığı saptanmıştır. RhE modeli kullanılarak gerçekleştirilen iritasyon testlerinde ise incelenen tıbbi cihazların hiçbirinin iritan olarak sınıflandırılmadığı belirlenmiştir. Sitokin analizlerinde ise TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeylerinin negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı, ancak pozitif kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde kaldığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ekstrakte edilmeden değerlendirilen tıbbi cihazların biyoyoumluluk analizlerinde hücre kültürü ve üç boyutlu RhE modellerinin uygulanabilir ve güvenilir alternatif yöntemler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca sitokin analizlerinin, yalnızca hücre canlılığına dayalı değerlendirmelere ek olarak, materyallerin oluşturduğu biyolojik yanıtın daha kapsamlı karakterizasyonuna katkı sağlayabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların biyoyoumluluk değerlendirmesinde alternatif *in vitro* yaklaşımların kullanımını destekleyen veriler sunarak literatüre katkı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyoyoumluluk, tıbbi cihaz, *in vitro* test yöntemleri, sitotoksosite, iritasyon

ABSTRACT

Gümüş, B. Evaluation of Cytotoxicity and Irritation Potentials of Non-Extractable Medical Devices Using Alternative Tissue Models. Hacettepe University Graduate School of Health Science Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2026. Biocompatibility assessment is a critical step in ensuring the safe placement of medical devices on the market. Cytotoxicity, irritation, and sensitization are among the fundamental biological risks that must be evaluated for all medical devices. Animal testing, which has long been widely used for the assessment of these risks, is increasingly being replaced by alternative *in vitro* methods due to ethical concerns, high costs, time requirements, and issues related to standardization. The limited availability of data on the *in vitro* evaluation of medical devices in liquid, gel, particulate, and cream forms—which are particularly difficult or impossible to extract—makes research in this area particularly important. In this thesis, the cytotoxicity and irritation potential of non-extractable medical device samples belonging to different risk classes were evaluated using alternative *in vitro* methods. Cytotoxicity assessments were performed using the MTT assay in 3T3 cell cultures, while irritation potential was evaluated using a Reconstructed Human Epidermis (RhE) model in accordance with OECD Test Guideline 439. In addition, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-8 levels were analyzed in RhE tissue culture media by ELISA to provide a more comprehensive evaluation of the irritation response. The cytotoxicity studies demonstrated concentration-dependent cellular responses to the tested medical device samples. While some samples exhibited cytotoxic effects at higher concentrations, they significantly increased cell viability at lower concentrations. Irritation testing using the RhE model revealed that none of the investigated medical devices were classified as irritants. Cytokine analyses showed that TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-8 levels were significantly elevated compared with the negative control group, while remaining lower than those observed in the positive control group. The findings indicate that cell culture systems and three-dimensional human epidermis models represent applicable and reliable alternative approaches for the biocompatibility assessment of non-extractable medical devices without the need for extraction procedures. Furthermore, cytokine analysis was shown to provide additional information beyond conventional cell viability measurements, enabling a more comprehensive characterization of biological responses induced by medical device materials. Overall, this study contributes to the scientific literature by providing data supporting the use of alternative *in vitro* approaches in the biocompatibility evaluation of non-extractable medical devices.

Keywords: Biocompatibility, medical device, *in vitro* testing methods, cytotoxicity, irritation,

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | xi |
| ŞEKİLLER | xiii |
| TABLolar | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Tıbbi Cihaz Tanımı ve Yasal Düzenlemelerin Gelişimi | 5 |
| 2.1.1. Amerika’da Yasal Düzenlemelerin Gelişimi | 6 |
| 2.1.3. Avrupa Birliği’nde Tıbbi Cihazlara Yönelik Yasal Düzenlemelerin Gelişimi | 9 |
| 2.2.1. Tıbbi Cihaz Sınıfları ve Uygunluk Değerlendirmesi | 15 |
| 2.3. Biyouyumluluğun Yasal Gereklilikler Arasındaki Yeri | 21 |
| 2.3.1. Tıbbi Cihazlarda Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi | 23 |
| 2.3.2. Tıbbi Cihazlarda Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi Süreci ve Biyouyumluluk Testleri | 26 |
| 2.3.3. Biyouyumluluk Testleri | 37 |
| 2.4. Toksikite Değerlendirmesinde Alternatif Test Yöntemleri ve 3R İlkesi | 39 |
| 2.4.1. Alternatif Test Yöntemleri- Yeni Alternatif Metotlar (NAMs) | 43 |
| 2.5. Tıbbi Cihazların Biyolojik Güvenliğinin <i>In vitro</i> Yöntemlerle Değerlendirilmesi | 46 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 49 |
| 3.1. Gereçler | 49 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 49 |
| 3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 50 |
| 3.2. Çözeltilerin Hazırlanması | 51 |
| 3.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması | 51 |
| 3.2.4. Elisa Testleri İçin Standart Çözeltisi Hazırlama | 51 |

| | |
|---|------------|
| 3.3. Yöntemler | 55 |
| 3.3.1. Hücre Kültürü | 55 |
| 3.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) Testi | 56 |
| 3.3.3. Ekstrakte Edilmeyen Tıbbi Cihazların Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi | 57 |
| 3.3.2. <i>İn Vitro</i> Yeniden Yapılandırılmış Üç Boyutlu Doku Modeli Kullanılarak Cilt İritasyonunun Değerlendirilmesi | 59 |
| 3.3.3. TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 Analizleri (ELISA) | 63 |
| 4. BULGULAR | 72 |
| 4.1. Sitotoksite Bulguları | 72 |
| 4.2. <i>İn vitro</i> Cilt İritasyon Testi Bulguları | 73 |
| 4.7. IL-4 Düzeylerine | 81 |
| 5. TARTIŞMA | 83 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 94 |
| 7. KAYNAKLAR | 97 |
| 8. EKLER | 104 |
| EK-1: Dijital Makbuz | |
| EK-2: Orijinallik Raporu | |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 106 |

SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|----------------|--|
| AB | Avrupa Birliği |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| AIMDD | Aktif İmplant Edilebilir Tıbbi Cihazlar Direktifi |
| ASTM | Amerikan Test ve Malzeme Derneği |
| BDDE | 1,4-Bütandiol Diglisidil Eter |
| BrdU | Bromodeoksiüridin |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) |
| EU | Avrupa Birliği |
| EUDAMED | Avrupa Tıbbi Cihaz Veritabanı |
| FDA | Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| FDAMA | Gıda ve İlaç İdaresi Modernizasyon Yasası |
| GPMT | Guinea Pig Maximization Test (Gine Domuzu Maksimizasyon Testi) |
| IL | İnterlökin |
| IL-2 | İnterlökin-2 |
| IL-4 | İnterlökin-4 |
| IL-6 | İnterlökin-6 |
| IL-8 | İnterlökin-8 |
| ISO | Uluslararası Standartlar Örgütü |
| IVDD | İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Direktifi |
| IVDR | İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Tüzüğü |
| LLNA | Lokal Lenf Nodu Testi (Local Lymph Node Assay) |
| LDH | Laktat dehidrojenaz |
| MDR | Tıbbi Cihaz Yönetmeliği |
| MDD | Tıbbi Cihazlar Direktifi |
| MHLW | Sağlık, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |

| | |
|--------------------------------|--|
| NAMs | Yeni Yaklaşım Yöntemleri |
| NRU | Nötral Kırmızı Alımı (Neutral Red Uptake) |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| RhE | Üç Boyutlu Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis Modeli |
| TİTCK | Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu |
| TNF-α | Tümör Nekroz Faktörü-Alfa |
| XTT | Sodyum 3'-[1-(fenilamino-karbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro)benzensülfonik asit hidrat |
| 3R | Replacement (Yenileme), Reduction (Azaltma) ve Refinement (İyileştirme) |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. FDA'ya göre tıbbi cihazların sınıflandırılması. | 8 |
| 2.2. Tıbbi cihazlara ilişkin yasal düzenlemelerin ortaya çıkış süreci. | 12 |
| 2.3. Tıbbi cihaz sınıfları. | 15 |
| 2.4. Tıbbi cihaz sınıflandırma kuralları. | 17 |
| 2.5. Sınıf I tıbbi cihaz örnekleri. | 17 |
| 2.6. Sınıf I cihazlar için onaylanmış kuruluş değerlendirme gerekliliği. | 18 |
| 2.7. Sınıf IIa tıbbi cihaz örnekleri. | 18 |
| 2.8. Sınıf IIb tıbbi cihaz örnekleri. | 19 |
| 2.9. Sınıf III tıbbi cihazlar. | 19 |
| 2.10. Biyolojik eşdeğerliğin gösterilme adımları. | 27 |
| 2.11. Sağlam ciltle temas eden cihaz örnekleri (Elektrotlar, dış protezler, sabitleme bantları ve kompresyon bandajları). | 31 |
| 2.12. Mukoza membranları ile temas eden cihazlara örnekler. | 32 |
| 2.13. Yaralanmış veya hasar görmüş yüzeylerle ya da dolaşımdaki kan dışındaki iç dokularla temas eden cihaz örnekleri. | 33 |
| 2.14. Dolaşımdaki kanla temas eden tıbbi cihazlara örnekler. | 34 |
| 2.15. Alternatif yöntemlerin gelişim süreci. | 42 |
| 2.16. Yeni yaklaşım metodolojilerini gösteren şema. | 44 |
| 2.17. İn vitro doku modelleri ve örnek kullanım alanları. | 46 |
| 3.1. IL-2 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması. | 52 |
| 3.2. IL-4 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması. | 53 |
| 3.3. IL-6 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması. | 53 |
| 3.4. IL-8 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması. | 54 |
| 3.5. TNF- α Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması. | 55 |
| 3.6. MTT'nin formazana indirgenme mekanizması. | 56 |
| 3.7. Ticari olarak temin edilen yeniden yapılandırılmış insan epidermis dokuları. | 59 |
| 3.8. Doku kitinde 0. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. | 60 |
| 3.9. Doku kitinde 1. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. | 61 |
| 3.10. Doku kitinde 2. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. | 62 |
| 3.11. Doku kitinde 3. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. | 63 |
| 4.1. Tıbbi cihaz test örneklerine ilişkin sitotoksosite bulguları. | 73 |

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| 4.2. İn <i>vitro</i> cilt iritasyon testi bulguları. | 74 |
| 4.3. TNF- α düzeylerine ilişkin bulgular. | 75 |
| 4.4. IL-2 düzeylerine ilişkin bulgular. | 77 |
| 4.5. IL-6 düzeylerine ilişkin bulgular. | 78 |
| 4.6. IL-8 düzeylerine ilişkin bulgular. | 80 |
| 4.7. IL-4 düzeylerine ilişkin bulgular. | 81 |

TABLÖLAR

| Tablo | Sayfa |
|---|--------------|
| 2.1. Tıbbi cihaz kullanım süresi. | 16 |
| 2.2. Biyolojik, kimyasal ve fiziksel testler için ISO dokümanları. | 29 |
| 2.3. Sağlam ciltle temas eden tıbbi cihazlar için biyolojik etkiler. | 31 |
| 2.4. Mukozal membranlar ile temas eden tıbbi cihazlar için biyolojik etkiler. | 32 |
| 2.5. Yaralanmış veya hasar görmüş yüzeylerle ya da dolaşımdaki kan dışındaki iç dokularla temas eden cihazlar için biyolojik etkiler. | 33 |
| 2.6. Dolaşımdaki kanla temas eden cihazlar için biyolojik etkiler. | 34 |
| 4.1. İn vitro cilt iritasyon % değerleri. | 75 |
| 4.2. TNF- α düzeyleri | 76 |
| 4.3. IL-2 düzeyleri. | 77 |
| 4.4. IL-6 düzeyleri. | 79 |
| 4.5. IL-8 düzeyleri. | 80 |
| 4.6. IL-4 düzeyleri. | 82 |

1. GİRİŞ

Tıbbi cihazlar insan sağlığının sürdürülebilirliğinde önemli bir yere sahiptir. Hastalığın tanısı, önlenmesi, izlenmesi, prognozu, tedavisi ve hafifletilmesi dâhil fizyolojik veya patolojik süreçlerin araştırılması gibi birçok aşamada kullanımları söz konusudur. Burkulan bir bileğin sarılması amacıyla kullanılan basit sargıdan bir HIV/AIDS teşhisine, yapay kalça implantından cerrahi müdahalede kullanılan ekipmanlara kadar sağlık alanında birçok yerde kullanılabilir. Tıbbi cihaz kullanımının insan sağlığındaki rolü eski çağlardan günümüze kadar devam etmiş ve giderek önem kazanmıştır. Bugün dünya pazarında 7000'den fazla jenerik cihaz grubuna ayrılan tahmini olarak 2 milyon farklı türde tıbbi cihaz mevcuttur (1, 2).

Tıbbi cihazların insan vücudu ile doğrudan veya dolaylı temas halinde kullanılabilmesi, bu ürünlerin güvenli, etkili ve kontrollü bir şekilde hastalara sunulmasını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle, tıbbi cihazların güvenliği ve performansına ilişkin düzenleyici çerçevenin oluşturulmasına yönelik çalışmalar 1990'lı yılların başından itibaren Avrupa Birliği tarafından yürütülmeye başlanmıştır. Takip eden yıllarda teknolojik gelişmeler, klinik deneyimler ve piyasa gözetim verileri doğrultusunda mevcut mevzuat sürekli olarak gözden geçirilmiş ve daha kapsamlı bir düzenleyici yapının oluşturulması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, 2017 yılında 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (Medical Device Regulation, MDR) ile 2017/746 sayılı *In Vitro* Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (*In Vitro* Diagnostic Medical Device Regulation, IVDR) yürürlüğe girmiştir. Söz konusu düzenlemeler ile tıbbi cihazların güvenliği, performansı ve klinik etkinliğine ilişkin gereklilikler önemli ölçüde güçlendirilmiş; cihazların tasarım, üretim, uygunluk değerlendirmesi, piyasaya arz, piyasa sonrası izleme ve gözetim süreçlerinin daha şeffaf, izlenebilir ve güvenilir bir yapıya kavuşturulması amaçlanmıştır. Böylece tıbbi cihazların yaşam döngüsü boyunca hasta, kullanıcı ve toplum sağlığının korunmasına yönelik daha etkin bir düzenleyici sistem oluşturulmuştur (3, 4).

Bir tıbbi cihazın piyasaya arz edilebilmesi için cihazın yönetmeliğin ele aldığı gereklilikleri karşılar nitelikte olması gerekmektedir. Bu değerlendirmelerin bir parçası olarak biyolojik güvenliğinin yani biyoyumluluğunun değerlendirilmesi tıbbi cihaz geliştirme sürecinin önemli bir adımını oluşturmaktadır. Biyoyumluluğun

değerlendirmesi, cihazın insan vücudu ile etkileşimi sonucunda kabul edilebilir bir biyolojik yanıt oluşturup oluşturmadığının değerlendirilmesini içermektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen değerlendirmelerde cihazın temas ettiği doku, temas süresi, materyal özellikleri ve potansiyel kimyasal salınımlar gibi çeşitli faktörler dikkate alınmaktadır. Bu amaçla kullanılan standartlar ürünlere göre değişiklik göstermekle birlikte biyoyumluluğun değerlendirilmesi amacıyla kullanılan ISO 10993 standart serisi en temel yapılması gereken testler için kılavuzluk sağlar (5-8).

Tıbbi cihaz yönetmeliğinde belirtildiği üzere cihazlar kullanım amacı, kullanıldığı bölge ve süre, içerdiği riskler dikkate alınarak sınıf I, I-s, I-m, I-r, IIa, IIb veya III şeklinde sınıflandırılır. Tıbbi cihazın vücut ile etkileşim süresinin ve yerinin farklı olması, cihazların içerdiği risklerin farklı olması biyoyumluluğun değerlendirilmesinde yapılacak testlerinde farklı olmasına yol açar. Cihaz sınıfı, cihazın vücuda temas yeri ve süresi, cihaz bileşenleri/materyallerinin güvenliğine ilişkin veri yeterliliği gibi hususlar değerlendirilmekte ve yapılacak biyolojik testler belirlenmektedir. Bununla birlikte 3 biyolojik etkinin test edilmesi cihazın kategorisi, hasta teması, kullanım süresine bakılmaksızın yapılması gereken testler olarak belirtilmektedir. Bu üç test sitotoksosite, irritasyon ve duyarlılık testleridir (5-7, 9, 10).

Tıbbi Cihazlarda biyoyumluluğun değerlendirilmesinde hayvan deneyleri yaygın olarak kullanılmış olmakla birlikte, etik kaygılar, standardizasyon zorlukları, maliyet ve zaman kısıtlılıkları gibi nedenlerle alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar giderek önem kazanmıştır. 1959 yılında alternatif yöntemler olarak 3R ilkeleri oluşturulmuştur. Değiştirme, Azaltma ve İyileştirme (The 3Rs: Replacement, Reduction and Refinement) başlıklarından oluşan bu ilkeler ile hayvan çalışmaları yerine *in vitro* yöntemlerin kullanılması, mümkün değilse hayvan testlerinin en aza indirilerek gerçekleştirilmesi ve yapılacak testlerde hayvanların stresini minimuma indirmek için uygulamaların iyileştirilmesi amaçlanmıştır. *In vitro* testler, biyolojik etkilerin laboratuvar koşullarında incelenmesine olanak sağlaması, daha kısa sürede sonuç verebilmesi ve hayvan kullanımını azaltması gibi avantajlar sunmaktadır (6, 10-12).

2018 yılında ISO tarafından desteklenen çok merkezli validasyon çalışmasında, yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli (RhE) kullanılarak

gerçekleştirilen *in vitro* irritasyon testlerinin, geleneksel *in vivo* yöntemlerle elde edilen sonuçlarla yüksek düzeyde uyum gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu bulgular doğrultusunda, RhE tabanlı yöntemler tıbbi cihaz irritasyon değerlendirmelerinde bilimsel olarak kabul görmüş ve tercih edilen yaklaşım haline gelmiş; bu yaklaşım daha sonra ISO 10993-23:2021 standardına dahil edilerek düzenleyici çerçeveye kazandırılmıştır. Bununla birlikte, söz konusu validasyon çalışmalarının büyük ölçüde katı ve ekstrakte edilebilir tıbbi cihaz materyalleri üzerinde yürütüldüğü, ekstrakte edilmesi güç veya mümkün olmayan sıvı, jel, krem, macun, partikül ve sprey formundaki tıbbi cihazlara ilişkin verilerin oldukça sınırlı olduğu belirtilmiştir. Oysa günümüzde özellikle hiyalüronik asit bazlı intra-artiküler jeller, yara bakım ürünleri, bariyer kremler, irrigasyon çözeltileri ve çeşitli lokal uygulama ürünleri gibi çok sayıda tıbbi cihaz bu kategoride yer almaktadır. Bu ürünlerde geleneksel ekstraksiyon yaklaşımının uygulanması, cihazın kullanım sırasındaki gerçek maruziyet koşullarını tam olarak yansıtmayabilmekte; ayrıca cihazın biyolojik etkilerinden sorumlu bileşenlerin ekstraksiyon sırasında kaybedilmesi veya seyreltilmesi nedeniyle biyolojik risklerin eksik değerlendirilmesine yol açabilmektedir (10, 13).

Bu tez çalışmasının temel amacı, ekstraksiyon temelli biyouyumluluk değerlendirmelerinin sınırlılıklarını aşabilecek alternatif *in vitro* yaklaşımların uygulanabilirliğini araştırmak ve ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların biyolojik etkilerinin doğrudan değerlendirilmesine yönelik bilimsel veri üretmektir. Bu kapsamda sıvı ve jel formundaki farklı risk sınıflarına ait tıbbi cihaz örnekleri seçilmiş; örneklerin sitotoksosite potansiyelleri hücre kültürü temelli yöntemlerle, irritasyon potansiyelleri ise üç boyutlu RhE modeli kullanılarak doğrudan değerlendirilmiştir. Ayrıca irritasyon yanıtının yalnızca doku canlılığı ile sınırlı kalmadan daha kapsamlı karakterize edilebilmesi amacıyla TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeyleri de analiz edilmiştir. Bu yönüyle çalışma, ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde doğrudan maruziyet esasına dayanan alternatif *in vitro* test stratejilerinin uygulanabilirliğini ortaya koymayı, mevcut bilgi boşluğunu azaltmayı ve gelecekte bu ürün gruplarına yönelik biyouyumluluk değerlendirme yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Elde edilen verilerin, hem düzenleyici değerlendirmelere hem de ekstrakte edilemeyen tıbbi

cihazlara yönelik alternatif test yöntemlerinin bilimsel altyapısının güçlendirilmesine katkı sunması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Cihaz Tanımı ve Yasal Düzenlemelerin Gelişimi

Avrupa birliği tarafından yayımlanan 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği yönetmeliğine göre tıbbi cihaz insanlarda birden fazla spesifik tıbbi amacı gerçekleştirmek için tasarlanmış bir alet, cihaz, aygıt, yazılım, implant, reaktif, malzeme veya diğer maddeler olarak tanımlanmaktadır. Tıbbi cihazlar insanlarda hastalığın teşhisi, tedavisi, izlenmesi prognozu, önlenmesi gibi çok çeşitli tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu tanım yalnızca tedavi edici araçları değil; gebelik kontrolü ve desteklenmesi için olan cihazlar ile belirli grup cihazların temizlenmesi, dezenfeksiyonu veya sterilizasyonu için özel olarak tasarlanmış ürünleri de kapsayacak şekilde düzenlenmiştir (7, 14).

Günümüzde tıbbi cihazların güvenli, etkin ve kontrollü bir şekilde piyasaya arz edilebilmesi, kapsamlı yasal düzenlemelere uyum sağlanmasını zorunlu kılmaktadır. Hasta güvenliğini merkeze alan bu düzenleyici çerçeveler, ülkeler arasında tarihsel gelişim süreçleri bakımından farklılık göstermekle birlikte, genel olarak ortak güvenlik, performans ve kalite gerekliliklerini hedeflemektedir. Bu kapsamda ürünlerin uluslararası kabul görmüş standartlara uygun şekilde tasarlanması ve üretilmesi, ürün güvenliğinin yetkin uzmanlar tarafından bilimsel ve teknik açıdan değerlendirilmesi ve yetkili otoriteler tarafından risk temelli kontrol mekanizmalarının uygulanması temel düzenleyici prensipler arasında yer almaktadır (15, 16).

Tıbbi cihazlara ilişkin modern düzenleyici yaklaşımın gelişimi, özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren artan teknolojik çeşitlilik, ürün karmaşıklığı ve klinik kullanım alanlarının genişlemesi ile hız kazanmıştır. Bu süreçte Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği, tıbbi cihaz güvenliğine yönelik en kapsamlı düzenleyici sistemleri geliştiren iki ana yapı olarak öne çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde İlaç ve Gıda Örgütü (Food and Drug Administration, FDA) tarafından yürütülen düzenleyici sistem, özellikle 1976 Medical Device Amendments ile birlikte risk temelli sınıflandırma, premarket değerlendirme ve piyasa sonrası gözetim mekanizmalarını içeren sistematik bir yapıya kavuşmuştur. Avrupa Birliği'nde ise tıbbi cihazlara ilişkin düzenlemeler, 1990'lı yıllardan itibaren kademeli olarak

gelişmiş; Medical Device Directives (MDD) ile başlayan süreç, günümüzde 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (Medical Device Regulation, MDR) ve 2017/746 sayılı İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (IVDR) ile daha güçlü, daha şeffaf ve daha izlenebilir bir yapıya evrilmiştir (17-23).

Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri düzenleyici sistemleri arasındaki bu gelişim süreci, uluslararası düzeyde harmonizasyon ihtiyacını da beraberinde getirmiştir. Bu bağlamda Uluslararası Tıbbi Cihaz Regülatörleri Forumu (IMDRF) ve Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) gibi kuruluşlar, ortak terminoloji, risk sınıflandırması ve biyoyumluluk değerlendirme kriterlerinin oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle ISO 10993 serisi standartlar, tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde küresel ölçekte kabul gören temel referans dokümanlar arasında yer almaktadır (6, 15, 24, 25).

Türkiye açısından değerlendirildiğinde, tıbbi cihaz mevzuatının Avrupa Birliği düzenlemeleri ile uyumlu hale getirilmesi süreci önemli bir dönüşüm göstermiştir. Bu kapsamda Türkiye, Avrupa Birliği teknik mevzuatına uyum çerçevesinde tıbbi cihazlara ilişkin ulusal düzenlemelerini güncelleyerek MDR ile uyumlu bir yapıya yaklaşmıştır. Bu uyum süreci, hem ürün güvenliği standartlarının yükseltilmesini hem de uluslararası pazara erişimin kolaylaştırılmasını hedeflemektedir (4, 17).

Sonuç olarak, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde tıbbi cihazlara ilişkin düzenleyici yapıların tarihsel gelişimi, günümüzde uluslararası standartların oluşturulması ve uygulanmasında küresel bir harmonizasyonun önemini ortaya koymaktadır. Bu durum, tıbbi cihazların güvenliğinin yalnızca ulusal düzeyde değil, aynı zamanda uluslararası standartlar çerçevesinde ele alınmasının gerekliliğini açıkça göstermektedir (15, 25).

2.1.1. Amerika'da Yasal Düzenlemelerin Gelişimi

Amerika Birleşik Devletleri'nde tıbbi cihazlara yönelik düzenleyici yaklaşımın gelişimi uzun bir tarihsel süreci kapsamaktadır. 19. yüzyılın sonlarında tıbbi cihazların güvenliği ve etkinliğine ilişkin yeterli kontrol mekanizmalarının bulunmadığına yönelik endişeler ortaya çıkmıştır. Tıbbi cihazların posta yoluyla dağıtımı sırasında

değerlendirilmesine yönelik sınırlı denetim mekanizmaları bulunmasına rağmen, bu uygulamalar tıbbi cihazların güvenliğini sağlamada yeterli olmamıştır (21, 22).

1906 yılında yürürlüğe giren “Pure Food and Drug Act”, gıda ve ilaçların sahteciliğini önlemeye yönelik önemli bir adım olsa da tıbbi cihazları kapsamamaktadır. Tıbbi cihazlara ilişkin düzenleyici yetkiler ilk kez 1938 tarihli Food, Drug and Cosmetic Act ile genişletilmiştir. Bu yasa ile ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tıbbi cihazlar üzerinde belirli bir yetkiye sahip olmuş, ancak bu yetki yanlış etiketleme ve sahtecilik gibi durumların denetlenmesi ile sınırlı kalmıştır. FDA’ye tıbbi cihazların güvenliği ve etkinliğinin pazara sunulmadan önce değerlendirmesine yönelik kapsamlı bir yetki tanımlanmamıştır (19, 22).

Aralık 1969’da tıbbi cihazlara ilişkin standartların oluşturulması ve cihazların pazara sunulmadan önce değerlendirilmesine yönelik prosedürlerin oluşturulması amacıyla Tıbbi cihazlar çalışma grubu kurulmuştur. Çalışma grubu tarafından hazırlanan raporda tıbbi cihazların insan vücudu ile etkileşimine ilişkin birçok alanda veri eksikliği bulunduğu ve cihazların güvenliği ile performansına ilişkin iddiaların yeterli bilimsel kanıtlarla desteklenmeden kabul edildiği ifade edilmiştir. Raporda ayrıca tıbbi cihazların risk düzeyine göre sınıflandırılması, pazarlama öncesi değerlendirme mekanizmalarının oluşturulması ve standart geliştirme süreçlerinde uzmanların görev alması önerilmiştir. Bu rapor doğrultusunda FDA tıbbi cihazların envanterini oluşturmaya ve piyasada bulunan cihazları sınıflandırmaya başlamıştır. Bununla birlikte bu süreçte kalp kapakçıkları ve kalp pilleri ile ilişkili ölüm vakaları, arızalı parçalar içeren bazı cihazların piyasada bulunması ve bazı rahim içi kontraseptif (Dalkon Shield vakası gibi) cihazların kullanımı sonrasında ölüm, enfeksiyon ve düşük vakalarının bildirilmesi gibi tıbbi cihazlarla ilişkili istenmeyen olayların yaşanması yasal düzenlemelere olan ihtiyacı ortaya koymuştur. Bu olaylar doğrultusunda 1976 Medical Device Amendments yürürlüğe girmiştir. Bu düzenleme ile tıbbi cihazlar risk düzeylerine göre üç sınıfa ayrılmış ve yüksek riskli cihazlar için pazarlama öncesi değerlendirme süreçleri tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda tıbbi cihaz mevzuatı çeşitli değişikliklerle geliştirilmiş ve FDA’nın tıbbi cihazların güvenliği ve performansına yönelik denetim kapasitesi güçlendirilmiştir (15, 19, 20, 22). Tıbbi cihazların sınıflandırılması Şekil 2.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. FDA'ya göre tıbbi cihazların sınıflandırılması.

Modern Döneme Geçiş ve Standartların Rolü

ABD'de 1976'da yayınlanan Tıbbi Cihaz Değişiklikleri Yasası (Medical Device Amendments) sonrasında tıbbi cihaz mevzuatı çeşitli düzenlemeler ile geliştirilmiştir. 1990'da yayınlanan Güvenli Tıbbi Cihazlar Kanunu (Safe Medical Devices Act) ile advers olay bildirim sistemi güçlendirilmiş, 2007 FDA Değişiklikler Yasası (FDA Amendments Act - FDAAA) ve 2012 FDA Güvenlik ve İnovasyon Yasası (FDA Safety and Innovation Act - FDASIA) ile FDA'nın düzenleyici yetkileri genişletilmiştir (20, 21, 26).

Tıbbi cihaz üreticilerinin cihazlarını, "önceki bir cihazla önemli ölçüde eşdeğerlik" göstererek pazara sunmaları süreci 1990 yılındaki düzenlemeler ile resmileşmiştir. Bu süreçte FDA'nın iş yükündeki artış ve kaynak kısıtı gibi hususlar ürün değerlendirme sürecinde iyileştirme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla 1997 yılında Modernizasyon Yasası (FDAMA) oluşturulmuş ve uluslararası kuruluşlar (ISO, ASTM vb.) tarafından geliştirilen bazı standartların "Tanınmış Fikir Birliği Standartları" (Recognized Consensus Standards) olarak kabul edilmesinin yolu açılmıştır. Yapılan bu düzenlemeler ile tıbbi cihazların güvenlik ve performans değerlendirmesinde uluslararası standartlar önemli bir yere sahip olmuştur (22, 27).

Buna ilave olarak 2024 yılı itibarıyla FDA kendi kalite sistemini uluslararası ISO 13485 standardı ile tam uyumlu hale getirme kararı almış ve 2 şubat 2026 tarihinde uyumlu hale getirmiştir. Bu düzenleme regülatif sistemlerin uluslararası teknik standartlar üzerinden birleştiğini göstermektedir (22, 28).

2.1.3. Avrupa Birliği'nde Tıbbi Cihazlara Yönelik Yasal Düzenlemelerin Gelişimi

Avrupa Birliği'nde tıbbi cihazlara yönelik yasal düzenlemeler, hem hasta güvenliğini sağlamak hem de üye devletlerarasında ürünlerin serbest dolaşımını mümkün kılmak amacıyla zaman içinde gelişmiştir. Bu sürecinin temel hedeflerinden biri olan tek pazarın oluşturulması, sağlık teknolojileri ve tıbbi cihazlar için ortak bir düzenleyici çerçeve oluşturulmasını gerekli kılmıştır. Bu doğrultuda tıbbi cihaz mevzuatı, başlangıçta ulusal düzenlemelerin uyumlaştırılması amacıyla geliştirilen direktifler aracılığıyla şekillenmiş, daha sonra ise daha kapsamlı ve bağlayıcı düzenlemeler olan yönetmeliklere dönüşmüştür (4, 22, 26).

Hasta güvenliği açısından yeterli olmayan ve Avrupa içinde serbest dolaşımını zorlaştıran bu düzen içerisinde bazı tıbbi cihaz arızaları ve güvenlik sorunları özellikle kalp kapakçıkları ve kalp pili gibi implantable edilebilir cihazlarda yaşanan güvenlik problemleri, yasalarda düzenleme yapılması gereğini hızlandırmıştır. Avrupa Birliği'nde tıbbi cihazlara yönelik ilk kapsamlı düzenleme 1990 yılında kabul edilen 90/385/EEC sayılı Aktif İmplant Edilebilir Tıbbi Cihazlar Direktifi (AIMDD) olmuştur. Bu direktif özellikle kalp pili gibi vücuda yerleştirilen aktif cihazların güvenliği ve performansına ilişkin temel gereklilikleri belirlemiştir. Bunu takiben 1993 yılında 93/42/EEC sayılı Tıbbi Cihazlar Direktifi (MDD) kabul edilmiş daha geniş bir tıbbi cihaz yelpazesi için düzenleyici çerçeve oluşturulmuştur. Bu direktif aynı zamanda Avrupa iç pazarında tıbbi cihazların serbest dolaşımını kolaylaştırmayı amaçlamıştır (17, 18, 22).

Tıbbi cihaz teknolojilerinin gelişmesi ve tanı testlerinin sağlık sistemlerindeki öneminin artmasıyla birlikte 1998 yılında 98/79/EC sayılı İn Vitro Tanı Tıbbi Cihazları Direktifi (IVDD) yürürlüğe girmiştir. Böylece Avrupa Birliği'nde tıbbi cihaz mevzuatı üç temel direktif üzerine kurulmuştur: aktif implante edilebilir cihazlar, tıbbi cihazlar ve *in vitro* tanı cihazları (4, 17, 22).

Avrupa Birliği'nde 2010'lu yıllarda ortaya çıkan bazı önemli güvenlik sorunları, tıbbi cihazlara yönelik düzenleyici sistemin yeniden yapılandırılmasını gerekli hale getirmiştir. Özellikle Poly Implant Prothèse (PIP) silikon meme implantlarına ilişkin kalite ve güvenlik problemleri ile metal-metal kalça protezlerinde

bildirilen olumsuz klinik sonuçlar, mevcut direktif temelli sistemde piyasa gözetimi, uygunluk değerlendirme süreçleri ve pazara sonrası izleme mekanizmalarında önemli eksiklikler bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu gelişmeler doğrultusunda Avrupa Birliği, tıbbi cihaz mevzuatını daha güçlü, şeffaf ve doğrudan uygulanabilir bir yasal çerçeveye dönüştürmeyi amaçlamıştır. Bu kapsamda Avrupa Parlamentosu ve Konseyi tarafından (EU) 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (Medical Device Regulation, MDR) ve (EU) 2017/746 sayılı İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (*In Vitro* Diagnostic Medical Device Regulation, IVDR) kabul edilmiştir.

Söz konusu yeni düzenlemeler ile birlikte önceki direktif yapısı yerini daha kapsamlı bir regülasyon sistemine bırakmış; klinik değerlendirme ve klinik kanıt gereklilikleri önemli ölçüde artırılmış, piyasa sonrası gözetim ve vigilans sistemleri güçlendirilmiş, üreticilerin sorumlulukları genişletilmiş ve ürün yaşam döngüsü boyunca izlenebilirliği artırmaya yönelik EUDAMED veri tabanı gibi dijital altyapılar oluşturulmuştur. Ayrıca yüksek riskli tıbbi cihazların değerlendirme süreçlerine bağımsız uzman panellerinin dâhil edilmesi gibi ek kontrol mekanizmaları ile hasta güvenliğinin daha etkin şekilde sağlanması hedeflenmiştir (18, 22, 29, 30).

Avrupa Birliği'nde tıbbi cihaz mevzuatı, başlangıçta tek pazarın oluşturulması amacıyla geliştirilen direktifler temelinde şekillenmiş, ancak zaman içinde hasta güvenliği, klinik kanıt gereklilikleri ve piyasa gözetimi konularındaki ihtiyaçlar doğrultusunda daha kapsamlı bir düzenleyici sisteme dönüşmüştür. Günümüzde MDR ve IVDR ile oluşturulan çerçeve, tıbbi cihazların güvenliğini artırmayı ve Avrupa sağlık sistemlerinde kullanılan cihazların klinik performansına ilişkin daha güçlü kanıtların oluşturulmasını hedeflemektedir (30, 31).

Avrupa Birliği Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR 2017/745), cihazların güvenlik ve performansının kanıtlanmasında uyumlaştırılmış standartların kullanılmasını teşvik etmektedir. Tıbbi cihazların biyoyumluluk değerlendirmesi, uluslararası standartlar ve test rehberleri tarafından tanımlanan bilimsel yöntemlere dayanmaktadır. Bu kapsamda biyoyumluluk değerlendirmesinde en yaygın kullanılan standart serisi ISO 10993 “Medical devices – Biological evaluation of medical devices” olup cihazların biyolojik risklerinin sistematik olarak değerlendirilmesine yönelik bir çerçeve sunmaktadır (6, 10, 24).

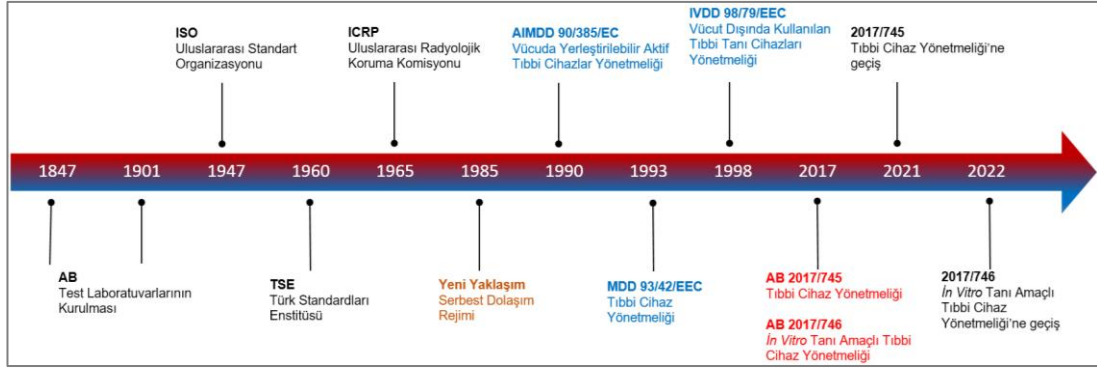
2.1.4. Türkiye'nin Avrupa Birliği Tıbbi Cihaz Mevzuatına Uyum Süreci

Türkiye'de tıbbi cihazlara yönelik düzenleyici çerçevenin gelişimi büyük ölçüde Avrupa Birliği mevzuatıyla uyum süreci kapsamında şekillenmiştir. Türkiye'nin Avrupa Birliği ile ilişkilerinde önemli bir dönüm noktası olan 1996 yılında yürürlüğe giren Gümrük Birliği, teknik mevzuat alanında uyum çalışmalarının hızlanmasına zemin hazırlamıştır. Bu süreçte Türkiye, Avrupa Birliği'nin ürün güvenliği ve serbest dolaşım ilkeleri doğrultusunda tıbbi cihazlara ilişkin düzenlemelerini ulusal mevzuata aktarmaya başlamıştır (4, 17, 22, 32).

Bu kapsamda Avrupa Birliği'nin tıbbi cihazlara ilişkin üç temel direktifi olan 90/385/EEC sayılı Aktif İmplant Edilebilir Tıbbi Cihazlar Direktifi, 93/42/EEC sayılı Tıbbi Cihazlar Direktifi ve 98/79/EC sayılı *in vitro* Tanı Tıbbi Cihazları Direktifi, Türkiye'de ulusal mevzuata uyarlanmıştır. Böylece Türkiye'de piyasaya arz edilen tıbbi cihazların Avrupa Birliği ile uyumlu güvenlik, performans ve uygunluk değerlendirme gerekliliklerini karşılaması hedeflenmiştir (4, 32).

Avrupa Birliği'nde tıbbi cihaz mevzuatının 2017 yılında yayımlanan (EU) 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) ve (EU) 2017/746 sayılı *in vitro* Tanı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (IVDR) ile yeniden düzenlenmesinin ardından Türkiye de mevzuat uyum sürecini sürdürmüş ve söz konusu yönetmeliklere paralel düzenlemeleri yürürlüğe koymuştur. Bu kapsamda Türkiye'de Tıbbi Cihaz Yönetmeliği ve *in vitro* Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği yayımlanarak Avrupa Birliği mevzuatı ile büyük ölçüde uyum sağlanmıştır. Bu düzenlemeler ile birlikte Türkiye'de tıbbi cihazların güvenliği, klinik değerlendirme gereklilikleri, piyasa gözetimi ve izleme mekanizmaları Avrupa Birliği sistemine paralel şekilde yapılandırılmıştır (4, 32).

Günümüzde Türkiye'de tıbbi cihazların düzenlenmesi ve denetlenmesi görevini Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) yürütmekte olup, kurum Avrupa Birliği mevzuatıyla uyumlu bir düzenleyici sistem oluşturulması ve uygulanmasından sorumludur. Tıbbi cihazlara ilişkin yasal düzenlemelerin ortaya çıkış süreci Şekil 2.2.'de verilmiştir (4).



Şekil 2.2. Tıbbi cihazlara ilişkin yasal düzenlemelerin ortaya çıkış süreci (4).

Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ve Türkiye’de tıbbi cihazlara yönelik düzenleyici sistemler farklı yapısal özellikler taşımakla birlikte, uluslararası standartlar düzenleyici süreçlerde önemli bir referans çerçevesi olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde tıbbi cihazların düzenlenmesinden sorumlu olan Food and Drug Administration (FDA), cihazların güvenlik ve etkinliğini risk temelli bir yaklaşım doğrultusunda değerlendirmekte ve bu süreçte uluslararası teknik standartlardan yararlanmaktadır (19, 27, 28).

Avrupa Birliği’nde tıbbi cihaz düzenlemeleri, (EU) 2017/745 sayılı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) ve (EU) 2017/746 sayılı İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (IVDR) kapsamında yürütülmekte olup, “Yeni Yaklaşım (New Approach)” prensibi doğrultusunda mevzuat temel güvenlik ve performans gerekliliklerini tanımlarken, teknik ayrıntılar uyumlaştırılmış standartlar aracılığıyla karşılanmaktadır. Türkiye’de ise tıbbi cihaz mevzuatı, Avrupa Birliği düzenlemeleri ile büyük ölçüde uyumlu şekilde yapılandırılmış olup, teknik gerekliliklerin karşılanmasında uluslararası standartlar önemli bir referans teşkil etmektedir. Bu nedenle, uluslararası düzeyde uygulama birliğinin sağlanması ve hastalara güvenli, etkin ve kaliteli ürünlerin sunulabilmesi açısından tıbbi cihazlara yönelik standartların geliştirilmesi, uyumlaştırılması ve etkin şekilde uygulanması büyük önem taşımaktadır (4, 22, 33).

Bu bağlamda tıbbi cihazların biyoyumumluluk değerlendirmesi, uluslararası standartlar tarafından tanımlanan test yöntemleri doğrultusunda gerçekleştirilmekte olup özellikle ISO 10993 serisi, biyolojik risk değerlendirmesinde temel referans çerçeveyi oluşturmaktadır. Tıbbi cihazların güvenliğinin ve performansının

değerlendirilmesi, küresel ölçekte uyumlu düzenleyici yaklaşımların ve ortak teknik standartların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Uluslararası kuruluşlar tarafından geliştirilen standartlar, farklı ülkelerdeki düzenleyici otoriteler tarafından tanınarak tıbbi cihazların değerlendirilmesinde ortak bir bilimsel çerçeve oluşturulmasına katkı sağlamaktadır. Özellikle biyouyumluluk değerlendirmesinde kullanılan ISO 10993 serisi standartlar, cihazların biyolojik risklerinin sistematik bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanıyan uluslararası kabul görmüş bir referans sistemi sunmaktadır. Bu standartların geliştirilmesi ve uygulanması, hem hasta güvenliğinin artırılması hem de küresel tıbbi cihaz pazarında düzenleyici uyumun sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, mevcut çalışmada tıbbi cihazların biyouyumluluk değerlendirmesinde kullanılan *in vitro* test yöntemlerinin uluslararası standartlar çerçevesinde incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır (6, 10, 34).

2.2. Bir Ürünün Tıbbi Cihaz Olarak Tanımlanması

Cihazın tıbbi amacının ve temel etki şeklinin belirlenmesi ürünün sınıfının belirlenmesinden önce netleştirilmesi gereken temel bir husustur. Temel etki şekli cihazın belge alması amacıyla hangi yönetmelik kapsamında değerlendirileceğinin belirlenmesini sağlar. Tıbbi cihazlar belirlenen tıbbi amaçlarını esas olarak fiziksel veya mekanik yollarla sunarlar. Tıbbi cihazların etki şeklinden farklı olarak ilaçlar ise reseptöre bağlanma, enzim aktivasyonu veya inhibisyonu gibi hücresel düzeyde gerçekleşen etkileşimler aracılığıyla farmakolojik, immünolojik veya metabolik yolları kullanarak fizyolojik fonksiyonların düzeltilmesini, iyileştirilmesini veya modifiye edilmesini sağlarlar. Bu mekanizma farklılığı bir ürünün ilaç mı tıbbi cihaz mı olduğunu belirlemede göz önünde bulundurulacak temel noktadır (7, 35, 36).

Bazı durumlarda tıbbi amacı gerçekleştirmek için tıbbi cihaz ve ilaç bir araya getirilir. Bu durumda ürünün piyasaya arz edilebilmesi amacıyla uygulanacak olan değerlendirme yöntemini ve uygun yönetmeliği belirlemek için ürünün asli etkisini mekanik ve fiziksel olarak mı yoksa farmakolojik, immünolojik veya metabolik olarak mı gösterdiği netleştirilmelidir. Bu amaçla ilaç etken maddesi bir tıbbi cihaza ilave edildiğinde ürünün asli etki mekanizmasının belirlenmesi amacıyla eklenen etken maddenin miktarı ve insan vücudu tarafından ne kadarının, nasıl kullanıldığı dikkate alınır. Ürünün hangi gruba dâhil olduğu belirlendikten sonra, pazara sunulmadan önce

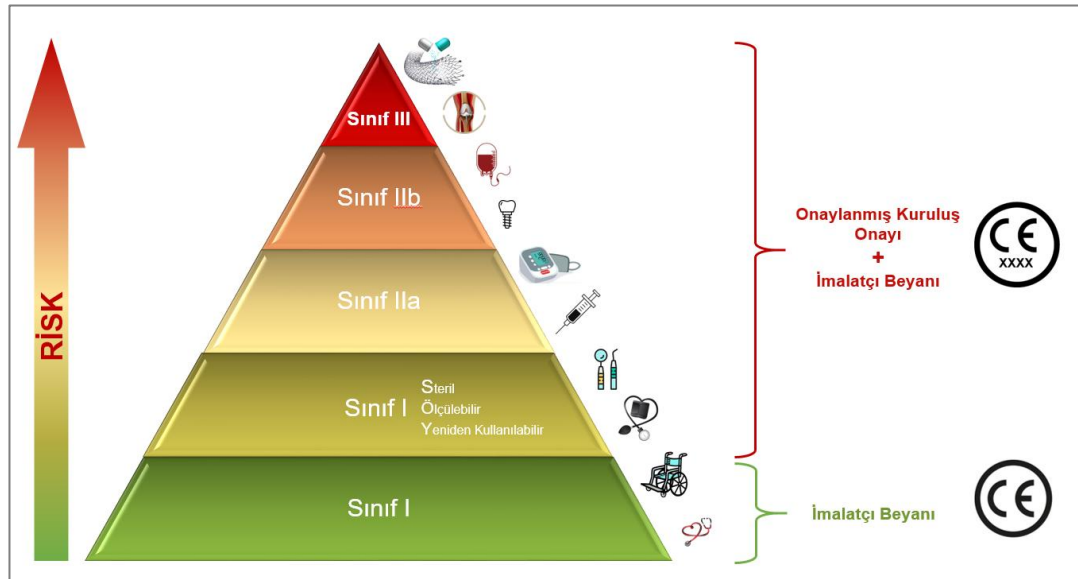
değerlendirilmesi için tıbbi cihaz yönetmeliği veya beşeri tıbbi ürünler yönetmeliğine göre uygunluğu kontrol edilir (7, 35).

Ürünün tıbbi cihaz veya ilaç olduğunu belirlemek için insan üzerinde kullanıldığında hedeflenen tıbbi etkisini hangi yollarla gösterdiği değerlendirilir. Temel etki şeklinin tespit edilmesi tıbbi cihaz ve ilacın kombine edildiği ürünlerin sınıflandırılmasında kritik bir rol oynamaktadır (35). Buna örnek olarak ilaç içeren kemik çimentoları ve dermal dolgular verilebilir. Kemik çimentosu eklem ve kemik rekonstrüksiyonu, kırık tespiti ve osteoporozla bağlı vertebra kırıklarının tedavisinde uzun yıllardır kullanılan bir tıbbi cihazdır. Farklı hammaddelerden farklı viskozitede üretilebilir. Akrilik kemik çimentoları toz ve sıvı olmak üzere iki bileşenden oluşur. İçerdikleri kimyasallar sonucunda toz ve sıvı karıştırıldığında bir kimyasal tepkime meydana gelir ve yoğunluğu gittikçe artar. Kemik kaybının olduğu alana uygulanan kemik çimentosu gittikçe katılaştır ve kemikteki boşluğun doldurulmasını sağlayarak fiziksel ve mekanik bir destek sağlar (37). Bazı durumlarda operasyon sonrası enfeksiyon riskinin azaltılması için antibiyotikli kemik çimentosu tercih edilir (38). Bu amaçla kemik çimentosuna belirlenen doz aralığına uygun olarak bir antibiyotik eklenir. Antibiyotiğin eklenmesindeki amaç enfeksiyon riskini önlemek ve kemik çimentosunun insan vücudu ile olan uyumunu kolaylaştırmak ise ürün tıbbi cihaz olarak değerlendirilebilir. Ürünün asli etkisinin fiziksel ve mekanik olması ve ilave edilen antibiyotiğin yalnızca cihazın kullanım amacını destekler nitelikte olması bu sınıflandırmadaki gerekçedir (9, 35, 36).

Tıbbi cihaz yönetmeliği uyarınca tıbbi cihazlar kullanım amacı ve içerdiği riskler değerlendirilerek sınıf I, I-s, I-m, I-r, IIa, IIb veya III olarak sınıflandırılır. Bir cihazın sınıfının belirlenmesinde spesifik tıbbi amacı, kullanım süresi, invaziv olup olmaması, aktif veya non-aktif bir cihaz olması, implante edilebilir olması, ölçüm özelliğine sahip olması gibi hususlar göz önünde bulundurulur. Tıbbi cihazların sınıflandırılmasındaki bu farklılık, cihazın piyasa arz edilmeden önce uygunluğunun değerlendirilmesindeki süreçleri etkilemektedir (7, 14).

2.2.1. Tıbbi Cihaz Sınıfları ve Uygunluk Değerlendirmesi

Tıbbi cihazların sınıflandırılmasına daha yakından bakıldığında değerlendirilmede dikkate alınan belirli hususlar vardır. Cihazlar kullanım amacı, kullanıldığı bölge ve süre, içerdiği riskler dikkate alınarak sınıf I, IIa, IIb veya III şeklinde sınıflandırılır (Şekil 2.3) (7, 9, 14).



Şekil 2.3. Tıbbi cihaz sınıfları (4, 7, 9).

Kullanım süresi bir cihazın devamlı kullanıldığı zaman aralığını ifade eder. Kullanıldığı zaman aralığına bağlı olarak cihazlar geçici, kısa süreli ve uzun süreli olarak tanımlanır. Belirli durumlarda kullanım süresi cihazın etki ettiği süreyi de kapsamaktadır. Örneğin deriye uygulanan bir krem uzun süre bozulmadan bölgede kalabilir. Bu nedenle kullanım süresi cihazın vücut içerisinde veya üzerinde kaldığı süreyi de ifade etmektedir. Süre hesaplanırken cihazın kullanımına geçici olarak ara verilmesine ya da başka bir cihazla değiştirilmesine bakılmaksızın toplam kullanım süresi dikkate alınır. Örneğin kullanılan üriner kateterin aynı veya özdeş bir cihazla değiştirilmesi cihazın devamlı kullanımının bir parçası olarak değerlendirilir. Eğer iki cihazın kullanımı arasında ilk cihazın kullanımına tamamen son verilmiyorsa bu cihazın değiştirilmesi devamlı kullanımının bir parçasıdır (9).

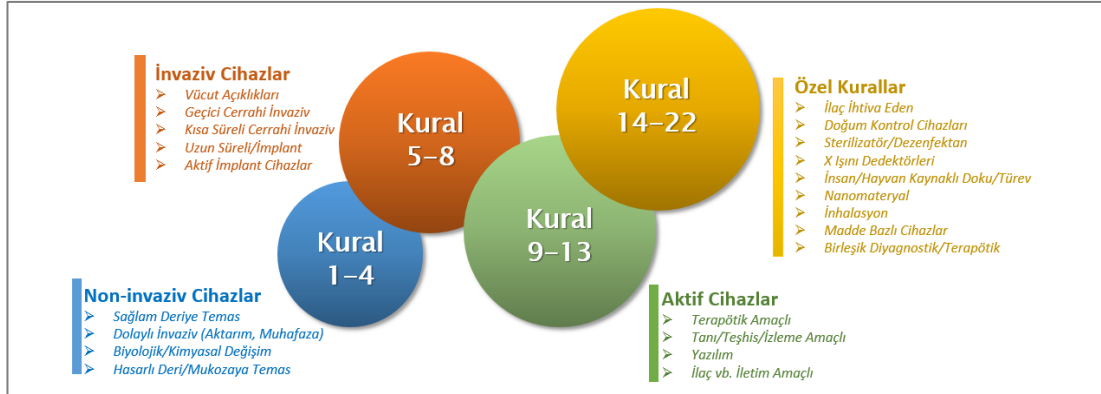
Cihazlar 60 dakikadan az kullanılıyorsa geçici süreli tıbbi cihaz olarak değerlendirilir. Örneğin cerrahi operasyonlarda kesik oluşturmak amacıyla kullanılan neşter geçici süreli cihaz olarak değerlendirilir. 60 dakikan uzun ve 30 günden az

kullanılıyorsa kısa süreli, 30 günden fazla kullanılıyor ise uzun süreli olarak değerlendirilir. Örneğin kemik kırığının tedavisi için yerleştirilen ve 30 günden fazla kalan plaklar uzun süreli kullanıma örnek olarak verilebilir (7, 9). Tıbbi cihaz kullanım süresine göre değerlendirmeler Tablo 2.2.'te verilmiştir.

Tablo 2.1. Tıbbi cihaz kullanım süresi (7, 9).

| Uzun Süreli Kullanım | Kısa süreli Kullanım | Geçici Kullanım |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| >30 gün | 60 dakika- 30 gün | <60 dakika |

Tıbbi cihaz sınıflandırmasında dikkate alınan diğer önemli kriterler arasında cihazın invaziv veya cerrahi invaziv olması, implante edilebilir nitelikte bulunması, aktif bir cihaz olup olmadığı ve ölçüm fonksiyonu taşıyıp taşımadığı gibi özellikler yer almaktadır. Bu özellikler, belirli sınıflandırma kuralları çerçevesinde sistematik olarak değerlendirilmekte ve kategorize edilmektedir. Tıbbi Cihaz Yönetmeliği kapsamında bu kriterlere dayalı olarak tanımlanmış 22 adet sınıflandırma kuralı bulunmaktadır. Bir cihaza hangi sınıflandırma kuralının uygulanacağını belirlemek, cihazın kullanım amacı, kullanım süresi, vücut ile temas ettiği anatomik bölge ve aktif cihaz olup olmaması gibi çok boyutlu parametrelerin birlikte değerlendirilmesini gerektiren kapsamlı bir süreçtir. Sınıflandırma sürecinde bu kriterler her zaman kesin sınırlarla birbirinden ayrılmayabilir ve bazı cihazlar birden fazla kuralın kapsamına girebilir. Bu gibi durumlarda, cihazın risk düzeyini daha iyi yansıtan ve daha yüksek risk sınıfına yol açan en koruyucu yaklaşımın benimsenmesi, yani en katı kuralın uygulanması esas alınmaktadır. Bu yaklaşım, hasta güvenliğinin en üst düzeyde sağlanmasını amaçlayan risk temelli sınıflandırma sisteminin temel prensiplerinden birini oluşturmaktadır (7, 9, 14, 39). Tıbbi cihaz sınıflandırma kuralları Şekil 2.4.'te verilmiştir.



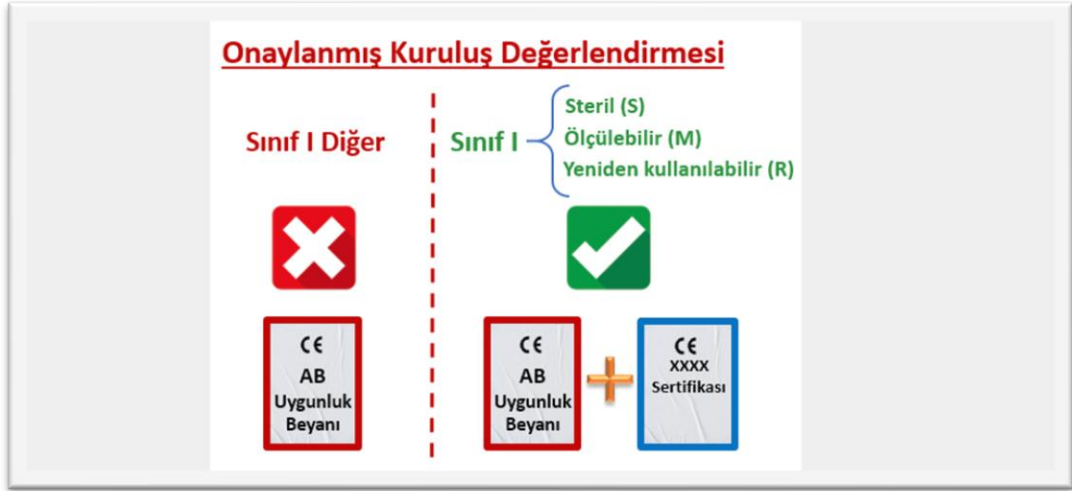
Şekil 2.4. Tıbbi cihaz sınıflandırma kuralları (7, 9).

Sınıf I tıbbi cihazlar düşük riskli cihazlar olarak kategorize edilirler. Genellikle invaziv değildir ve geçici olarak kullanılırlar. Düşük risk profili nedeniyle sınıf I cihazlar yüksek riskli cihazlara göre daha az düzenleyici gerekliliklere tabidir (7, 9, 14). Bu sınıfa tabi örnekler Şekil 2.5.'de verilmiştir.



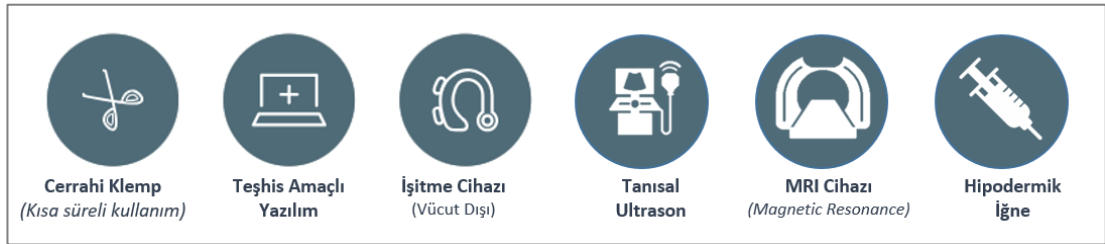
Şekil 2.5. Sınıf I tıbbi cihaz örnekleri (5, 7, 9, 40).

Sınıf I tıbbi cihaz üreticileri, onaylanmış kuruluşa başvurmaksızın hazırladıkları teknik dokümantasyon ve düzenledikleri AB uygunluk beyanı (EU Declaration of Conformity) ile ürünlerini piyasaya arz edebilmektedir. Ancak, cihazın ölçüm fonksiyonu taşıması (Sınıf I-m), steril halde piyasaya arz edilmesi (Sınıf I-s) veya tekrar kullanılabilir cerrahi alet niteliğinde olması (Sınıf I-r) durumlarında, bu spesifik özelliklere ilişkin uygunluk değerlendirme süreçlerine onaylanmış kuruluşun (Notified Body) dahil olması yasal bir zorunluluk teşkil etmektedir. Bu kapsamda, söz konusu cihazların yalnızca temel sınıf I değerlendirme prosedürüne göre değil, ilgili ek gereklilikler doğrultusunda daha kapsamlı bir uygunluk değerlendirme sürecinden geçirilmesi gerekmektedir (7). Sınıf I cihazlar için onaylanmış kuruluş değerlendirme gerekliliği Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



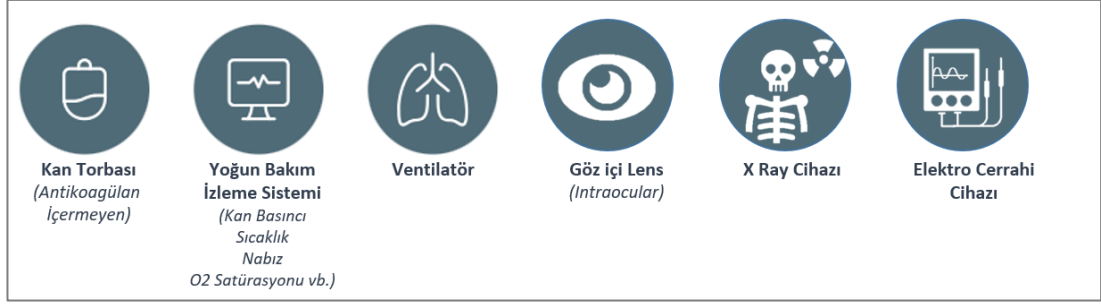
Şekil 2.6. Sınıf I cihazlar için onaylanmış kuruluş değerlendirme gerekliliği (4, 7).

Sınıf IIa tıbbi cihazlar orta düzeyde risk taşımaktadır. Sınıf I cihazlardan daha yüksek ancak sınıf IIb ve III tıbbi cihazlardan daha düşük zarar verme riskine sahiptir. Sınıf IIa tıbbi cihazlar genel olarak geçici ve kısa süreli kullanım için tasarlanan cerrahi invaziv cihazlar, teşhis ve izleme amaçlı aktif tıbbi cihazlardır (Şekil 2.7.) (7, 9, 14).



Şekil 2.7. Sınıf IIa tıbbi cihaz örnekleri (5, 7, 9, 40).

Sınıf IIb tıbbi cihazlar sınıf IIa ve sınıf III cihazların arasındaki seviyede yer alan orta riskli cihaz grubudur. Bu cihazlar genellikle implante edilebilir, uzun süreli cerrahi invaziv cihazlar ve insan üzerindeki etkisinin daha riskli olduğu aktif cihazlardır. Hasta sağlığı üzerinde düşük riskli cihazlara nazaran daha büyük bir etkiye sahiptir (7, 9, 14). Şekil 2.8.'de sınıf IIb tıbbi cihaz örnekleri verilmiştir.



Şekil 2.8. Sınıf IIb tıbbi cihaz örnekleri (5, 7, 9, 40).

Sınıf III tıbbi cihazlar, tıbbi cihaz sınıflandırma sisteminde en yüksek risk kategorisini temsil etmektedir. Bu sınıf, aktif implante edilebilir tıbbi cihazları, uzun süreli cerrahi invaziv cihazları ve implante edilebilir tıbbi cihazları kapsamaktadır. Söz konusu cihazlar, insan vücudu ile uzun süreli ve kritik etkileşim içerisinde olduklarından, hasta güvenliği açısından potansiyel riskleri en yüksek seviyede değerlendirilmesi gereken ürün grubu olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle Sınıf III cihazlara yönelik mevzuat gereklilikleri oldukça sıkı olup, kapsamlı klinik değerlendirme, detaylı teknik dokümantasyon ve güçlü klinik kanıt zorunluluklarını içermektedir. Ayrıca bu cihazlar için uygunluk değerlendirme sürecinde onaylanmış kuruluşların (Notified Body) zorunlu katılımı bulunmaktadır ve değerlendirme süreci yüksek düzeyde denetim ve doğrulama mekanizmaları ile yürütülmektedir. Piyasa öncesi değerlendirme süreçlerine ek olarak, bu cihazlar için piyasa sonrası klinik takip (Post-Market Clinical Follow-up, PMCF) ve piyasa sonrası gözetim (Post-Market Surveillance, PMS) faaliyetleri de daha kapsamlı ve sürekli bir şekilde uygulanmaktadır. Böylece cihazın yaşam döngüsü boyunca güvenlik ve performansının izlenmesi ve olası risklerin erken aşamada tespit edilmesi amaçlanmaktadır (7, 9, 14). Sınıf III tıbbi cihaz örnekleri Şekil 2.9.'da belirtilmiştir.



Şekil 2.9. Sınıf III tıbbi cihazlar (5, 7, 9, 40).

Sınıf IIa, IIb ve III tıbbi cihaz üreticileri ürünlerini piyasaya arz etmeden önce uygunluğunun değerlendirilmesi için mutlaka bir onaylanmış kuruluşa başvurmak ve cihazları için bir AB uygunluk sertifikası almak zorundadır. Uygulanan bu prosedürler cihazın risk sınıfına göre farklılık gösterse de, yönetmeliğin Ek I genel güvenlik ve performans gereklilikleri, Ek II teknik dokümantasyon, ve Ek III piyasaya arz sonrası gözetime ilişkin teknik dokümantasyon gereklilikleri tüm tıbbi cihazlara uygulanır. Bununla birlikte imalatçı sınıf fark etmeksizin cihazının genel güvenlik ve performans gerekliliklerini karşıladığını göstermek amacıyla bir klinik değerlendirme yürütmelidir. Bu kapsamda tıbbi cihaz yönetmeliğinin madde 61 inde yer alan gereklilikleri doğrultusunda bir klinik değerlendirme gerçekleştirir. Bu klinik değerlendirmeyi piyasaya arz sonrası gözetim sistemi doğrultusunda güncellemelidir (7, 9, 41).

Cihazın sınıfından bağımsız olarak MDR madde 10, imalatçıların yükümlülüklerine dair bilgi vermektedir. Bu madde kapsamındaki genel yükümlülükleri, tıbbi cihazın güvenliğini garanti altına alan bütüncül bir yapı oluşturabilmektir. Özellikle Madde 10(9) uyarınca zorunlu kılınan Kalite Yönetim Sistemi, madde 10(4)'de belirtilen teknik dokümantasyon içeriği, Madde 10(2) ile tanımlanan Risk Yönetim Sistemi güvenilir ürünlerin piyasaya arzında temel karşılanması gereken hususlardır (7, 41).

Bu kapsamda imalatçılar bir risk yönetim sistemi kurmalı ve bunun sürdürülebilirliğini sağlamalıdır, ürünleri için piyasaya arz sonrası gözetim sistemini oluşturmalı, yönetmelikte yer alan gereklilikler doğrultusunda klinik değerlendirme gerçekleştirmelidir. Ürünlerine ait bir teknik dokümantasyon oluşturmalı, bu teknik dokümantasyon cihaz tanımı ve spesifikasyonları, cihazın veya ambalajının üzerindeki etiket ve kullanım talimatı, önceki ve benzer nesilleri, tasarım ve imalat süreçleri, genel güvenlik ve performans gereklilikleri, fayda-risk analizi, doğrulama ve validasyon testleri/çalışmaları gibi hususlar hakkında bilgi içermelidir (7, 42).

Buna ek olarak ciddi olumsuz olaylar, saha güvenliği düzeltici faaliyetleri, trend raporlaması, geri bildirimler, şikayetler ve benzeri hususların toplanmasını sağlayan bir piyasaya arz sonrası gözetim planı oluşturmalı ve bunun teknik dokümantasyonun bir parçası olmasını sağlamalıdır. İmalatçı ürünün genel güvenlik

ve performans gerekliliklerine uygunluğunu göstermek için doğrulama, validasyon testleri ve çalışmalar yürütmelidir (7, 41).

Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra imalatçının bir onaylanmış kuruluşa başvurması durumunda imalatçının oluşturduğu kalite yönetim sistemi, ürüne ait teknik dokümantasyon yönetmelik gereklilikleri doğrultusunda kontrol edilir. Bu değerlendirmeden geçen ürünlere onaylanmış kuruluş tarafından gerçekleştirilen uygunluk değerlendirme rotasına göre AB kalite yönetim sistemi sertifikası ve AB teknik dokümantasyon değerlendirme sertifikası ya da AB tip inceleme sertifikası düzenlenir (7, 15).

Bununla birlikte yeni yapılan yasal düzenlemeler ile Tıbbi cihaz yönetmeliği Ek XVI'da belirtilen tıbbi cihaz olmayan ürünler de Tıbbi cihaz yönetmeliği gerekliliğine tabi olmuştur. Bu ekte yer alan ürünlerin tıbbi amacı olmamakla birlikte performansı değerlendirilirken klinik faydasının gösterilmesi gerekmektedir. Yine bu cihazların yönetmeliğin gereği olan genel güvenliğinin ve performansının değerlendirilmesi ve bu kapsamda en son gelişmeler dikkate alınarak kabul edilebilir bir yarar/risk oranına sahip olduğunun gösterilmesi, hasta için güvenli olduğunun kanıtlanmasına yönelik değerlendirme süreçlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ek XVI'da listelenen bu ürün grupları için ortak spesifikasyonlar oluşturulmuştur. Ek XVI kapsamında yer alan ürün listesi değişebilmekle birlikte tıbbi amacı olmayan ürünler arasında kontak lensler, dermal dolgu ya da mukoz membran dolgusu olarak kullanılan maddeler, cilt yenileme için kullanılan lazerler yer almaktadır (7).

Tez kapsamında sınıf I (ultrason jeli), sınıf IIb (yara bakım jeli), sınıf III (dermal dolgular) olmak üzere farklı kategorilerden ekstrakte edilmeyen tıbbi cihaz örnekleri seçilmiştir. Dermal dolgu firmasının 3 farklı ürünü üzerinde çalışma yapılmıştır. İki ürün Hiyalüronik asit içerikli dermal dolgu, bir ürün ise yeni çalışmalar ile etkili olduğu değerlendirilen kalsiyum hidroksiapatit bazlı dermal dolgudur.

2.3. Biyouyumluluğun Yasal Gereklilikler Arasındaki Yeri

Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) kapsamında bir cihazın, normal kullanım koşulları altında kullanım amacına uygun olarak tasarlanması ve üretilmesi ile birlikte, öngörülen performansını güvenli bir şekilde yerine getirmesi beklenmektedir. Bu

çerçevede cihazların beklenen klinik ve fonksiyonel etkilerini gösterirken hasta sağlığı ve güvenliğini tehlikeye atmaması temel gereklilik olarak tanımlanmaktadır (7).

Bu doğrultuda imalatçılar, MDR ile birlikte tıbbi cihazın tüm yaşam döngüsünü kapsayan ve süreklilik arz eden etkin bir risk yönetim sistemi kurmak ve bu sistemi etkin biçimde sürdürmekle yükümlüdür. Risk yönetimi, yalnızca ürün geliştirme aşamasıyla sınırlı olmayıp tasarım, üretim, klinik değerlendirme ve piyasaya sonrası izlem süreçlerini de içeren bütüncül bir yaklaşım gerektirmektedir (41, 43).

Söz konusu sistem; cihaza yönelik bir risk yönetim planının oluşturulmasını, bilinen ve öngörülebilir tüm tehlikelerin sistematik olarak tanımlanması ve analiz edilmesini, hem amaçlanan kullanım hem de öngörülebilir yanlış kullanım senaryoları kapsamında ortaya çıkabilecek risklerin değerlendirilmesini ve bu risklerin fayda-risk dengesinin bilimsel olarak ortaya konulmasını içermektedir. Ayrıca tespit edilen risklerin uygun kontrol önlemleri ile azaltılması ve kalan artık risklerin kabul edilebilirlik kriterleri çerçevesinde sürekli olarak izlenmesi de bu sürecin ayrılmaz bir parçasıdır (7, 43-45).

Riskler imalatçılar tarafından yaşam döngüsü boyunca sistematik olarak izlenmekte ve yönetilmektedir. MDR kapsamında benimsenen risk yönetimi yaklaşımı, “risk kontrol hiyerarşisi” prensibine dayanmaktadır. Bu çerçevede risklerin öncelikle doğuştan güvenli tasarım (inherently safe design) yoluyla ortadan kaldırılması hedeflenmektedir. Risklerin tasarım aşamasında tamamen elimine edilemediği durumlarda, ikinci aşama olarak koruyucu önlemler devreye alınmakta ve teknik güvenlik çözümleri uygulanmaktadır. Bu kapsamda uyarı sistemleri, alarm mekanizmaları ve mühendislik kontrolleri gibi risk azaltıcı teknik önlemler kullanılmaktadır. Risklerin bu yöntemlerle de kabul edilebilir seviyelere indirilemediği durumlarda ise risk kontrol hiyerarşisinin son basamağı olan bilgi için güvenlik (information for safety) yaklaşımı uygulanmaktadır. Bu doğrultuda kullanıcı eğitimleri, kullanım kılavuzları ve uyarıcı bilgilendirmeler aracılığıyla kalan artık risklerin yönetilmesi sağlanmaktadır. Bu bütüncül yaklaşım, tıbbi cihazların güvenli tasarım, üretim ve kullanımını garanti altına almayı amaçlamaktadır (7, 43). Güvenli tasarımın temel bileşenlerinden biri olan biyoyumluluk, cihazın kullanım amacı ve uygulama bölgesiyle ilişkili risklerin değerlendirilmesinde merkezi bir rol

oyunmaktadır. Tıbbi cihazın insan vücuduyla etkileşimi sonucu oluşabilecek advers reaksiyonların minimize edilmesi güncel bilimsel verilere dayanan bir risk analiziyle mümkündür. Bununla birlikte yeni veya modifiye edilmiş bir tıbbi cihaz insan üzerinde klinik denemesi gerçekleştirilmeden önce klinik öncesi güvenlik değerlendirmesinden geçmelidir. Biyolojik uyumluluk testleri yani biyoyuymuluk değerlendirilmesi bu süreçte gerçekleştirilir. Temel testler genellikle sitotoksisite, irritasyon ve duyarlılığı içerir. Ancak buna ilave olarak ürün özelliklerine, kullanım amacına ve vücutla temasın türüne ve süresine bağlı olarak ek testler gerekebilir. Bu testler, cihazın mekanik ve fizyokimyasal özelliklerini, test materyalinin vücutla temas halindeyken ortaya çıkaracağı biyolojik yanıtı belirlemek için kullanılır (44-46).

Tıbbi cihazlara ilişkin klinik öncesi güvenlilik değerlendirmesinde, biyoyuymuluk risklerinin yönetilmesi ve ilgili test süreçlerinin planlanması amacıyla ISO 10993, “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi” standart serisi, ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin (USFDA) “Uluslararası Standart ISO 10993–1, “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi - Bölüm 1: Risk yönetimi süreci içinde değerlendirme ve test” dokümanı ve Japonya Sağlık, Çalışma ve Sosyal Refah Bakanlığı'nın (MHLW) “Üretim/Pazarlama Onayı Başvurusu İçin Gerekli Tıbbi Cihazların Biyolojik Güvenliğinin Değerlendirilmesine İlişkin Temel Kavramlar (Bildirim No. 0301–20, 2012)” test kılavuzu (MHLW, 2012) dokümanı genel olarak bilinmektedir. Bunlara ek olarak cihaza veya başvurulacak bölgeye özgü farklı standartlar, kılavuzlar, rehber dokümanlar uygulanabilir. Bu nedenle imalatçı tarafından gereklilikler detaylı bir şekilde analiz edilmelidir (47).

2.3.1. Tıbbi Cihazlarda Biyoyuymuluğun Değerlendirilmesi

Birçok ülkede geçerli düzenleyici gereklilikler kapsamında, tıbbi cihazların piyasaya arzı öncesinde imalatçıların cihazın insan vücudu ile etkileşiminden doğabilecek biyolojik riskleri sistematik olarak değerlendirmesi ve biyolojik güvenliğini göstermesi gerekmektedir. Bu kapsamda güncel ISO 10993 standart serisinin takibi, cihazın güvenliğinin ve mevzuata uygunluğunun sağlanması açısından önemli bir yere sahiptir (24).

Risk yönetim sürecinin parçası olan biyolojik değerlendirme için imalatçılar gerçekleştirecek uzmanları sağlamalı ve bu süreci dokümente etmelidir. Biyolojik değerlendirmeye ilişkin, değerlendirme planı, değerlendirme sonuçları ve sürece dâhil olacak uzmanlar raporlanmalıdır. Biyolojik değerlendirme bir cihazın yaşam ömrü boyunca devam eder bu nedenle tasarım ve üretimdeki değişiklik, pazar sonrası gözetim verileri, standartlardaki güncellemeler biyolojik değerlendirmenin belirli dönemlerde gözden geçirilmesini ve gerekirse güncellenmesini gerektirir (5).

Biyolojik değerlendirme süreci, üretilecek tıbbi cihazın kullanım amacı ve talep edilen performans özellikleri doğrultusunda en uygun malzemenin seçilmesini kapsamaktadır. Bu süreçte, seçilen malzemelerin klinik uygunluğu ve biyoyumluluğu değerlendirilirken, aynı zamanda üretim aşamasında ortaya çıkabilecek kalıntılar, kirlenmeler ve proses kaynaklı safsızlıklar da dikkate alınmalıdır. Bu kapsamda imalatçıların biyolojik değerlendirme planı içerisinde üretim süreçlerini ve kullanılan üretim materyallerini tanımlaması, cihazla ilişkili olabilecek kimyasal maddeleri sistematik olarak listelemesi büyük önem taşımaktadır. ISO 10993-18 standardı çerçevesinde gerçekleştirilen kimyasal karakterizasyon çalışmaları, bitmiş ürünün bileşenlerinin ve üretimden kaynaklanan kalıntıların nitel ve nicel olarak analiz edilmesini sağlayarak biyolojik risklerin belirlenmesinde kritik bir rol üstlenmektedir. Kimyasal karakterizasyon, imalatçının bir tıbbi cihaz için gerekli biyoyumluluk testlerini belirlemede temel belirleyicilerden biri olup, risk temelli test stratejisinin oluşturulmasına doğrudan katkı sağlamaktadır. Elde edilen kimyasal veriler doğrultusunda, bazı durumlarda ek biyoyumluluk testlerine ihtiyaç duyulmayabilir. Özellikle malzemenin iyi tanımlanmış olması, literatürde yeterli toksikolojik verinin bulunması ve maruziyetin güvenli sınırlar içerisinde olduğunun bilimsel olarak gerekçelendirilmesi durumunda, test gerekliliği bilimsel kanıt temelli olarak azaltılabilmektedir. Bu yaklaşım kapsamında ISO 10993-18 uyarınca kimyasal karakterizasyonun gerçekleştirilmesi, devamında ise ISO 10993-17 doğrultusunda toksikolojik risk değerlendirmesinin yapılması beklenmektedir. Bu iki aşamalı değerlendirme, maruziyet düzeyine bağlı olarak riskin kantitatif şekilde ortaya konulmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda risklerin kabul edilebilir seviyelere indirilemediği durumlarda, örneğin cihaz tasarımında değişiklik yapılması, nihai ürün üzerinde yeterli doğrulama verisi bulunmaması veya

malzemenin biyolojik güvenliğine ilişkin yeterli klinik öncesi ve klinik kanıt elde edilememesi halinde, ISO 10993-1 kapsamında tanımlanan biyolojik değerlendirme testlerinin uygulanması gerekmektedir. Bu süreç, cihazın biyolojik güvenliğinin bütüncül ve risk temelli bir yaklaşımla doğrulanmasını amaçlamaktadır (5, 24, 44, 48-50).

İlgili biyoyumluluk testleri, temel olarak cihazın insan vücuduna temas süresi (kısa süreli, uzun süreli) ve niteliğine (yüzey teması, implant) göre seçilmektedir. Temas süresi cihazın beklenen performansının elde edilmesi için gereken süreyi ifade etmektedir. Bu değerlendirme uygun veri seçimini kolaylaştırır. Cihaza maruz kalma sıklığı, temas süresi, derecesi, niteliği elde edilen verilerin yorumlanmasında dikkate alınır. Bu aşamada belirlenen testler *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* olarak gerçekleştirilebilir. Güncel ISO 10993-1 standardında biyolojik değerlendirmenin planlaması sürecinde bilimsel ilerlemelerin dikkate alınması, *in vitro* modellerin ve kimyasal, fiziksel, morfolojik ve topografik karakterizasyon testlerinin tercih edilmesi ve bunların *in vivo* modellerden elde edilen bilgilerle aynı oranda bilgi sağlaması durumunda hayvan sayısının ve maruziyetinin en aza indirilmesini sağlayacak yöntemlerin seçilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte risk değerlendirmesinin sonucunda *in vivo* test yapılması gerektiğinde *in vivo* testten önce varsa uygun *in vitro* yöntemlerin kullanılması önerilmektedir. Modern biyoyumluluk yaklaşımı, sadece nihai ürüne test yapmaktan ziyade; kimyasal karakterizasyon (ISO 10993-18) ve toksikolojik risk değerlendirmesi (ISO 10993-17) yoluyla gereksiz hayvan deneylerini (*in vivo*) azaltmayı, 3R prensibi (Replacement, Reduction, Refinement) çerçevesinde bilimsel olarak geçerli *in vitro* yöntemleri önceliklendirmeyi hedefler (5, 6).

Biyoyumluluk testlerinin kapsamı belirlendikten sonra, bu testlerin hangi yöntemlerle gerçekleştirileceğine ilişkin kılavuzlar, standartlar ve düzenleyici gereklilikler ülkelere göre farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte, uluslararası düzeyde kabul gören bazı temel standartlar ve düzenleyici çerçeveler biyoyumluluk değerlendirmelerinde ortak referans noktası oluşturmaktadır. Tıbbi cihazların biyoyumluluk değerlendirmelerinde esas alınan temel dokümanlar arasında ISO 10993 standart serisi, ürün grubuna özgü uluslararası standartlar ile birlikte ülkelere ait düzenleyici otorite kılavuzları ve mevzuat hükümleri yer almaktadır. Bu çerçevede

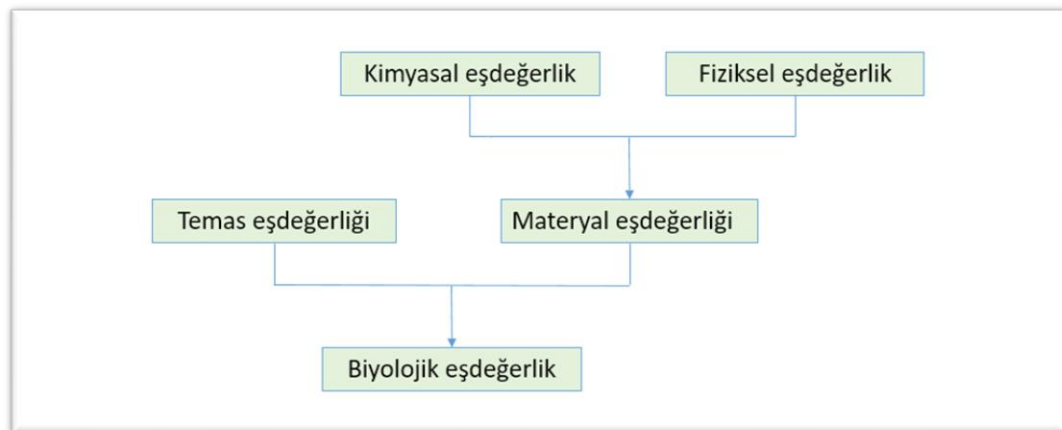
ISO 10993 serisi, biyolojik değerlendirme süreçlerinin risk temelli ve sistematik bir yaklaşımla yürütülmesine olanak sağlayan en temel uluslararası referans seti olarak kabul edilmektedir. Tıbbi cihaz imalatçıları, geliştirdikleri ürünleri ve bu ürünlerin piyasaya arz edileceği ülkelerin yasal düzenlemelerini dikkate almakla yükümlüdür. Bu doğrultuda biyolojik değerlendirme ve biyoyumluluk test stratejileri, yalnızca teknik standartlara değil, aynı zamanda ilgili regülasyonların gerekliliklerine de uygun şekilde planlanmalı ve yürütülmelidir (6).

2.3.2. Tıbbi Cihazlarda Biyoyumluluğun Değerlendirilmesi Süreci ve Biyoyumluluk Testleri

ISO 10993 serisi kapsamında biyoyumluluk, tıbbi cihazın insan vücudu ile temas eden materyallerinin biyolojik uygunluğunun sistematik bir risk temelli yaklaşım ile değerlendirilmesi süreci olarak tanımlanmaktadır. Bu standarda dayalı değerlendirme yaklaşımında, biyolojik güvenliğin sağlanabilmesi için öncelikle kapsamlı bir biyolojik değerlendirme planı (Biological Evaluation Plan, BEP) oluşturulmalı ve bu plan dokümanite edilerek tüm süreç boyunca referans alınmalıdır. Söz konusu plan doğrultusunda değerlendirme süreci, cihazın amaçlanan kullanımının, öngörülebilir yanlış kullanım senaryolarının, vücut ile temas tipi ve süresinin, temas eden doku/organ yapısının ve cihazın risk sınıfının ayrıntılı şekilde tanımlanması ile başlamaktadır. Bu aşamada cihazın biyolojik güvenliğini etkileyebilecek tüm özelliklerin sistematik olarak ortaya konulması gerekmektedir. Biyolojik değerlendirme kapsamında ayrıca cihazın kimyasal, fiziksel ve biyolojik karakteristikleri detaylı olarak tanımlanmalı ve mevcut test verileri, literatür bilgisi ile birlikte bütüncül şekilde toplanmalıdır. Bunun yanında, cihazla ilişkili potansiyel biyolojik tehlikeler ve bu tehlikelerin oluşturabileceği zararlı etkiler, özellikle vücut ile temas eden bölge ve temas süresi dikkate alınarak analiz edilmelidir. Elde edilen veriler ışığında, mevcut ve planlanan bilgilerin yeterliliğini değerlendirmek amacıyla kabul edilebilirlik kriterleri tanımlanmalı ve risklerin bu kriterlere göre kabul edilebilir olup olmadığı sistematik olarak değerlendirilmelidir. Bu çerçevede, veri yeterliliğini belirlemek üzere bir boşluk analizi (gap analysis) gerçekleştirilmesi, eksik bilgi alanlarının belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Risk değerlendirmesi ve kabul edilebilirlik kriterlerinin oluşturulması sürecinde ISO 10993-1 standardı, doğrudan ISO 14971:2019 “Tıbbi cihazlar için risk yönetimi uygulaması” standardına atıf

yapmakta olup, biyolojik değerlendirme sürecinin genel risk yönetim sistemi ile entegre şekilde yürütülmesini zorunlu kılmaktadır. Bu entegrasyon, biyoyumluluk değerlendirmesinin yalnızca test sonuçlarına dayalı bir süreç olmaktan çıkarak, yaşam döngüsü temelli, sistematik ve bilimsel bir risk yönetimi yaklaşımı ile ele alınmasını sağlamaktadır (5, 43, 51).

Değerlendirme tıbbi cihazın boyut, geometri, yüzey özellikleri gibi fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini, tıbbi cihazın malzeme bilgilerini ve gerekli hallerde, cihazdaki her bir malzemenin oranı ve miktarını, çeşitli yapım malzemelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ve bileşimlerini kapsar ve bu özelliklerin avantaj, dezavantaj ve uygunluğunun değerlendirmesini içermektedir. Bazı durumlarda imalatçı biyolojik eşdeğerlik kapsamında, cihazına benzer özelliklere sahip eşdeğerlik iddiasında bulunduğu bir cihaza ait verileri kullanarak biyolojik güvenlik değerlendirmesini gerçekleştirebilir. Bu durumda eş değer olarak gösterilen cihaz ile imalatçıya ait cihazın yeterli benzerliğe sahip olduğu gösterilebilmelidir. Cihazın eşdeğer olarak gösterilen cihaz ile klinik, teknik ve biyolojik açıdan yeterli düzeyde benzerliğe sahip olduğuna, farklılıkların anlamlı bir biyolojik tehlikeye veya riske yol açmadığına dair analizler gerçekleştirilmelidir. Bu kapsamda iki cihaz arasında vücut temasının türü ve süresi, bileşim, biyolojik güvenlikle ilgili fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikler, üretim süreçleri, kullanıldığı hasta popülasyonu, malzeme, tıbbi cihazın boyutu veya miktarı gibi hususlarda benzerlik sağlanabilmelidir veya farklılıkların önemli ve anlamlı yeni bir risk içermediği kanıtlanabilmelidir (5). Biyoyumluluk kapsamında eşdeğerlik değerlendirmesinin genel adımları şekil 2.10.'da şema olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Biyolojik eşdeğerliğin gösterilme adımları (5).

Boşluk analizi kapsamında malzeme karakterizasyonu (örn. fiziksel ve kimyasal özellikler) gibi yapılan değerlendirmeler sonucunda malzeme ve/veya tıbbi cihazın risk değerlendirmesini yapmak için maddelerin önceden değerlendirilen ve güvenliği kanıtlanmış olan bir tıbbi cihaz veya malzeme ile eşdeğer olduğu gösterilebiliyorsa, cihaza yönelik yeterli klinik öncesi ve klinik veri mevcutsa, riskler bu verilere bağlı olarak kontrol altına alınabiliyorsa tüm biyolojik testlerin yapılması gerekmeyebilir. Eksiklikler olması, belirlenen biyolojik risklerin kontrol altına alınamaması ve kabul kriterlerine uygun olmaması durumunda belirlenen eksikliklere ilişkin yürütülmesi gereken testler, süreçler belirlenmelidir. Bu değerlendirmelere ilişkin bilgi içeren ISO 10993 serisi dokümanları genel olarak Tablo 2.2’de tanımlanmıştır. Bu amaçla ISO 10993-18:2020’ de belirtildiği üzere bileşen miktarının düzenlenmesi, ISO 10993-17:2023 ve literatürler baz alınarak tolere edilebilir alım seviyelerinin düzenlenmesi, ISO 10993-1:2025’de belirtilen biyolojik testlerin seçilmesi gerçekleştirilecek süreçlerdir. Bu çalışmalardan sonra risklerin kabul edilebilir olup olmadığı değerlendirilmelidir. Riskler kabul edilebilir olmadığında, risklerin kontrol altına alınması beklenir. İmalatçıların ürün tasarımı ve üretiminde iyileştirme, tıbbi cihazın riskine yönelik koruyucu önlemler alma (ör: alarm eklenmesi, toksik bileşenin ayrıştırılması için temizleme adımının eklenmesi), güvenliğe ilişkin bilgileri sağlama ve kullanıcılara eğitim verme, artık riskler hakkında kullanıcıyı bilgilendirme gibi yöntemler ile riskleri kontrol altına alması gerekir (5, 8).

Değerlendirmeler tamamlandıktan sonra sonuçlar yetkin bir personel tarafından biyolojik değerlendirme raporunda dokümante edilmelidir. Biyolojik değerlendirme raporu süreci kapsamlı şekilde içermelidir. Bu raporda biyolojik değerlendirme planına uygunluk, bitmiş tıbbi cihaza ait fiziksel, kimyasal, biyolojik test sonuçları ve elde edilen verilere ilişkin değerlendirme, test seçim veya uygulamama gerekçeleri, farklı bir test metodu kullanımı, biyolojik risk değerlendirmesinin sonuçları ve risk tahminleri ele alınmalıdır (5, 8).

Tablo 2.2. Biyolojik, kimyasal ve fiziksel testler için ISO dokümanları (25).

| Biyolojik, Kimyasal ve Fiziksel Testler için ISO Dokümanları | |
|---|--|
| ISO 10993-5 | Sitotoksisite |
| ISO 10993-23 | İrritasyon |
| ISO 10993-10 | Duyarlılık |
| ISO 10993-11 | Sistemik Toksisite |
| ISO 10993-6 | Dokuyla temas sonrası lokal etkiler |
| ISO 10993-3 | Genotoksisite, karsinojenite, üreme ve gelişim toksisitesi |
| ISO 10993-4 | Kan uyumluluğu |
| ISO 10993-6, ISO 10993-11 | Nörotoksisite |
| ISO 10993-12 | Biyolojik testler için numunelerin hazırlanması ve birincil referans materyallerinin kullanımı |
| ISO 10993-18 | Kimyasal karakterizasyon |
| ISO/TS 10993-19 | Fiziksel Karakterizasyon |
| ISO 10993-7 | Etilen oksit kalıntısı |
| ISO 10993-9, ISO 10993-13, ISO 10993-14, ISO 10993-15 | Bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi |
| ISO 10993-16 | Parçalanma ürünleri ve sızan maddeler için toksikokinetik çalışma tasarımı |

ISO 10993-1:2025 standardı cihazların temas süresi ve yerine göre test gerekliliklerini özetleyen tablolar içermektedir. Güncel standart ile temas süresinin ve yerinin tespit edilmesi ve cihazların kategorize edilmesine yönelik düzenlemeler yapılmıştır.

Tıbbi Cihazların Kategorizasyonu ve Uygun Testlerin Seçimi

Tıbbi cihaza ilişkin belirlenmesi gereken testleri seçerken kullanım amacı, etkileşimde bulunduğu vücut bölgesi, doku tipi, kullanım ortamı ve çalışma prensibi değerlendirilir. Bu değerlendirme cihazın temas türünün ve süresinin belirlenmesi için ve olası biyolojik risklerin ve yanıtların tahmin edilebilmesi için önemlidir (5, 44, 46).

➤ **Temas Süresinin Belirlenmesi**

Cihazın insan vücuduna temas etmesi beklenen süre bir hastanın toplam maruz kalma süresine göre belirlenir. Tıbbi cihazlar temas süresine göre 3 kategoride gruplandırılabilir.

- Sınırlı maruziyet: Toplam maruziyet süresinin 24 saat veya daha az olması
- Kısa süreli maruziyet: Toplam maruziyet süresinin 24 saatten fazla ancak 30 günden fazla olmaması
- Uzun süreli maruziyet: Toplam maruziyet süresinin 30 günden fazla olması

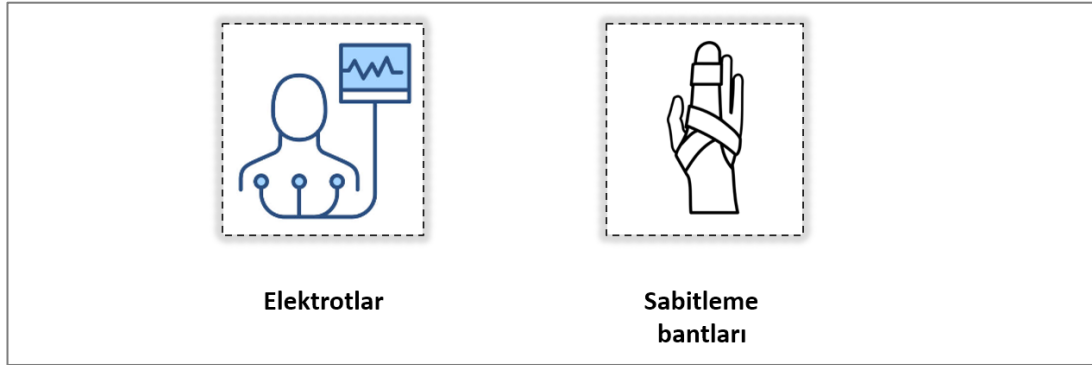
Tıbbi cihaz için maruziyet süresi hesaplanırken dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Maruziyet süresi belirlenirken cihazın ilk kullanımından son kullanımına kadar olan gün süresinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Tekrarlı kullanımda cihazın kullanım süresinin hesaplanmasında saatten bağımsız olarak gün sayısının göz önünde bulundurulması önemlidir. Örneğin günde 5 saat kullanılan bir solunum desteği cihazı ömür boyu kullanılması nedeniyle günde 24 saatten az olarak kullanılsada yaşam boyu kullanılması nedeniyle uzun süreli bir cihaz olarak kategorize edilir. Bir başka örnek olarak günde 2 saat olmak üzere 10 gün kullanılan bir beslenme tüpü seti her gün değiştirilmesine karşın 10 günlük bir maruziyet süresine sahip olması nedeniyle kısa süreli bir cihaz olarak değerlendirilir. Bununla birlikte ardışık kullanımları arasında 24 saatten fazla aralık olan cihazların toplam maruziyet süresi hesaplanırken cihazın hastada ilk ve son kullanımı arasındaki temas günlerinin toplamı dikkate alınır (5).

➤ **Vücut Temasına Göre Kategoriler**

Tıbbi cihazlar insan vücudu ile doğrudan veya dolaylı temas ederek veya temas etmeden etkilerini gösterirler. Vücut teması olmadığı durumlarda biyolojik değerlendirme gerekli değildir. Buna örnek olarak tanı yazılımları, x ışını jeneratörleri verilebilir.

Sağlam Ciltle Temas

Sağlam, hasarsız ciltle doğrudan veya dolaylı temas eden cihazlardır (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Sağlam ciltle temas eden cihaz örnekleri (Elektrotlar, dış protezler, sabitleme bantları ve kompresyon bandajları) (5).

Bu cihazlar için Tablo 2.2’de değerlendirme yapılması beklenen sonlanım noktaları ISO 10993-1:2025 standardı temel alınarak belirtilmiştir. Bununla birlikte cihaz yeni materyaller içeriyorsa, riskli popülasyonlarda (bebek ve hamileler) kullanılması öngörülüyorsa ilave biyolojik etkilerin değerlendirilmesi gerekebilir. Bu nedenle imalatçı ilave analiz gerektiren durumların olup olmadığını değerlendirmeli ve dokümanete etmelidir (5, 6).

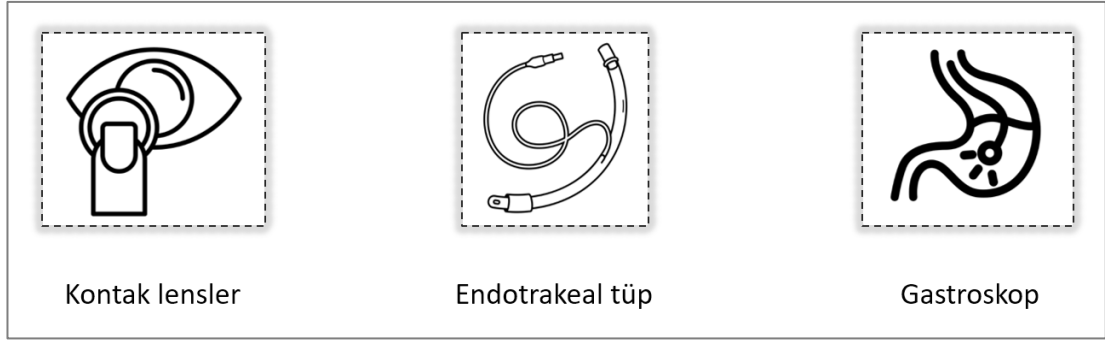
Tablo 2.3. Sağlam ciltle temas eden tıbbi cihazlar için biyolojik etkiler (5).

| Süre | Sitotoksinite | İrritasyon | Duyarlılık | Sistemik Toksikite | Doku | Temasından Sonra Yerel | Genotoksinite | Karsinojenite | Kan Uyumluluğu |
|---------------------------------------|---------------|------------|------------|--------------------|------|------------------------|---------------|---------------|----------------|
| A – sınırlı (≤ 24 saat) | E* | E | E | | | | | | |
| B – kısa süreli (>24 saat ila 30 gün) | E | E | E | | | | | | |
| C – uzun vadeli (>30 gün) | E | E | E | | | | | | |

*E: İlgili biyolojik sonlanım noktasının değerlendirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir.

Mukozal Membran ile Temas

Mukoza zarlarıyla doğrudan veya dolaylı olarak temas eden cihazlardır. Örnek olarak kontak lensler, idrar kateterleri, vajina içi ve bağırsak içi cihazlar (mide tüpleri, sigmoidoskoplar, kolonoskoplar, gastroskoplar), endotrakeal tüpler verilebilir (Şekil 2.12.) (5).



Şekil 2.12. Mukoza membranları ile temas eden cihazlara örnekler (5).

Avrupa Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (AB MDR 2017/745) ile birlikte, insan dokularıyla temas eden ürünlerin güvenliğini ve performansını göstermek için daha katı gereksinimler ortaya çıkmıştır. Yeni düzenlemeler sitotoksosite, iritasyon ve duyarlılığı kapsayan biyolojik değerlendirme verilerinin önemini vurgulamaktadır(52). Bu cihazlar için Tablo 2.3’de değerlendirme yapılması beklenen sonlanım noktaları ISO 10993-1:2025 standardı temel alınarak belirtilmiştir. Yine bu cihaz grubu içinde ek testler gerekebileceği göz önünde bulundurulmalı ve imalatçı tarafından değerlendirme yapılmalıdır. Kullanılan cihazın kullanım süresine bağlı olarak değerlendirilmesi gereken riskler değişmektedir. Örneğin vücutla temas süresi arttıkça cihaza ait bileşen veya parçacıkların sistemik dolaşıma, lenfatik sisteme veya beyin omurilik sıvısına dağılması riski açığa çıkabilir. Sistemik toksisite değerlendirmesi, vücut genelindeki dokularda olumsuz biyolojik tepkiler potansiyelini ele almalıdır (5).

Tablo 2.4. Mukozal membranlar ile temas eden tıbbi cihazlar için biyolojik etkiler(5).

| Süre | Sitotoksosite | İritasyon | Duyarlılık | Sistemik Toksikite | Doku Temasından Sonra Yerel Etkiler | Genotoksosite | Karsinojenite | Kan Uyumluluğu |
|---------------------------------------|---------------|-----------|------------|--------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| A – sınırlı (≤ 24 saat) | E* | E | E | | | | | |
| B – kısa süreli (>24 saat ila 30 gün) | E | E | E | E | E | E | | |
| C – uzun vadeli (>30 gün) | E | E | E | E | E | E | E | |

* E: İlgili biyolojik sonlanım noktasının değerlendirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir.

Yaralanmış veya Hasar Görmüş Yüzeylerle (Deri veya Mukoza Zarları) ya da Kan Dışında İç Dokularla Temas

Bu gruptaki cihazlar yaralanmış, hasar görmüş yüzeylerle veya kemik, dentin, iç yumuşak dokular veya organlarla doğrudan veya dolaylı temas eden cihazlardır. Eklem protezleri, kemik çimentoları, diş dolgu malzemeleri, deri zımbaları gibi kemik veya pulpa/dentinle temas eden cihazlar, yanıklar ve granülasyon dokusu için oklüzif yamalar, yara temizleme cihazları örnek verilebilir (Şekil 2.13.). Bu cihazlar için Tablo 2.4'de değerlendirme yapılması beklenen sonlanım noktaları ISO 10993-1:2025 standardı temel alınarak belirtilmiştir. Bu tabloda değerlendirme için belirtilenlerin dışında ek biyolojik etkilerin değerlendirilmesi gerekebilir. Yeni malzeme, materyal; kullanıcı gruplarındaki hasas popülasyonlar gibi spesifik durumlar için değerlendirme yapılması gerekebilir. ISO 10993-1:2025 standardında ele alınan immünotoksisite, nörotoksisite, üreme toksisitesi, partikül riski gibi risklerin değerlendirilmesi gerekebilir. Bu nedenle diğer gruplarda olduğu gibi bu gruptaki cihazlar içinde kapsamlı bir değerlendirme yapılması gerekmektedir (5, 53).



Şekil 2.13. Yaralanmış veya hasar görmüş yüzeylerle ya da dolaşımdaki kan dışındaki iç dokularla temas eden cihaz örnekleri (5).

Tablo 2.5. Yaralanmış veya hasar görmüş yüzeylerle ya da dolaşımdaki kan dışındaki iç dokularla temas eden cihazlar için biyolojik etkiler (5)

| Süre | Sitotoksisite | İrritasyon | Duyarlılık | Sistemik Toksisite | Doku Temasından Sonra Yerel Etkiler | Genotoksisite | Karsinojenite | Kan Uyumluluğu |
|---------------------------------------|---------------|------------|------------|--------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| A – sınırlı (≤24 saat) | E | E | E | E | | | | |
| B – kısa süreli (>24 saat ila 30 gün) | E | E | E | E | E | E | | |
| C – uzun vadeli (>30 gün) | E | E | E | E | E | E | E | |

* E: İlgili biyolojik sonlanım noktasının değerlendirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir.

Dolaşım Yoluyla Kanla Temas

Bu grup cihazlarda riskin artması nedeniyle daha kapsamlı bir değerlendirme gerekebilir. Bu cihazlar dolaşımdaki kanla doğrudan veya dolaylı temas eder. Örnek olarak çözelti uygulama setleri, geçici kalp pili elektrotları, oksijenatörler, diyaliz hortumları ve kalp kapakçıkları verilebilir (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Dolaşımdaki kanla temas eden tıbbi cihazlara örnekler (5).

Bu cihazlar için Tablo 2.5’de değerlendirme yapılması beklenen sonlanım noktaları ISO 10993-1:2025 standardı temel alınarak belirtilmiştir. Biyolojik değerlendirme diğer gruplarda belirtilen etkileri içermektedir. Buna ilave olarak geçici süreli kullanımı olsa bile kan uyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Standart bu gruptaki cihazlar için değerlendirme kapsamını çizmekle birlikte bazı cihazlar için değerlendirme noktalarını değiştirebilmektedir. Bu nedenle bu tablolar genel bir bakış sağlamakla birlikte her cihaz özelinde gereklilikler ilgili standartlar, dokümanlar doğrultusunda değerlendirilmelidir (5, 54).

Tablo 2.6. Dolaşımdaki Kanla Temas eden Cihazlar için Biyolojik Etkiler (5)

| Süre | Sitotoksinite | İrritasyon | Duyarlılık | Sistemik Toksikite | Doku Temasından Sonra Yerel Etkiler | Genotoksinite | Karsinojenite | Kan Uyumluluğu |
|---|---------------|------------|------------|--------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| A – sınırlı (≤24 saat) | E* | E | E | E | | E | | E |
| B – kısa süreli (>24 saat ila 30 gün) | E | E | E | E | E | E | | E |
| C – uzun vadeli (>30 gün) | E | E | E | E | E | E | E | E |

* E: İlgili biyolojik sonlanım noktasının değerlendirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir.

ISO 10993-1 cihaz kategorilerine göre biyolojik değerlendirme çerçevesi sunmakla birlikte her cihaz özelinde ilave test gerekliliklerinin oluşabileceğini belirtmektedir. Bu nedenle her cihaz özelinde ilgili standartlar, dokümanlar göz önünde bulundurularak risk değerlendirmesinin yapılması ve olası biyolojik etkilerin belirlenmesini önermektedir (5, 6).

Biyolojik değerlendirme süreci ilgili çalışmaların tamamlanması sonrasında da devam etmelidir. Bu süreç cihazın tüm yaşam döngüsünü kapsamaktadır. Cihazın piyasaya arz edildikten sonra klinik kullanımı sırasında insanlarda beklenmedik advers reaksiyonlar veya olaylara yol açıp açmadığı gözlemlenmelidir. Bu nedenle cihaz piyasaya arz edildikten sonra elde edilen veriler doğrultusunda biyolojik değerlendirme yeniden değerlendirilmeli ve gerektiğinde güncellenmelidir. İmalatçı piyasaya arz sonrası gözetime ilişkin bir sistem kurmalı ve bunu teknik dokümantasyonun bir parçası haline getirmelidir. İmalatçı piyasaya arz sonrası gözetimi sağlamak amacıyla oluşturduğu plan doğrultusunda cihaza ilişkin ciddi olumsuz olaylar, saha güvenliği düzeltici faaliyetleri, ciddi olmayan olumsuz olaylar, istenmeyen yan etkiler, trend raporlaması, teknik literatür, veri tabanları veya kayıtlar, geri bildirimler, şikayetler hakkında sistematik bilgi toplamalı ve bu verileri değerlendirmelidir (55). Bu değerlendirme sonucunda elde ettiği çıktılar doğrultusunda biyolojik değerlendirme sürecini gözden geçirmelidir. Buna ilave olarak malzeme, ambalaj, sterilizasyon metodu, kullanım amacı değişikliği gibi cihazın tasarım, üretim ve üretim sonrası faaliyetlerinde yapılacak değişikliklerde biyolojik değerlendirme sürecinin gözden geçirilmesini gerektirmektedir. Yeniden değerlendirme kapsamında bu değişikliklerin ek veri veya test gerekliliği oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmeli ve bilimsel olarak raporlanmalıdır (5, 43, 56).

Cihaza yönelik değerlendirilmesi gereken biyoyumluluk testleri belirlendikten sonra ilgili standartlar temel alınarak testler gerçekleştirilir. Tıbbi cihazlarda numune seçimi, numunelerin ön hazırlığı, numune deney koşulları için ISO 10992-12:2021 standardı genel bir çerçeve sunmaktadır. ISO 14971:2019 standardı üretim sürecindeki değişiklikler veya üretim süreci kaynaklı tehlikelerin örneğin katkı maddeleri, temel malzeme safsızlıkları ve temizlik ve dezenfeksiyon maddeleri gibi

olası kalıntı risklerinin test numunelerinin tasarımında ve hazırlanmasında dikkate alınması gerektiğini belirtir (5).

ISO 10993-12:2021 standardı numunelerin hazırlanmasında ekstraksiyon metodunu tanımlar. Buna göre ürün ekstrakte edilecek ise nihai ürünün doğasına, kullanımına ve testin amacına (örneğin, tehlike tanımlama, risk tahmini veya risk değerlendirmesi) uygun bir çözücü seçilmelidir. Ekstraksiyon koşulları belirlenirken tıbbi cihaz malzemelerinin, sızabilir maddelerin veya kalıntıların fizikokimyasal özelliklerinin dikkate alınması gerekmektedir. Bu amaçla ISO 10993-18: 2020 Risk yönetimi süreci kapsamında tıbbi cihaz malzemelerinin kimyasal karakterizasyonu, ISO 10993-19 Malzemelerin fizikokimyasal, morfolojik ve topografik karakterizasyonu gibi standartlardan yararlanılmalıdır. Bununla birlikte spesifik ürün özellikleri için ilgili standartlar dikkate alınmalıdır. Örneğin nanomalzemelerin veya nanoyapılı malzemelerin test edilmesi için numune hazırlamada ISO 10993-22: 2017 standardı dikkate alınmalıdır. ISO 10993-12: 2021 standardı kapsam olarak cihazların ekstraksiyon koşullarını içermektedir. Ancak günümüze yakın dönemlerde ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazlara yönelik tanımlamalar yapılmıştır (10). ISO 10993-23:2021 standardında ekstraksiyon için uygun olmayan materyallerden bahsedilmiş ve bunlara örnek olarak sıvılar, jeller, macunlar ve partiküller verilmiştir (57).

Cihazın temas süresi ve yerine göre değerlendirilmesi gereken biyolojik etkilere ilişkin testler değişmekle birlikte genel olarak tüm cihaz grupları için yapılması beklenen 3 biyoyumluluk testi vardır. Kimyasal karakterizasyon, literatür taraması, klinik öncesi ve klinik kanıtlarla bu testlerin yapılmasına gerek olmadığı gerekçelendirilemediğinde tüm risk sınıfındaki tıbbi cihazlar için bu testlerin yapılması gerekmektedir. Bu 3 test sitotoksosite, iritasyon ve duyarlılık testleridir. Bu temel testler gerçekleştirilirken kılavuzluk sağlaması amacıyla Sitotoksosite testleri için ISO 10993-5, duyarlılık için ISO 10993-10, iritasyon testleri için ISO 10993-23 standardı oluşturulmuştur (6).

2.3.3. Biyouyumluluk Testleri

a. Sitotoksisite Testi

ISO 10993-1: 2025 içerisinde bir cihazın sitotoksisitesinin değerlendirilmesi olumsuz biyolojik etkilerin varlığını belirlemek için yapılan ilk değerlendirme olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle temas süresinden bağımsız olarak insan vücudu ile doğrudan ve dolaylı olarak temas eden tüm tıbbi cihazların sitotoksisite potansiyelinin değerlendirilmesi önemlidir(5). ISO 10993-5 standardı sitotoksisite testlerine ilişkin tanımlamalar içermektedir. Bu testlerde genel olarak kültürlenmiş memeli hücreleri 24 saat boyunca tıbbi cihaz veya özütlerine maruz bırakılmaktadır. Testler için genellikle Balb 3T3 (fibroblastlar), L929 (fibroblastlar) ve Vero (böbrek kaynaklı epitel hücreleri) hücre hatları kullanılmaktadır (6).

Hücre canlılığı ve olumsuz hücre reaksiyonlarını değerlendirmek için birincil sonlanım noktaları değerlendirilmektedir. Bunlar hücre canlılığı, morfolojik değişiklikler, hücre ayrılması, hücre lizisi olarak tanımlanmaktadır. Bu son noktalar değerlendirilerek tıbbi cihazın sitotoksisitesi derecelendirilir. Hücre canlılığının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla genellikle MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), XTT (Sodyum 3'-[1-(fenilamino-karbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro)benzensülfonik asit hidrat) ve nötral kırmızı alımı daha nadir olarak Bradford proteini, kristal viyole, rezazurin boyası ve tripan mavisi testleri kullanılmaktadır (6).

Sitotoksisite testinin sonuçları için ISO 10993-5 standardı spesifik bir kabul kriteri tanımlamamaktadır ancak kabul kriterinin tıbbi cihazın niteliğine, kullanım amacına potansiyel hasta maruziyetine göre değerlendirilmesi gerektiğini belirtir. Tek başına sitotoksisite verilerine dayanarak bir cihazın klinik uygulama için yeterli olup olmadığına karar vermek yeterli değildir. Ancak ISO 10993-5'e göre sitotoksisite testi birçok düzenleyici makam tarafından istenen birincil testtir. Kapsamlı biyolojik değerlendirme sürecinin bir parçasıdır.

b. İrritasyon testi

Draize tavşan cilt iritasyon testi, uzun yıllar boyunca standart *in vivo* yöntemlerden biri olarak kullanılmış olup, ISO 10993-10'un önceki versiyonlarında referans test yaklaşımı olarak yer almıştır. Ancak etik kaygılar, hayvan kullanımını azaltma gerekliliği ve alternatif yöntemlerin gelişmesi nedeniyle güncel düzenleyici yaklaşım, mümkün olduğunca *in vitro* RhE tabanlı yöntemlerin tercih edilmesini öngörmektedir (5).

Biyolojik güvenliğin değerlendirilmesinde iritasyon riskinin değerlendirilmesi önemli bir basamaktır. Tıbbi cihazlar için ISO 10993-23: 2021 standardı tıbbi cihaz iritasyon riskinin değerlendirilmesi için gereklilikleri ele almaktadır. Güncel ISO 10993 standart serisinde *in vitro* test yöntemlerinin tercih edilmesi ve hayvan deneylerinin azaltılması amacıyla düzenlemeler yapılmıştır. İlgili standartta bu amaçla *in vitro* test yöntemleri arasında RhE tabanlı modeller ve test metotları tanımlanmıştır (6, 58, 59).

RhE modellerinin hayvan testleri gibi etkili sonuçlar sağlayıp sağlamadığını değerlendirebilmek amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir. ISO 10993-23:2021 standardında RhE modelleri ile yapılan çalışmalarda tıbbi cihaz örnekleri veya ekstraktlarına 18-24 saat maruz bırakılması ve oluşan hücresel tepkinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Değerlendirmek amacıyla genellikle MTT testi ile hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmekte ve sonuçlar hücre canlılığı için belirlenen %50 kriteri doğrultusunda değerlendirilmektedir. Buna ilave olarak yapılan çalışmalarda sitokin analizinin iritasyon potansiyelini belirlemede anlamlı veri sunabileceği değerlendirilmektedir (6, 52, 58, 60-62).

Sonuç olarak iritasyon değerlendirmelerinde, *in vivo* yöntemlerden *in vitro* RhE modellerine doğru belirgin bir metodolojik geçiş söz konusudur ve bu geçiş hem bilimsel validasyon çalışmaları hem de uluslararası standartlar ile desteklenmektedir.

c. Duyarlılık Testi

Sensitizasyon, bir tıbbi cihazın veya cihazdan salınan bileşenlerin bağışıklık sistemini uyararak alerjik kontakt dermatit gibi gecikmiş aşırı duyarlılık

reaksiyonlarına neden olma potansiyelini ifade etmektedir. Sensitizasyon değerlendirilmesi, tıbbi cihazların biyolojik güvenliğinin belirlenmesinde temel biyoyoumluluk sonlanım noktalarından biridir. ISO 10993-10 standardı kapsamında geleneksel olarak Gine Domuzu Maksimizasyon Testi (Guinea Pig Maximization Test, GPMT), Buehler testi ve Lokal Lenf Nodu Testi (Local Lymph Node Assay, LLNA) kullanılmakta olup, bu yöntemler arasında GPMT en yüksek duyarlılığa sahip yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, hayvan kullanımının azaltılmasına yönelik 3R prensipleri doğrultusunda son yıllarda cilt sensitizasyonunun değerlendirilmesinde yeni yaklaşım metodolojileri geliştirilmiştir. Özellikle OECD TG 442C, TG 442D ve TG 442E kılavuzlarında yer alan Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), KeratinoSens™, LuSens, h-CLAT ve U-SENS™ gibi *in chemico* ve *in vitro* yöntemler, cilt sensitizasyonunun advers sonuç yolu (Adverse Outcome Pathway, AOP) içerisinde yer alan temel olayların değerlendirilmesine dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler esas olarak kimyasal maddeler için doğrulanmış olup, tıbbi cihazlardan elde edilen kompleks ekstraktların değerlendirilmesinde uygulanabilirlikleri henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle ISO 10993-10:2021 standardı alternatif yaklaşımların potansiyelini kabul etmekle birlikte, tıbbi cihazlar için kullanım alanlarının doğrulanmasına ihtiyaç olduğunu belirtmektedir. Güncel yaklaşımlar, hayvan deneylerinin yerini alabilecek entegre test stratejilerinin geliştirilmesine odaklanmakta olup, özellikle keratinosit aktivasyonu, dendritik hücre aktivasyonu ve sitokin yanıtlarını değerlendiren yöntemlerin gelecekte tıbbi cihaz biyoyoumluluk değerlendirmelerinde daha yaygın kullanılacağı öngörülmektedir.

2.4. Toksikite Değerlendirmesinde Alternatif Test Yöntemleri ve 3R İlkesi

Toksikoloji, canlı organizmalar ve çevre üzerinde kimyasal maddelerin, biyolojik ve fiziksel etmenlerin oluşturduğu istenmeyen zararlı, olumsuz etkileri konu alan bir bilim dalıdır. Ksenobiyotik olarak tanımlanan bu maddelerin canlı organizmada ters etkilerinin ortaya çıkmasında ksenebiyotiğin dozu, biyolojik sistem ile teması, absorbe edilip edilmemesi ve dağılımı rol oynamaktadır. Toksikoloji bilimi bu olası ters etkilerin nasıl ortaya çıkabileceği, etki mekanizması, yarar/zarar oranı, tedavi yöntemlerini; kimyasal maddelerin biyolojik güvenlik ve toksisite profilinin değerlendirilmesini ele almaktadır (63). Eski zamanlardan günümüze hem fizyolojik

araştırmalar hem de toksikolojik değerlendirmeler için hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Farmasötik ürünlerin, aşıların ve biyolojik ürünlerin güvenlilik ve etkinlik değerlendirmelerinde hayvan modelleri önemli bir rol oynamış ve hayvan deneyleri sayesinde fizyoloji, anatomi, moleküler biyoloji ve hastalık mekanizmaları hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (64, 65).

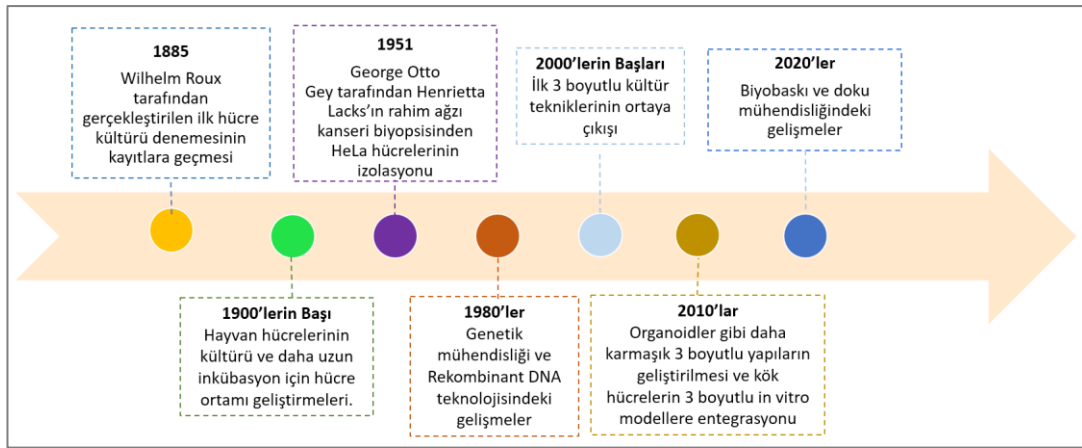
Bununla birlikte, zamanla hayvan deneylerinin etik boyutu, maliyeti, zaman gereksinimi, standardizasyonundaki zorluklar ve hayvan refahı konusundaki toplumsal hassasiyetin artması gibi faktörler alternatif test yöntemlerinin araştırılmasını teşvik etmiştir. Deney hayvanları araştırmalarında standardizasyon, deneysel bulgulara etki eden biyolojik ve çevresel faktörlerin benzer olmasını ifade eder. Böylece, benzer araştırma prosedürleri sabit koşullarda bir başka laboratuvarda uygulandığında, eşdeğer ve birbiri ile karşılaştırılabilir sonuçların alınması sağlanır. Standardizasyonu etkileyen öncelikli faktörler, deney içi ve deneyler arası varyasyonların bütünü olarak değerlendirilmektedir. Geçmiş yıllarda toksisite testlerinde fazla sayıda deney hayvanı kullanılması ve standardizasyondaki sıkıntılar nedeniyle, son 30 yıldır bilim çevreleri daha az hayvan kullanılan alternatif yöntemlere yönelmiştir. “Alternatif yöntemler” hayvan kullanımını azaltmak, hayvan refahını artırmak ve hayvan deneyleri yerine başka yöntemleri kullanmak amacıyla geliştirilen yöntemlerdir (64, 66).

1800’lü yıllarda alternatif yöntemlerin oluşturulması için zemin oluşturulmaya başlansa da bu yöntemlere ilk adımın doku kültürü yöntemi ile olduğu düşünölmektedir. 1885 yılında Wilhelm Roux tarafından tavuk embriyosunun medöler plağı üzerinden hücre kültürü oluşturulmaya çalışılmıştır. 1907 yılında Ross harison sinir hücrelerini *in vitro* olarak kültüre almayı başarmış ve hücrelerin büyüme ve gelişmesini sağlamıştır. Bu alışmalar ile hücrelerin canlı organizmadan ayrıldığında da gelişme ihtimalinin olduğu gösterilmiştir. Bu gelişmeler birçok araştırmacının bu alanda çalışma yapmasına aracı olmuştur. Doku-hücre kültürü çalışmaları teknik zorluklar içermesi nedeniyle başlangıçta beklentileri karşılamasada zorlukların yirminci yüzyılda aşılmasıyla biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntem halinde gelmiştir (64).

On dokuzuncu yüzyılın sonlarında hastalıkların mikrop teorisinin ve mikrobiyoloji biliminin kurulması, alternatif yöntemlerin incelenmesi için de katkı sağlayan olaylar meydana getirmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında Paul Ehrlich kemoterapi kavramını oluşturmuş ve bu kavramı sihirli mermi olarak tanımlamıştır. Bu kavramı belirli kimyasal maddelerin hayvan veya insan hücrelerine kıyasla patojenik mikroorganizmalara daha seçici olduğu ve bu ajanların hastalığı tedavi etmek için dâhili olarak verilebileceği ilkesine dayandırmıştır. Ehrlich ilaçların kimyasal modifikasyonu ve bunların patojenik mikroorganizmalara karşı etkinliğini gözlemlemek amacıyla *in vitro* ortamda çalışmalar gerçekleştirmiş ve etkinliği olabilecek maddeleri tespit ettikten sonra bu maddelere yönelik hayvanlar üzerinde çalışmalar yapmıştır. İn vitro çalışmalar sifilis tedavisi için keşfedilen Salvarsan gibi potansiyel olarak yararlı terapötik ajanların belirlenmesini sağlamıştır. Bu süre zarfında Amerika'da 1866 yılında hayvan deneylerinin azaltılmasına yönelik çalışmalara başlanmış, hayvan deneyini savunan kesimlerinde olması nedeniyle çok uzun yıllar bu fikir çatışmasına bağlı olarak iki gruba ait çalışmalar devam etmiştir (64).

1940'lı yıllarda tavşan Draize testi, ham kimyasalların veya formülasyonların (yani bitmiş ürünlerin) insan derisini irrite etme potansiyelini tahmin etmek için geliştirilmiş, 20. yüzyılın sonlarında deri irritasyonunu değerlendirmek için yaygın kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. İlerleyen yıllarda tavşan ve insan derisinin fizyolojik olarak farklı olması bu nedenle irrite edici maddelere farklı tepki vermesi nedeniyle draize testinin yeterliliği sorgulanmıştır. Bunun yanı sıra testin tekrarlanabilirliğine yönelik endişe ve hayvanların refahına yönelik politik baskı yeni test yöntemlerinin araştırılmasına yol açmıştır. 1956 yılında Bernard Russel tarafından değiştirme, azaltma, iyileştirme olarak adlandırılan 3R (Replacement, Reduction and Refinement) ilkeleri paylaşılmıştır. Bu ilkeler paylaşıldığı dönemde çok ilgi görmemiş ancak 1980'lerin sonuna doğru, alternatif yöntemler ve 3R kavramı bilim camiasında ve hayvan hakları savunucuları arasında önemli bir yer edinmiştir. 1990'larda alternatif irritasyon testlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmış ve ECVAM tarafından doğrulanan farklı *in vitro* cilt irritasyonu metotları üzerinde çalışılma yapılmıştır (67).

Hücre kültürü metodolojileri, 1980’li yıllardaki rekombinant DNA devrimiyle birlikte basit bir üretim aracından, hastalıkların moleküler düzeyde manipüle edilebildiği gelişmiş modelleme sistemlerine dönüşmüştür. 2000’li yılların başı, hücre araştırmalarında 2D modellerden, 3D kültür tekniklerine geçişin başladığı dönemdir. 2010’lu yıllarda kök hücre teknolojisinin 3D modellerle birleşmesi ve organoidlerin keşfi, *in vitro* ortamda çok hücreli yapıların izlenmesini mümkün kılmıştır. 2020’li yıllar ise biyobaskı yöntemleri ve doku mühendisliği uygulamaları ile karmaşık biyolojik yapıların laboratuvar ortamında yeniden oluşturulması açısından bir dönem olmuştur. Araştırma modellerinin yıllar içerisindeki gelişimi Şekil 2.15.’de özetlenmiştir.



Şekil 2.15. Alternatif yöntemlerin gelişim süreci (68).

Deney hayvanları araştırmalarında 3R kuralı birinci R: Replacement: Yerine koymak (alternatif metotları seçmek), ikinci R: Reduction: Hayvan sayısını azaltmak, üçüncü R: Refinement: Koşulları iyileştirmek (hayvan refahını gözetmek) ilkelerinden oluşmaktadır.

Bu ilkeler ile hayvan çalışmaları yerine *in vitro* yöntemlerin kullanılması, mümkün değilse hayvan testlerinin en aza indirilerek gerçekleştirilmesi ve yapılacak testlerde hayvanların stresini minimuma indirilmesi için uygulamaların iyileştirilmesi amaçlanmıştır. 1960'larda ve 70'lerin başında hayvan koruma topluluğu tarafından yavaş yavaş benimsenen bu çalışma 80'li yıllarda ulusal mevzuata dâhil edilmiş ve Avrupa ve Amerika'da endüstri tarafından benimsenmiştir. 2009 yılında ISO Teknik Komitesi ISO 10993-1:2009'u yayınlamıştır. Revize edilen standart içinde yeni test

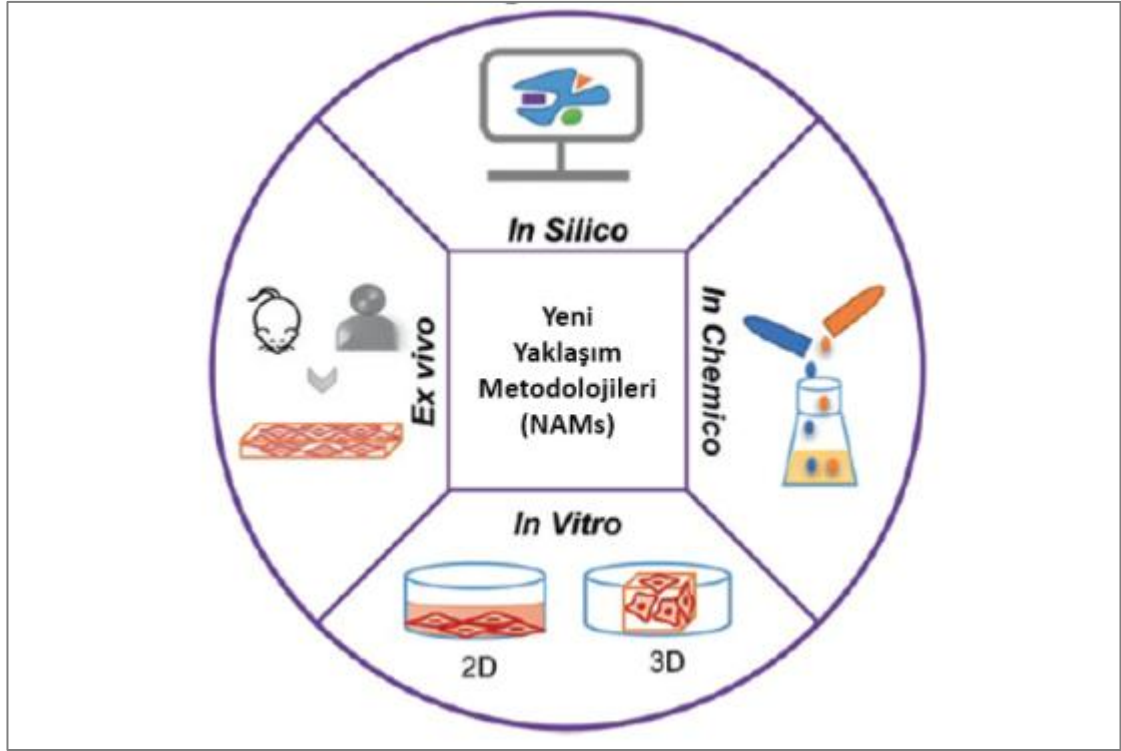
metotlarının arayışına ve tercihine yönelik teşvik yapılmış, uygun şekilde valide edilmiş, güvenilir ve tekrarlanabilir *in vitro* test yöntemi mevcut olduğu durumlarda *in vivo* testlere tercih edilmesi önerilmiştir. Bu yaklaşım, tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde hayvan deneylerinin yerini alabilecek yeni deney yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmaları hızlandırmıştır (67).

Günümüzde *in vitro* yöntemler, toksisite değerlendirmelerinde hayvan deneylerinin tamamen yerini almış olmasa da, hayvan kullanımının azaltılması ve alternatif test stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde toksisite değerlendirmeleri daha hızlı, tekrarlanabilir ve kontrollü deney koşullarında gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca *in vitro* yöntemler, maliyet ve zaman açısından da önemli avantajlar sağlamaktadır.

Bu nedenle tıbbi cihazların güvenilirlik ve performansının değerlendirilmesinde temel olarak yapılması gereken testler arasında yer alan iritasyon, sensitizasyon ve sitotoksisite testlerinin yeni gelişmeler ve araştırmalar doğrultusunda ele alınması güncel araştırmalara uyum açısından önem taşımaktadır.

2.4.1. Alternatif Test Yöntemleri- Yeni Alternatif Metotlar (NAMs)

Bilimsel araştırmalarda hayvan kullanımının azaltılmasını amaçlayan çalışmalar günümüzde Yeni Yaklaşım Metodolojileri adı altında (NAMs) devam etmektedir. Bu metodlar ilaç, tıbbi cihaz ve kimyasallar için toksikoloji ve risk değerlendirmeleri kapsamında yenilikçi bir teknik ve strateji sunmaktadır. Bu yaklaşımlar *in silico*, *in chemico*, *in vitro* ve *ex vivo* gibi farklı metodları içermektedir. Bu modeller ile amaç insan biyolojisini en iyi şekilde taklit edebilmektir (65, 69). Şekil 2.16.'da yeni yaklaşım metodolojileri belirtilmiştir.



Şekil 2.16. Yeni yaklaşım metodolojilerini gösteren şema (65).

İlaç testlerinde hayvan kullanımının değiştirilmesi, azaltılması ve iyileştirilmesi yönündeki çabalar önemli ölçüde artmıştır. *In vivo* testlere alternatif olarak oluşturulan yöntemler daha insani bir süreç sağlamakta ve bilimsel olarak sağlam sonuçlar verebilmektedir. 3R prensipleri ilaç testlerinde AB hukuku tarafından zorunlu kılınmış ve ilgili direktife dâhil edilmiştir. Direktifin uygulanmasından bu yana, Avrupa İlaç Ajansı (EMA), 3R prensiplerinin uygulanmasına yönelik çalışmalarda bulunmuştur (70).

Tıbbi cihaz alanında ise alternatif metotların önemine yönelik düzenlemeler ISO 10993 standartlarında karşımıza çıkmaktadır. ISO 10993-2, ISO 10993-18, ISO 10993-5, ISO 1093-23 gibi standartlarda hayvan deneyleri yerine mevcut olduğu durumlarda alternatif test metotlarının tercih edilmesinin gerekliliği belirtilmektedir.

Yeni yaklaşım metodolojileri ilaç ve tıbbi cihazlar için prelinik çalışmalarda hayvan deneylerinin yerine alternatif sağlayabileceği düşünülen yöntemlerdir. Bu yöntemler birkaç başlık altında ele alınmaktadır (65):

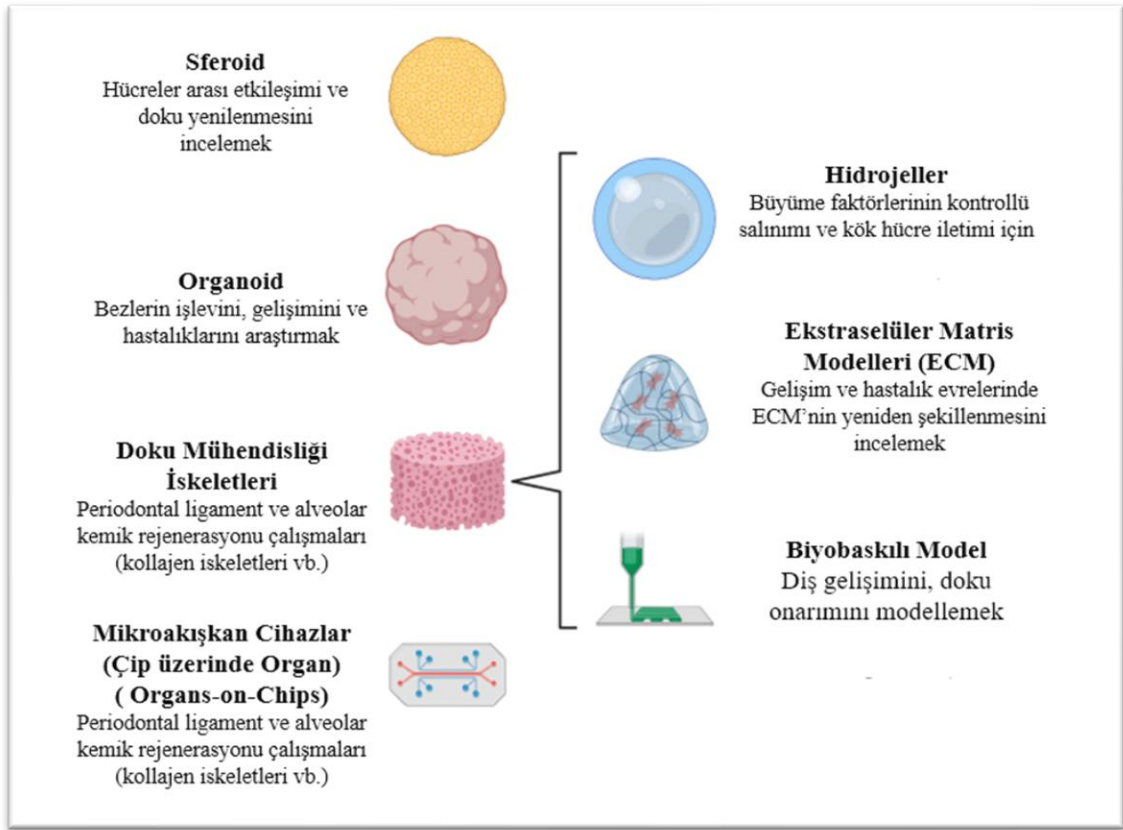
1. *In Silico* Yöntemler: Bilgisayar simülasyonları, matematiksel modeller ve veri analizlerinden yararlanılarak kimyasallar, ilaçlar ve tıbbi cihazların içerdiği maddelerin farmakokinetiğinin, güvenliğinin ve etkinliğinin tahmin edilmesi ve değerlendirilmesidir (65, 70, 71).

2. *In Chemico* (Kimyasal/Biyokimyasal) Yöntemler: Canlı organizma veya hücre içermeyen bu yöntemler ile maddelerin moleküler düzeydeki etkinliği ölçülebilmektedir. Maddelerin biyolojik hedeflerle etkileşimlerini ve özelliklerini değerlendirmek için kimyasal analizler kullanır (Örn: Protein Bağlanma Sistemleri, Enzim İnhibisyon Analiz Sistemleri) (65, 70, 71).

3. *Ex vivo* Sistemler: Bir organizmadan alınan canlı doku veya organ örneklerinin kullanımını içerir. Maddelerin gerçek insan dokuları üzerinde test edilmesine olanak tanıyan yöntemlerdir. Kültür ortamında muhafaza edilen insan doku ve organları (karaciğer, kalp vb.) maddelerin lokal toksik etkileri veya bağışıklık hücresi infiltrasyonunun incelenmesi için bir ortam sağlayabilir (65).

4. *In vitro* (Hücre ve Doku Tabanlı) Yöntemler: 2D hücre kültürleri, biyobaskı (3D bioprinting) ve organ-on-a-chip (çip üstü organ) gibi sistemleri içeren geniş bir alandır. Geleneksel ve gelişmiş olmak üzere kendi içinde kategorize edilebilir. Geleneksel *in vitro* yöntemler içerisinde çeşitli doku veya organizmalardan elde edilen kültürlenmiş hücreler yer almaktadır. Gelişmiş *in vitro* yöntemler içerisinde Organ-on-a-chip teknolojisi, 3D biyobaskı, doku mühendisliği sistemleri, sferoidler ve organoid kültürleri yer almaktadır. Bu modeller ile insan dokusuna daha benzer bir ortamın (hücre sayısı, mikro çevresi, pH dengesi ve mekanik stresi) simüle edilmesi amaçlanmaktadır (65, 71, 72).

3D *in vitro* modeller 2D hücre kültürü modellerine kıyasla insan dokularına daha benzer, daha karmaşık yapıların modellenmesini sağlar. *In vitro* doku modelleri ve örnek kullanım alanları Şekil 2.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. İn vitro doku modelleri ve örnek kullanım alanları (68).

2.5. Tıbbi Cihazların Biyolojik Güvenliğinin *In vitro* Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Toksisite değerlendirmelerinde kullanılan geleneksel hayvan modellerinin bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu sınırlılıklar arasında yüksek maliyet, uzun deney süreleri, türler arası biyolojik farklılıklar ve etik kaygılar yer almaktadır. Bu nedenle son yıllarda toksikolojik değerlendirmelerde *in vitro* test yöntemlerinin kullanımı giderek artmıştır.

In vitro testler, biyolojik etkilerin canlı organizma yerine hücre kültürleri, izole dokular veya biyolojik sistemlerin belirli bileşenleri kullanılarak incelenmesini sağlayan yöntemleri içerir. Bu testlerde genellikle primer hücreler, sürekli hücre hatları veya üç boyutlu hücre kültürü modelleri kullanılmaktadır.

Hücre kültürü temelli testler, toksik maddelerin hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, metabolik aktivite ve hücresel morfoloji üzerindeki etkilerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu testler arasında özellikle sitotoksisite testleri,

toksikolojik değerlendirmelerin temel basamaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Sitotoksisite testleri, bir maddenin veya materyalin hücreler üzerindeki potansiyel toksik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu kapsamda MTT, XTT, NRU test yöntemleri yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bunun yanı sıra, irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen hücre ve doku temelli modeller de toksikoloji alanında önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle yeniden yapılandırılmış insan epidermisi gibi üç boyutlu doku modelleri cilt irritasyon değerlendirmeleri çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmeler, toksisite değerlendirmelerinde hayvan kullanımının azaltılmasına katkı sağlayan önemli alternatif yöntemler arasında yer almaktadır (59, 68).

Tıbbi cihazların insan vücudu ile doğrudan veya dolaylı temas etmesi nedeniyle biyolojik güvenliklerinin değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir. Biyoyumluluk değerlendirmesi, bir tıbbi cihazın kullanım amacı doğrultusunda kabul edilebilir bir biyolojik yanıt oluşturup oluşturmadığının belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu süreçte cihazın kullanım süresi, temas ettiği doku tipi, temas şekli, materyal özellikleri ve maruziyet koşulları dikkate alınmaktadır.

Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde temel referans doküman olan ISO 10993 serisi standartlar, risk temelli bir yaklaşım benimsemekte ve biyolojik güvenliğin değerlendirilmesinin yalnızca test sonuçlarına değil, tüm mevcut bilimsel verilerin bütüncül olarak analiz edilmesine dayanması gerektiğini belirtmektedir. Son yıllarda ISO 10993 standart serisinde yapılan güncellemelerle birlikte, biyolojik değerlendirmelerde hayvan kullanımının azaltılması ve alternatif yöntemlerin kullanımının artırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda sitotoksisite ve irritasyon gibi biyolojik sonlanım noktalarının değerlendirilmesinde *in vitro* yöntemler ön plana çıkmaya başlamıştır.

In vitro yöntemler; hızlı sonuç alınabilmesi, deney koşullarının yüksek düzeyde kontrol edilebilmesi, maliyet avantajı sağlaması ve insan biyolojisini daha iyi temsil edebilen hücre ve doku modellerinin kullanılabilmesi gibi önemli avantajlara sahiptir. Özellikle RhE gibi üç boyutlu doku modellerinin geliştirilmesi, tıbbi

cihazların lokal biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde *in vitro* yaklaşımların kullanım alanını genişletmiştir.

Bununla birlikte, mevcut çalışmaların önemli bir kısmı katı ve ekstrakte edilebilir tıbbi cihaz materyalleri üzerinde yürütülmüş olup, sıvı, jel, krem, macun ve partikül formundaki ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların doğrudan *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmesine ilişkin veriler sınırlıdır. Bu nedenle, söz konusu ürün gruplarında alternatif *in vitro* yaklaşımların uygulanabilirliğinin araştırılması ve biyolojik güvenlik değerlendirmelerinde kullanılacak bilimsel verilerin artırılması önem taşımaktadır (6, 44, 67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| Kimyasal Maddeler | Firma Adı |
|--|---|
| Dimetilsülfoksit, DMSO | Sigma Aldrich |
| Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri | Biological Industries |
| Dulbecco's Phosphated Buffer Saline (DBPS) | Biological Industries |
| Fötal Bovin Serum (FBS) | Biological Industries |
| 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) | Sigma Aldrich |
| Penisilin-Streptomisin | Biological Industries |
| Sodyum Hidroksit | Riedel-de-Haën |
| Tripan Mavisi | Sigma Aldrich |
| Tripsin EDTA | Gibco |
| Kapalı 24 kuyucuklu EpiDerm™ (EPI-200-SIT) doku kiti | MatTek Corporation EpiDerm™ (EPI-200-SIT) |
| %5 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi | MatTek Corporation EpiDerm™ (EPI-200-SIT) kiti bileşeni |
| İzopropil alkol | MatTek Corporation EpiDerm™ (EPI-200-SIT) kiti bileşeni |
| IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 ve TNF- α ELISA Kitleri | Bioassay Technology Laboratory (BT-Laboratory) |

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| Kullanılan Cihazlar | Firma İsmi ve Modeli |
|--|---|
| 5 ml'lik Dispenser | Eppendorf |
| 5 ml'lik steril plastik pipet | Kirgen |
| 10 ml'lik steril plastik pipet | LP Italiana SPA |
| 15 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 25 ml'lik steril plastik pipet | Cellstar |
| 25 cm ² 'lik flask | Corning |
| Naylon mesh, 8 mm çapında, 200 µm gözenekli (EPI-MESH) | MatTek Corporation EpiDerm™ (EPI-200-SIT) kiti bileşeni |
| 24 kuyucuklu mikroplak | Corning |
| 6 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 50 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 75 cm ² 'lik flask | Corning |
| 96 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 10 µl'lik pipet | Socorex |
| 100 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 100 µl'lik mikropipet | Socorex |
| 1000 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 1000 µl'lik pipet | Socorex |
| Buzdolabı | Arçelik |
| Cam pastör pipeti | İnterlab |
| Deiyonize su cihazı | Barnstead EASYpure UV |
| Derin Dondurucu (-20°C) | Arçelik AEG-1350S |
| Derin Dondurucu (-80°C) | Revco |
| Etüv | Dedeoğlu |
| Handystep | Brand |
| Hassas Terazı | Mettler Toledo |
| Hücre Dondurma Tüpü | Kirgen |
| İnkübatör | Panasonic |
| Kapaklı tüp (1.5 ml) | Eppendorf |
| Laminar Akımlı Kabin | Holten Laminair |

| | |
|---------------------|--------------------------|
| Multipipet | Socorex |
| Neubauer Camı | Marienfeld |
| Otoklav | Monarch |
| Otomatik Pipetör | Topscien |
| Rezervuar | Isolab |
| Santrifüj | Heraeus, Hettich |
| Su Banyosu | Termal® Laboratory Tools |
| UV Spektrofotometre | Shimadzu |
| Yatay Çalkalayıcı | Edmund Bühler |

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre hatlarının çoğaltılabilmesi amacıyla 500 ml yüksek glikozlu Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine %10 Fötal Bovin Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.2. Sitotoksosite Çalışmaları için MTT Çözeltisinin Hazırlanması

MTT çözeltisi hazırlanabilmesi için 10 mg MTT hassas terazide tartılarak 1 ml DPBS içinde çözülerek hazırlanmıştır.

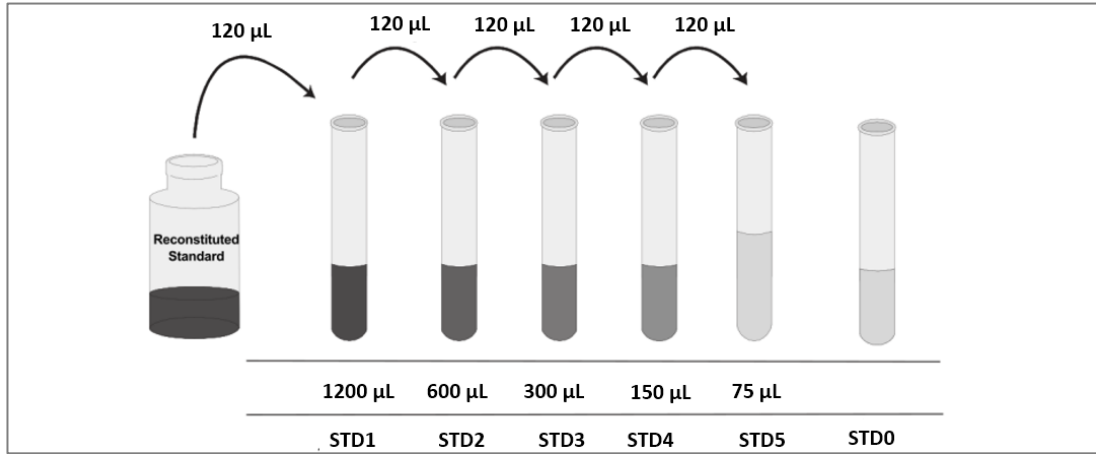
3.2.3. Test edilecek tıbbi cihazların sitotoksosite çalışmaları için çözeltilerinin hazırlanması Tez çalışması kapsamında ekstrakte edilemeyen 5 farklı tıbbi cihaz kullanılmıştır. Bunların %10'luk (h/h) çözeltileri hücre kültürü medyumunda hazırlanmış ve çalışma sırasında ½ dilüsyonla 8 farklı konsantrasyonda uygulama yapılmıştır.

3.2.4. Elisa Testleri İçin Standart Çözeltisi Hazırlama

➤ IL-2 Analizi için Standart Çözeltisi Hazırlama

Stok çözeltiden yararlanarak 5 adet standart çözelti, ardışık dilüsyon ile hazırlanmıştır. Bu amaçla 1. tüp içerisinde 120 µL stok çözelti (2400 ng/L), 120 µL standart seyreltici eklenerek 1200 ng/L stok çözelti hazırlanmıştır. Bu standarttan 120 mikrolitre alınarak bir sonraki tüpe eklenmiş ve sırasıyla seri seyreltme metodu ile 600

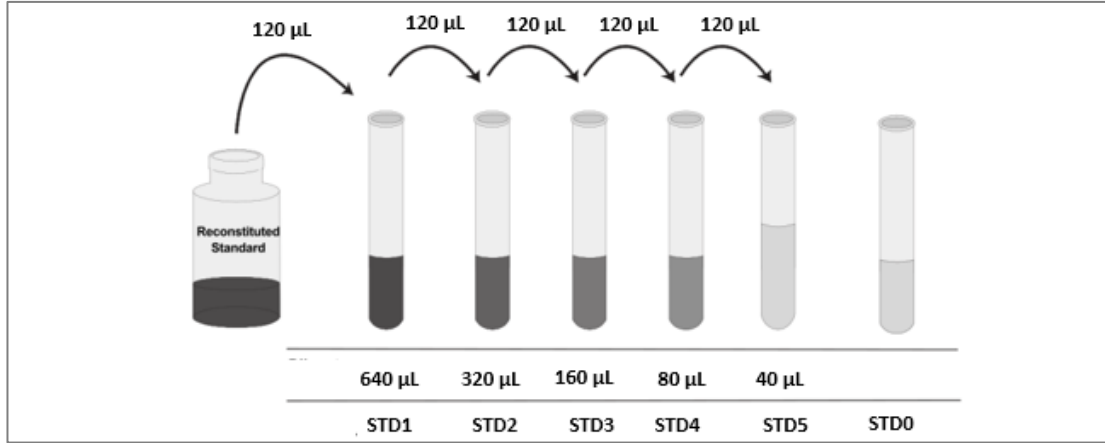
ng/L, 300 ng/L, 150 ng/L ve 75 ng/L konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Ayrıca kör çözeltili olarak da standart seyreltme çözeltileri kullanılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. IL-2 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

➤ IL-4 Analizi için Standart Çözeltileri Hazırlama

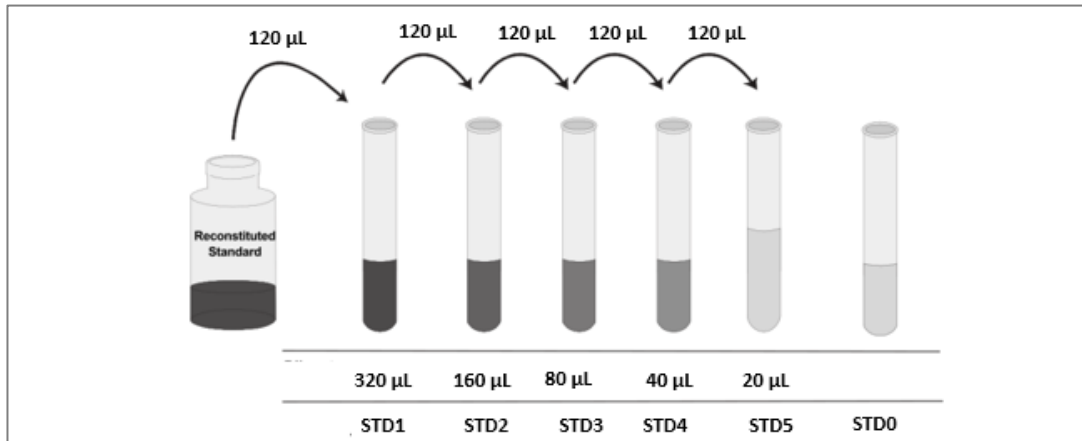
IL-4 analizinde kullanılacak standart eğrinin oluşturulması amacıyla stok standart çözeltilerden seri dilüsyon yöntemiyle standart çözeltiler hazırlanmıştır. İlk dilüsyon aşamasında 120 µL 1280 ng/L konsantrasyonundaki stok standart çözeltili ile 120 µL standart seyreltici karıştırılarak 640 ng/L konsantrasyonunda standart çözeltili elde edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiliden alınan 120 µL hacim, eşit hacimde standart seyreltici içeren tüplere aktararak ardışık iki kat seyreltmeler gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 320, 160, 80 ve 40 ng/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kör olarak yalnızca standart seyreltici çözeltileri kullanılmıştır. (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. IL-4 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

➤ IL-6 Analizi için Standart Çözeltisi Hazırlama

IL-6 analizinde kullanılacak standart çözeltiler, stok standart çözeltiden yararlanılarak seri dilüsyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla 640 ng/L konsantrasyonundaki stok standart çözeltiden 120 µL alınarak aynı hacimde standart seyreltici ile karıştırılmış ve 320 ng/L konsantrasyonunda ilk standart elde edilmiştir. Ardından iki kat seri seyreltme yöntemi uygulanarak sırasıyla 160, 80, 40 ve 20 ng/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kör çözeltisi olarak standart seyreltici kullanılmıştır (Şekil 3.3.).

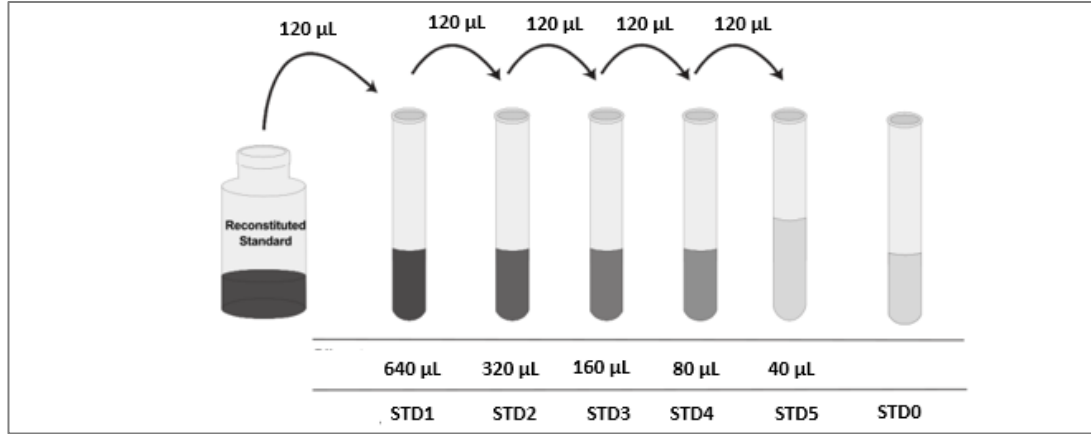


Şekil 3.3. IL-6 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

➤ IL-8 Analizi için Standart Çözeltisi Hazırlama

IL-8 standart eğrisinin oluşturulması amacıyla stok standart çözeltiden seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. İlk olarak 1280 ng/L konsantrasyonundaki stok standart

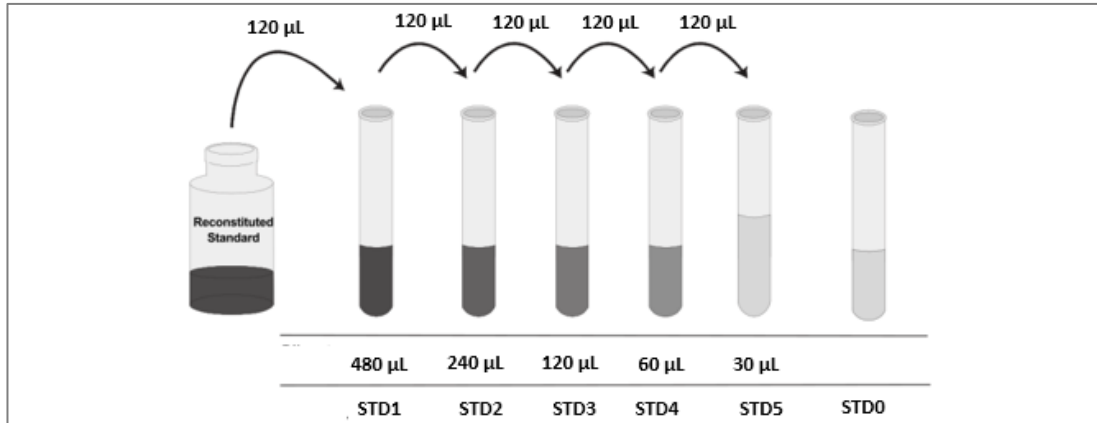
çözeltiden 120 µL alınarak 120 µL standart seyreltici ile karıştırılmış ve 640 ng/L konsantrasyonunda başlangıç standardı elde edilmiştir. Daha sonra ardışık iki kat seyreltmeler uygulanarak sırasıyla 320, 160, 80 ve 40 ng/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Negatif kontrol (kör) olarak standart seyreltici kullanılmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. IL-8 Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

➤ **TNF- α Analizi için Standart Çözeltisi Hazırlama**

TNF- α analizinde kullanılacak standart çözeltiler seri dilüsyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu kapsamda 960 ng/L konsantrasyonundaki stok standart çözeltiden 120 µL alınmış ve aynı hacimde standart seyreltici ile karıştırılarak 480 ng/L konsantrasyonunda ilk standart çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiden ardışık olarak gerçekleştirilen iki kat seyreltmeler sonucunda sırasıyla 240, 120, 60 ve 30 ng/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kör çözeltisi olarak standart seyreltici kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. TNF- α Analizi için Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

3.3. Yöntemler

Bu tez çalışmasında hayvan çalışmalarının azaltılması amacıyla önem kazanan *in vitro* alternatif yöntemlerin ekstrakte edilmeyen tıbbi cihazların güvenliliğinin değerlendirilmesinde etkinliğinin gösterilmesine katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Bu amaçla ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazlar kapsamında 5 ürün belirlenmiştir. Belirlenen ürünler Hiyalüronik asit dermal dolgu ve dudak dolgusu, ultrason jeli, yara bakım jeli ve kalsiyum hidroksipatit dermal dolgudur.

Kullanılan tıbbi cihazlar:

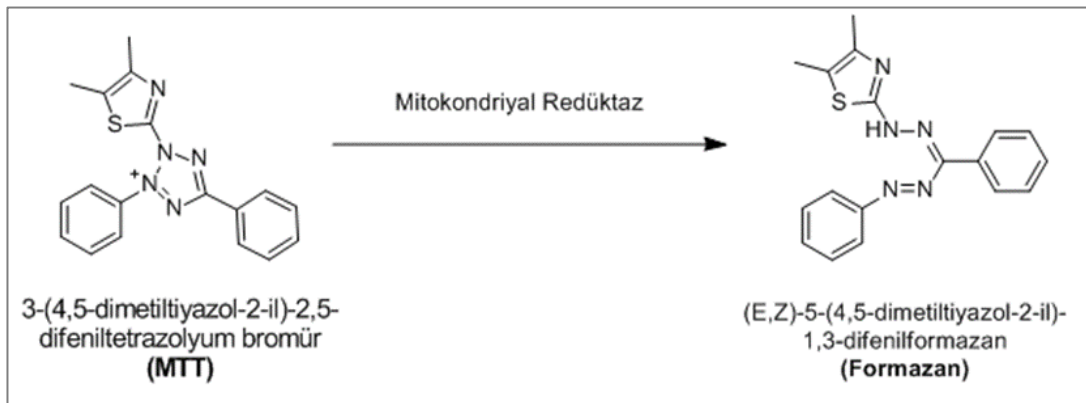
- 1: Hiyalüronik Asit Dermal Dolgu
- 2: Ultrason Jeli
- 3: Yara Bakım Jeli
- 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu
- 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu

3.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada 3T3 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler, fare (*Mus musculus*) embriyonik fibroblastlarından türetilen hücre hattıdır. Hücreler, DMEM besiyeri içerisinde 75 cm² 'lik hücre kültürü plaklarına ekilerek, 37°C'de %5 CO₂ salınım şartlarını sağlayan inkübatör ortamında çoğaltılmıştır.

3.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) Testi

Hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirilmesinde, materyallere doğrudan veya dolaylı maruziyet esasına dayanan çeşitli toksikolojik tarama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olup sitotoksisite değerlendirmelerinde altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (73). MTT temelli prosedürler; memeli hücre hatları, bakteriler ve mantarlar dâhil olmak üzere farklı biyolojik sistemlerde yaygın şekilde uygulanmaktadır (74). Bu yöntemde hücrelerin metabolik aktivitesi kolorimetrik olarak değerlendirilmekte ve elde edilen sonuçlar hücre canlılığı hakkında dolaylı bilgi sağlamaktadır.



Şekil 3.6. MTT'nin formazana indirgenme mekanizması (75).

MTT methodu Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilmiştir ve reaksiyon Şekil 3.6. 'da gösterilmektedir (75). MTT testi, 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmektedir. MTT testinin amacı, çoğalan canlı hücreler tarafından artan dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak mitokondriyal redüktaz enzimi ile tetrazolyumdan oluşan mor renkli formazan kristallerinin absorbansının kolorimetrik olarak spektrofotometrede ölçülmesidir.

Yapılan çalışmada, uygulanan tıbbi cihaz test örneklerinin sitotoksisitenin değerlendirilmesinde MTT testi kullanılmıştır. Bu amaçla, test maddelerinin uygulanmasını takiben 100 µl DPBS içinde çözülmüş olan 10 mg/ml MTT her bir kuyucuğa ilaç çözeltilerinin dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmasını takiben eklenmiş ve

3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristalleri MTT'nin uzaklaştırılmasını takiben 100 µl DMSO eklenerek çözülmüş, 570 nm' de absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 kabul edilerek, sitotoksik ilaçların uygulandığı hücrelerin absorbans değerlerine göre hücre canlılık %'leri hesaplanmıştır.

3.3.3. Ekstrakte Edilmeyen Tıbbi Cihazların Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi

Sitotoksite değerlendirmelerinde, test materyalinin jel formunda olması ve yüksek viskoziteye sahip yapısı nedeniyle standart ekstrakt yaklaşımına ek olarak uygun dilüsyon serileri uygulanmıştır. Bu kapsamda test, %10 başlangıç konsantrasyonundan itibaren seri dilüsyonlar halinde gerçekleştirilmiştir.

ISO 10993-5 kapsamında sitotoksite testlerinde temel yaklaşım cihaz ekstraktının hücre kültürlerine uygulanması olmakla birlikte, test materyalinin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak uygun dilüsyon stratejisinin belirlenmesi laboratuvarın bilimsel değerlendirmesine bırakılmaktadır. Bu nedenle jel formundaki tıbbi cihazlar için %10'dan başlayan dilüsyon serisinin kullanılması, hücre kültürü sisteminde olası interferansın azaltılması ve doz-yanıt ilişkisinin daha doğru değerlendirilmesi amacıyla tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak hücre sayısı ve uygulanacak tıbbi cihaz dozlarının belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalar incelenmiştir. Belirlenen sayılara uygun olarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Test maddelerinin sitotoksite potansiyelleri 3T3 hücrelerinde değerlendirilmiştir.

Hücrelerin flasklara ekilmesini takiben tutunmaları sağlanmıştır. 3T3 hücrelerinin bulunduğu flasklardan ölü hücreler ve besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücre flasklarındaki medyum kalıntısı DPBS eklenerek yıkanmıştır. Ardından tutunan hücrelere 4 ml tripsin eklenmiş ve hücreler 5 dk inkübatörde tutularak flasktan ayrılmış ve süspande edilmiştir. Bunun ardından hücreler inkübatörden çıkarılmış ve mikroskop ile hücrelerin ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Flask içerisindeki hücrelerin süspande edildiği görüldükten sonra Tripsin-EDTA'nın inaktif hale getirilmesi için 8 ml besiyeri eklenmiştir. Steril pipet ile hücrelerin homojen olarak

dağılması sağlanmıştır. Steril bir tüp içerisine süspende hücre içeren ortamdan 1 ml alınmış ve tripan mavisi eklenmiştir. Bu karışımdan belirli miktar alınarak hücre sayım cihazı ile sayım yapılmıştır. Hücre sayımında ortalama alınmış ve 1ml besiyeri için hücre sayısı belirlenmiştir. Daha sonra eldeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

Tıbbi cihaz test maddelerinin uygulamasından önce, 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 100 mikrolitrede 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Plaklar %5 CO₂ içeren ve 37°C'lik inkübatöre yerleştirilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından inkübatörden çıkarılan plaklardaki besiyeri hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. 5 ayrı tıbbi cihaz örneği için 5 ayrı tüpte hazırlanan %10 luk konsantrasyondaki örnek besiyeri karışımından seri seyreltme yapılacak şekilde kuyucuklara eklenmiş, bu şekilde her bir tıbbi cihaz örneği için 8 farklı konsantrasyon (%10-0,8 aralığında) çalışılmıştır. Hazırlanan örnekleri içeren plaklar 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sitotoksikite testlerinde hücre maruziyet süresi ISO 10993-5 kapsamında test sistemine ve ürün tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmekle birlikte, 24–72 saatlik inkübasyon aralığı literatürde ve standart uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında, jel formundaki tıbbi cihazın hücre kültürü sistemi ile yeterli temas süresinin sağlanması ve olası sitotoksik etkilerin daha stabil bir şekilde değerlendirilebilmesi amacıyla 48 saatlik inkübasyon süresi tercih edilmiştir.

48 saatlik maruziyet süresi, hücresel metabolik aktivitede zamana bağlı değişimlerin daha güvenilir şekilde gözlemlenmesine olanak sağlayarak, erken ve geç sitotoksik yanıtların birlikte değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle seçilen inkübasyon süresi, ISO 10993 çerçevesinde yer alan genel prensiplere uygun şekilde, test materyalinin özellikleri ve değerlendirme amacı doğrultusunda belirlenmiştir.

48 saat inkübasyonun ardından tıbbi cihaz örneklerini içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve hazırlanan MTT çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrol %100 kabul edilerek uygulama yapılan hücreler için hesaplanmıştır.

3.3.2. *In Vitro* Yeniden Yapılandırılmış Üç Boyutlu Doku Modeli Kullanılarak Cilt İritasyonunun Değerlendirilmesi

Günümüzde hayvan deneylerine alternatif olarak geliştirilen metotlar arasında 3 boyutlu üretilen dokular yer almaktadır. Bu dokular ilgili bölgenin özelliklerini gösterebilecek hücresel temele sahiptir. *In vitro* deri iritasyon testlerinde kullanılan RhE modelleri, insan türevli epidermal keratinositlerinden oluşmaktadır. Bu modeller insan epidermisine benzer şekilde; stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum corneum yapısını içerirler. Üç boyutlu dokular ile yapılan testler biyokimyasal ve morfolojik açıdan insan derisi tepkilerine yakın ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini sağlar. RHE modelleri, *in vivo* modellere göre hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir uygulama sağlayabilir (52, 76).

Ticari olarak temin edilen üç boyutlu epidermis dokuları üzerinde seçilen ve farklı sınıfta yer alan 5 adet ekstrakte edilmeyen tıbbi cihaz örneği çalışılmıştır. Uygulama üreticinin protokolleri doğrultusunda *in vitro* deri iritasyon testine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Doku örneğinin Şekil 3.7’de yer almaktadır.



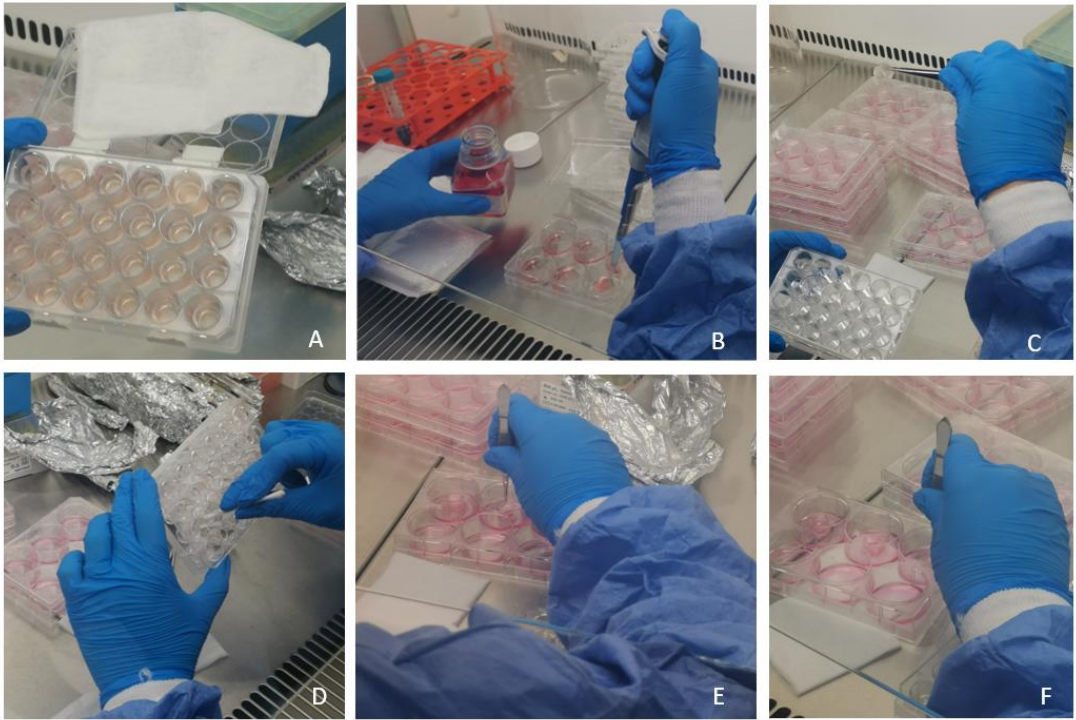
Şekil 3.7. Ticari olarak temin edilen yeniden yapılandırılmış insan epidermis dokuları.

Her bir tıbbi cihaz örneği için 3 doku kullanılmıştır. Çalışmalara başlamadan önce protokolde belirtilen uygulamalar için kullanılacak yeterli sayıda beher, pamuklu çubuk, pens, pipet hazırlanarak otoklav ile steril edilmiştir. 24 lü ve 6 lı plaklar, steril gazlı bez uygulamaya hazır edilmiştir. Her bir örneğin uygulandığı dokunun medyum örneklerini toplamak için kullanılacak steril endorflar numaralandırılmıştır.

Deney Prosedürü

0. Gün- Dozlamadan önceki gün

Test kiti içerisindeki medium oda sıcaklığına getirilmiş 8 adet 6 kuyucuklu plaklara 0,9 ml besiyeri eklenmiştir. Dokular üzerindeki kalıntılar temizlenmiş ve 24 kuyucuklu plak içerisine yerleştirilmiştir. Doku örnekleri görsel olarak incelendikten sonra 6 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Plaklar inkübatöre ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\%5\pm 1 \text{ CO}_2$, $\%90 \pm \%10 \text{ RH}$) yerleştirilmiş ve 60 dakikalık ön inkübasyon bırakılmıştır. Ardından doku örnekleri 6 bölmeli plağın üst bölmesinden alt bölmesine alınmış ve tekrar gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.8.).



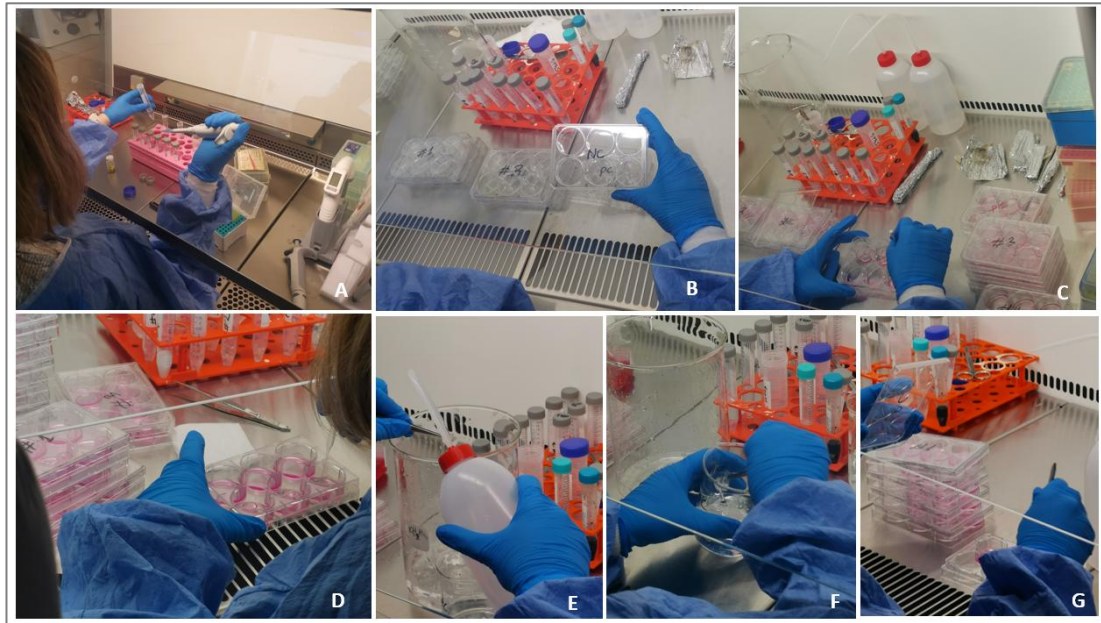
Şekil 3.8. Doku kitinde 0. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. A) Dokuların Kontrolü B) 6'lı plaklara 0,9 ml besiyeri eklenmesi C-D) Dokuların yeni 24'lü plaklara aktarılması ve kontrolü E) Dokuların 6'lı plaklara aktarılması F) İnkübasyon sonrası dokuların 6'lı plaklardaki yerlerinin değiştirilmesi

1. Gün

Test için gerekli tüm materyaller steril kabine yerleştirilmiştir (Önceden doldurulmuş 150 ml DPBS içeren beherler, Steril pamuklu çubuklar, steril ampul başlıklı Pasteur pipetleri, Steril DPBS ile önceden doldurulmuş steril yıkama şişeleri, Steril gazlı bez, Steril uçlar ve pipetler, Tüm kimyasalları içeren flakonlar, Negatif

kontrol (NC) (steril DPBS) ve Pozitif kontrol (PC) (%5 Sodyum Dodesil Sülfat, SDS), keskin- sivri uçlu cımbız, Atık için 1 büyük beher).

Uygulanacak örnekler hazırlanmıştır. Yeni yeterli sayıda 6 kuyucuklu plaklar örnek numaralarına uygun olarak numaralandırılmış (1, 2, 3, 4, 5, NC, PC) ve her bir plak kuyucuklarına 0,9 ml besiyeri eklenmiştir. Her bir kimyasal için bir plak kullanılmıştır. Dokuları içeren plaklar örnek uygulamasından yaklaşık 5 dakika öncesinde oda ısısına gelmek üzere buzdolabından çıkarılmıştır. Örnekler her bir dokuya 1'er dakika arayla olacak şekilde eklenmiş ve tüm plaklar 35 ± 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüm dokular sırasıyla yıkanmıştır. Ardından tüm dokular yeni plaklara aktarılmış ve 24 ± 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.9.).

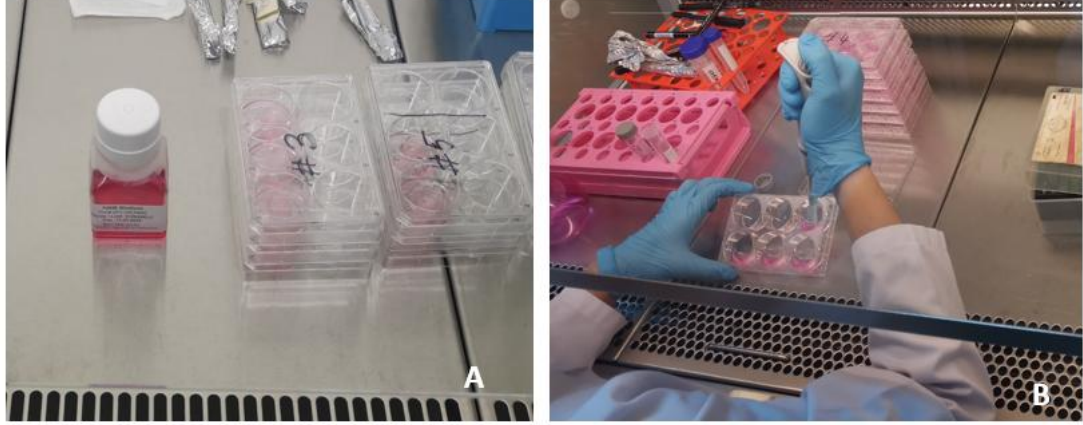


Şekil 3.9. Doku kitinde 1. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. A) Örneklerin hazırlanması B)Plakların numaralandırılması C)Dokuların kontrolü D)Örneklerin uygulanması E-F) İnkübasyon sonrası dokuların örneklerden arındırılması G) Dokuların yeni 6'lı plaklara aktarılması ve kontrolü

2. Gün

24 ± 2 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, 6 kuyucuklu plakların üst sırasındaki doku insertleri alt sıraya aktarılmış ve 18 ± 2 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan elde edilen üst kuyucuktaki medyum sitokin

salınımı açısından analiz edileceği için, yeterli sayıda numaralandırılmış ependorfların içerisine aktarılmıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Doku kitinde 2. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. A) İnkübasyon sonrası plakların alt sırasına besiyeri eklenmesi ve dokuların aktarılması B) İnkübasyon sonrası elde edilen ortamın analiz için toplanması

3. Gün

2 adet 24 kuyucuklu plak hazırlanmış ve örneklere uygun olarak numaralandırılmıştır. MTT çözeltisi hazırlanmış ve plaklara eklenmiştir. İnkübatörden çıkarılan dokular, kurularak MTT ile doldurulmuş 24'lü plağa aktarılmış ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra MTT çözeltisi aspire edilmiştir. Dokular durulanmış ve yeni plağa aktarılmıştır. Dokuların her iki tarafını kaplayacak şekilde plakların her bir kuyucuğuna 2 ml izopropanol eklemiş ve çalkalayıcıda 2 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon süresi tamamlandıktan sonra insertler delinmiş ve kuyuya aktarılmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi homojen olana kadar 3 kez yukarı aşağı pipet ile karıştırılmıştır. Örnekler numaralandırılmış 96 kuyucuklu plağa atarılmış ve plak spektrofotometrede 570 nm'de okunmuştur (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. Doku kitinde 3. Gün uygulamalarına ilişkin resimler. A) MTT çözeltisinin hazırlanması B)24'lü plakların numaralandırılması C) Dokuların kontrolü ve MTT çözeltisi içeren plaklara aktarımı D) İnkübasyon sonrası görünüm E) MTT çözeltisinin alınması F) İzopropanol eklenmesi G) 96 kuyucuklu plağın numaralandırılması

Hesaplamalarda hataları gidermek için her bir doku ekstraktından 2 örnek alınması gerektiği belirtilmektedir. Excel veri sayfasında bu örneklerin sonuçlarının ortalaması alınarak tek bir değere indirgenmiştir.

3.3.3. TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 Analizleri (ELISA)

İn vitro doku kültürü çalışmalarından elde edilen süpernatant örnekleri, interlökin ve sitokin seviyelerinin belirlenmesi amacıyla farklı mikrosantrifüj tüplerine (ependorf) alınmıştır. Bu örnekler üzerinde TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 analizleri, ticari olarak edinilmiş olan sandviç ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. ELISA, biyolojik örneklerde belirli proteinlerin, sitokinlerin, hormonların veya antijenlerin miktarının belirlenmesinde yaygın olarak

kullanılan immünolojik bir analiz yöntemidir. Yöntemin temel prensibi, hedef analite özgül antikorların kullanılması ve enzim ile işaretlenmiş antikorlar aracılığıyla meydana gelen renk reaksiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Oluşan renk şiddeti örnekte bulunan analit miktarı ile doğru orantılı olup, absorbans değerleri standart eğri kullanılarak kantitatif sonuçlara dönüştürülmektedir.

ELISA, antijen-antikor etkileşimine dayanan ve biyolojik örneklerdeki proteinlerin kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan bir immünolojik analiz yöntemidir. Bu yöntemde hedef analit, özgül antikorlar tarafından yakalanmakta ve enzim konjuge antikorlar aracılığıyla oluşturulan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Elde edilen absorbans değerleri standart eğri ile karşılaştırılarak örneklerdeki analit konsantrasyonları hesaplanmaktadır.

A. TNF- α Düzeylerinin Analizi

Medyum örneklerine salınan TNF- α Düzeylerinin Analizi için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) marka enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) ticari kiti kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Tüm standartlar, numuneler ve kör kontroller oda sıcaklığında ve çift (duplikat) olarak analiz edilmiştir.

Örneklerin uygulanması: Kör kontrol kuyucuklarına yalnızca substrat çözeltileri (A ve B) ile reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiş; numune, Streptavidin-HRP ve biyotin ile işaretlenmiş TNF- α antikor bu kuyucuklara ilave edilmemiştir. Bu uygulama, arka plan absorbansının belirlenmesi ve spesifik sinyalin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Standart kuyucuklarına 50 μ L standart çözelti eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 40 μ L plazma, 10 μ L anti-TNF- α antikor ve 50 μ L streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra plak kapatma membranı ile kapatılmış, nazikçe çalkalanmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Yıkama işlemi: Yıkama çözeltisi distile su ile 1:30 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, 96 kuyucuklu mikropiakin her bir kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde uygulanmış ve ardından uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış bileşenlerin etkin şekilde uzaklaştırılması amacıyla bu işlem toplam beş kez tekrarlanmıştır.

Substrat reaksiyonu: Her bir kuyucuğaya sırasıyla 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL Substrat B çözeltisi eklenmiş, çözeltiler yavaşça karıştırılmıştır. Ardından plak, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonun durdurulması: İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğaya 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sırasında kuyucuklarda bulunan mavi renkli çözelti, asidik ortam etkisiyle anında sarı renge dönüşmüştür.

Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hesaplama: Standartların konsantrasyonları ile ölçülen absorban değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklem aracılığıyla örneklerdeki TNF-α düzeyleri nicel olarak belirlenmiş ve sonuçlar ng/L cinsinden ifade edilmiştir.

B. IL-2 Düzeylerinin Analizi

Medyum örneklerine salınan IL-2 düzeylerinin analizi için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) marka enzim bağı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) ticari kiti kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Tüm standartlar, numuneler ve kör kontroller oda sıcaklığında ve çift (duplikat) olarak analiz edilmiştir.

Örneklerin uygulanması: Kör kontrol kuyucuklarına yalnızca substrat çözeltileri (A ve B) ile reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiş; numune, Streptavidin-HRP ve biyotin ile işaretlenmiş IL-2 antikor bu kuyucuklara ilave edilmemiştir. Bu uygulama, arka plan absorbansının belirlenmesi ve spesifik sinyalin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 40 µL plazma, 10 µL anti-IL-2 antikor ve 50 µL streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra plak kapatma membranı ile kapatılmış, nazikçe çalkalanmış ve 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Yıkama işlemi: Yıkama çözeltisi distile su ile 1:30 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, 96 kuyucuklu mikropolün her bir kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde uygulanmış ve ardından uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış bileşenlerin etkin şekilde uzaklaştırılması amacıyla bu işlem toplam beş kez tekrarlanmıştır.

Substrat reaksiyonu: Her bir kuyucuğaya sırasıyla 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL Substrat B çözeltisi eklenmiş, çözeltiler yavaşça karıştırılmıştır. Ardından plak, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonun durdurulması: İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğaya 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sırasında kuyucuklarda bulunan mavi renkli çözelti, asidik ortam etkisiyle anında sarı renge dönüşmüştür.

Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hesaplama: Standartların konsantrasyonları ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklem aracılığıyla örneklerdeki IL-2 düzeyleri nicel olarak belirlenmiş ve sonuçlar ng/L cinsinden ifade edilmiştir.

C. IL-4 Düzeylerinin Analizi

Medyum örneklerine salınan IL-4 Düzeylerinin Analizi için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) marka enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) ticari kiti kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Tüm standartlar, numuneler ve kör kontroller oda sıcaklığında ve çift (duplikat) olarak analiz edilmiştir.

Örneklerin uygulanması: Kör kontrol kuyucuklarına yalnızca substrat çözeltileri (A ve B) ile reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiş; numune, Streptavidin-HRP ve biyotin ile işaretlenmiş IL-4 antikor bu kuyucuklara ilave edilmemiştir. Bu uygulama, arka plan absorbansının belirlenmesi ve spesifik sinyalin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 40 µL plazma, 10 µL anti-IL-4 antikor ve 50 µL streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra plak kapatma membranı ile kapatılmış, nazikçe çalkalanmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Yıkama işlemi: Yıkama çözeltisi distile su ile 1:30 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, 96 kuyucuklu mikropłakın her bir kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde uygulanmış ve ardından uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış bileşenlerin etkin şekilde uzaklaştırılması amacıyla bu işlem toplam beş kez tekrarlanmıştır.

Substrat reaksiyonu: Her bir kuyucuğaya sırasıyla 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL Substrat B çözeltisi eklenmiş, çözeltiler yavaşça karıştırılmıştır. Ardından plak, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonun durdurulması: İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğaya 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sırasında kuyucuklarda bulunan mavi renkli çözelti, asidik ortam etkisiyle anında sarı renge dönüşmüştür.

Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hesaplama: Standartların konsantrasyonları ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklem aracılığıyla örneklerdeki IL-4 düzeyleri nicel olarak belirlenmiş ve sonuçlar ng/L cinsinden ifade edilmiştir.

D. IL-6 Düzeylerinin Analizi

Medyum örneklerine salınan IL-6 Düzeylerinin Analizi için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) marka enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) ticari kiti kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Tüm standartlar, numuneler ve kör kontroller oda sıcaklığında ve çift (duplikat) olarak analiz edilmiştir.

Örneklerin uygulanması: Kör kontrol kuyucuklarına yalnızca substrat çözeltileri (A ve B) ile reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiş; numune, Streptavidin-HRP ve biyotin ile işaretlenmiş IL-6 antikor bu kuyucuklara ilave edilmemiştir. Bu uygulama, arka plan absorbansının belirlenmesi ve spesifik sinyalin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 40 µL plazma, 10 µL anti IL-6 antikor ve 50 µL streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra plak kapatma membranı ile kapatılmış, nazikçe çalkalanmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Yıkama işlemi: Yıkama çözeltisi distile su ile 1:30 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, 96 kuyucuklu mikropolanın her bir kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde uygulanmış ve ardından uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış bileşenlerin etkin şekilde uzaklaştırılması amacıyla bu işlem toplam beş kez tekrarlanmıştır.

Substrat reaksiyonu: Her bir kuyucuğa sırasıyla 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL Substrat B çözeltisi eklenmiş, çözeltiler yavaşça karıştırılmıştır. Ardından plak, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonun durdurulması: İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sırasında kuyucuklarda bulunan mavi renkli çözelti, asidik ortam etkisiyle anında sarı renge dönüşmüştür.

Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hesaplama: Standartların konsantrasyonları ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklem aracılığıyla örneklerdeki IL-6 düzeyleri nicel olarak belirlenmiş ve sonuçlar ng/L cinsinden ifade edilmiştir.

E. IL-8 Düzeylerinin Analizi

Medyum örneklerine salınan IL-8 Düzeylerinin Analizi için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) marka enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) ticari kiti kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Tüm standartlar, numuneler ve kör kontroller oda sıcaklığında ve çift (duplikat) olarak analiz edilmiştir.

Örneklerin uygulanması: Kör kontrol kuyucuklarına yalnızca substrat çözeltileri (A ve B) ile reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiş; numune, Streptavidin-HRP ve biyotin ile işaretlenmiş IL-8 antikor bu kuyucuklara ilave edilmemiştir. Bu uygulama, arka plan absorbansının belirlenmesi ve spesifik sinyalin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 40 µL plazma, 10 µL anti-IL-8 antikor ve 50 µL streptavidin-HRP

ilave edilmiştir. Daha sonra plak kapatma membranı ile kapatılmış, nazikçe çalkalanmış ve 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Yıkama işlemi: Yıkama çözeltisi distile su ile 1:30 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, 96 kuyucuklu mikropiakin her bir kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde uygulanmış ve ardından uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış bileşenlerin etkin şekilde uzaklaştırılması amacıyla bu işlem toplam beş kez tekrarlanmıştır.

Substrat reaksiyonu: Her bir kuyucuğā sırasıyla 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL Substrat B çözeltisi eklenmiş, çözeltiler yavaşça karıştırılmıştır. Ardından plak, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonun durdurulması: İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğā 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sırasında kuyucuklarda bulunan mavi renkli çözelti, asidik ortam etkisiyle anında sarı renge dönüşmüştür.

Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hesaplama: Standartların konsantrasyonları ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklem aracılığıyla örneklerdeki IL-8 düzeyleri nicel olarak belirlenmiş ve sonuçlar ng/L cinsinden ifade edilmiştir.

3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz kapsamında gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde bağımsız örneklem t-testi uygulanmış, istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur.

İstatistiksel değerlendirmelerin Excel ortamında yapılması, veri setinin görece sınırlı büyüklüğe sahip olması ve analizlerin temel karşılaştırma düzeyinde (iki grup

arası farklılıkların incelenmesi) gerçekleştirilmesi nedeniyle tercih edilmiştir. Bu kapsamda Excel, gerekli parametrik testlerin uygulanmasına ve sonuçların hızlı, tekrarlanabilir ve şeffaf biçimde elde edilmesine imkân sağlayan yeterli bir yazılım olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Bulguları

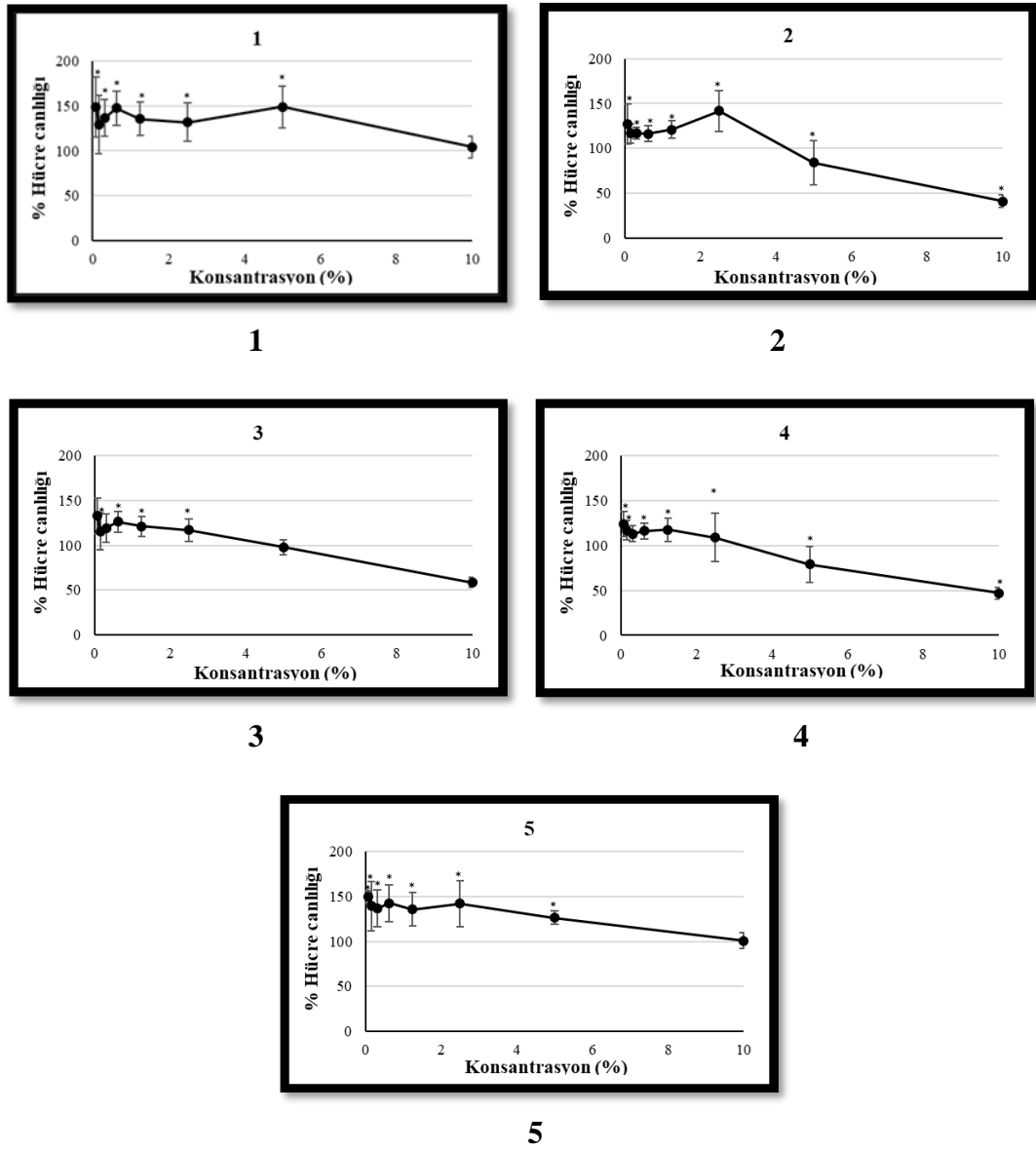
Çalışmada kullanılan test örneklerine ait hücre canlılık düzeyleri, %10–%0,08 (h/h) aralığında sekiz farklı konsantrasyonda değerlendirilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, 1 ve 5 numaralı test örneklerinin içeriğinde bulunan hiyalüronik asit nedeniyle tüm test edilen konsantrasyonlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı ($p<0,05$) belirlenmiştir.

2 numaralı test örneğinde ise %5 ve %10 (h/h) konsantrasyonlarında sitotoksik etki gözlenmiş, buna karşılık daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde, 3 numaralı test örneğinde %10 (h/h) konsantrasyonda sitotoksosite tespit edilirken, %2,5 (h/h) ve altındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

4 numaralı test örneğinde de %5 ve %10 (h/h) konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı, daha düşük konsantrasyonlarda ise hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Elde edilen bulguların özeti Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Tıbbi Cihaz Test Örneklerine İlişkin Sitotoksikite Bulguları.

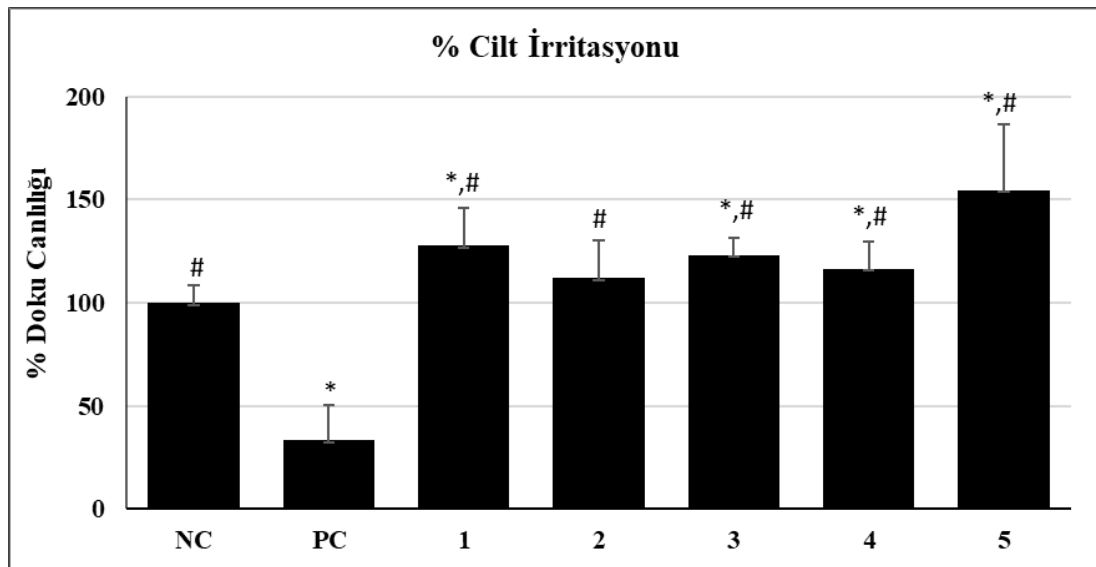
1:Hyalüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. *p<0.05: kontrolden farklı

4.2. *In vitro* Cilt İrritasyon Testi Bulguları

Tıbbi cihaz test örneklerinin irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla alternatif test yöntemlerinden biri olan Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi (Reconstructed Human Epidermis, RhE) modeli kullanılmıştır. Çalışmada negatif kontrol grubuna ait doku canlılığı %100 olarak kabul edilmiş, test örneklerinin uygulandığı dokuların canlılık oranları bu referans değer üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, tüm test örneklerinin

uygulandığı doku gruplarında canlılık oranlarının, deney prosedüründe irritasyon kriteri olarak kabul edilen %50 eşik değerinin üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, incelenen tıbbi cihazların *in vitro* koşullarda iritan etki göstermediğini ortaya koymuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan SDS uygulanan dokularda ise, beklendiği üzere hücre canlılık oranının %50'nin altına düştüğü ve belirgin iritan etki oluştuğu saptanmıştır. Böylece test sisteminin geçerliliği doğrulanmıştır. Bununla birlikte, elde edilen veriler doğrultusunda farklı risk sınıflarına ait tıbbi cihazların cilt irritasyon potansiyellerinin, *in vitro* Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak güvenilir ve uygulanabilir şekilde değerlendirilebildiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, test numunelerinin negatif kontrole kıyasla hücre canlılığını anlamlı şekilde yükselttiği, pozitif kontrolün ise anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de ve Tablo 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. İn vitro Cilt İrritasyon Testi Bulguları.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0,05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0,05$: pozitif kontrolden farklı

Tablo 4.1. İn vitro Cilt İritasyon % Değerleri.

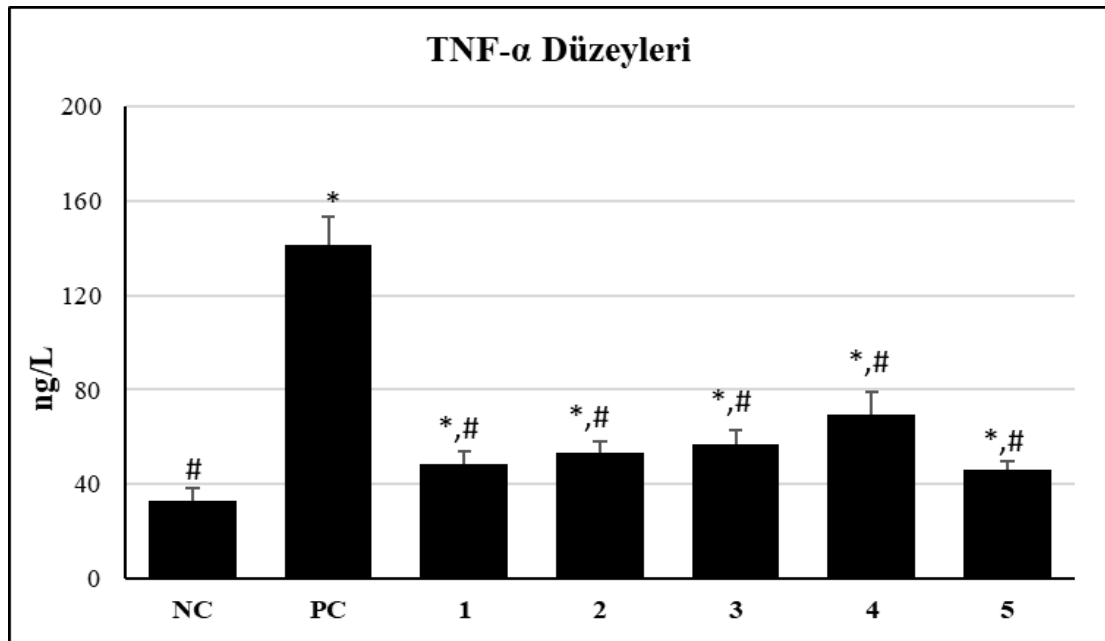
| Gruplar | % Canlılık ± SS |
|---------|-----------------------------|
| NC | 100.00±8.23 [#] |
| PC | 33.48±16.95 [*] |
| 1 | 127.80±18.43 ^{*,#} |
| 2 | 111.95±18.06 [#] |
| 3 | 123.15±8.52 ^{*,#} |
| 4 | 116.60±13.11 ^{*,#} |
| 5 | 154.62±31.57 ^{*,#} |

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1:Hiyalüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyalüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0.05$: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

4.3. TNF- α Düzeylerine ilişkin bulgular

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, doku kültür medyumlarında TNF- α düzeyleri değerlendirilmiştir. TNF- α düzeyleri, test örnekleri uygulandığında NC grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş, ancak pozitif kontrol (PC) grubuna göre daha düşük seviyelerde kalmıştır ($p<0,05$). Bu bulgu, keratinosit kaynaklı inflamatuvar yanıtın indüklendiğini ancak güçlü bir iritan etkiye ulaşılmadığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

**Şekil 4.3.** TNF- α Düzeylerine ilişkin bulgular.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1:Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0.05$: pozitif kontrolden farklı

Tablo 4.2. TNF- α Düzeyleri (ng/L).

| Gruplar | TNF- α (ng/L) \pm SS |
|---------|--------------------------------|
| NC | 32.9 \pm 5.6 [#] |
| PC | 141.6 \pm 11.6 [*] |
| 1 | 48.3 \pm 5.8 ^{*,#} |
| 2 | 53.2 \pm 4.8 ^{*,#} |
| 3 | 56.8 \pm 6.1 ^{*,#} |
| 4 | 69.5 \pm 9.75 ^{*,#} |
| 5 | 45.9 \pm 3.9 ^{*,#} |

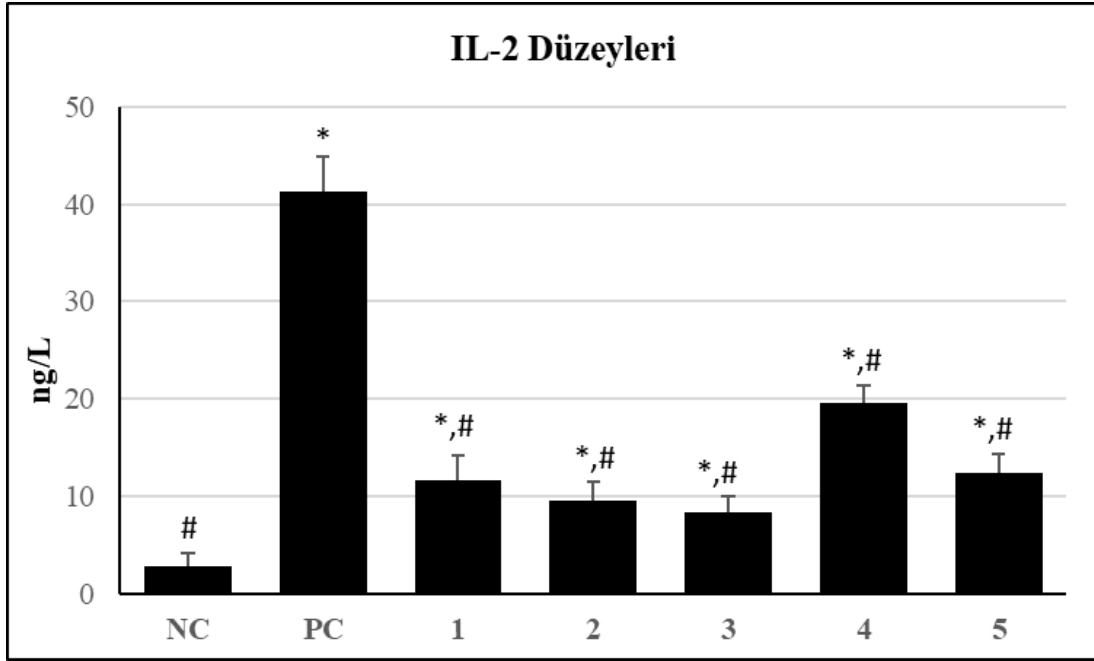
NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1:Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0.05$: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama \pm SS olarak verilmiştir.

4.4. IL-2 Düzeylerine ilişkin bulgular

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, doku kültür medyumlarında IL-2 düzeyleri değerlendirilmiştir.

IL-2 düzeyleri, NC grubuna kıyasla anlamlı artış göstermiş, PC grubuna göre ise anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). RHE modelinde IL-2 üretiminin keratinosit stres yanıtının dolaylı bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te ve Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.4. IL-2 Düzeylerine ilişkin bulgular.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1:Hiyalüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyalüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p < 0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p < 0.05$: pozitif kontrolden farklı

Tablo 4.3. IL-2 Düzeyleri (ng/L).

| Gruplar | IL-2 (ng/L) ± SS |
|---------|----------------------------|
| NC | 2.9 ± 1.25 [#] |
| PC | 41.3 ± 3.6 [*] |
| 1 | 11.6 ± 2.6 ^{*,#} |
| 2 | 9.6 ± 1.85 ^{*,#} |
| 3 | 8.4 ± 1.63 ^{*,#} |
| 4 | 19.6 ± 1.75 ^{*,#} |
| 5 | 12.4 ± 1.9 ^{*,#} |

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1:Hiyalüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyalüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p < 0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p < 0.05$: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

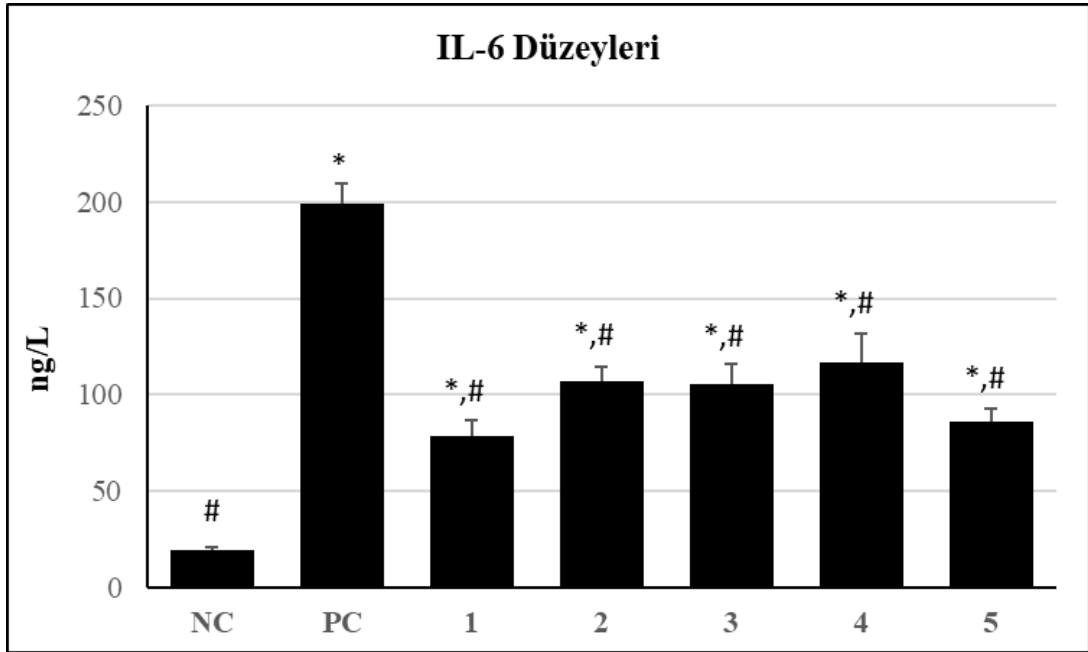
4.5. IL-6 Düzeylerine ilişkin bulgular

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, doku kültür medyumlarında IL-6 düzeyleri değerlendirilmiştir.

IL-6 düzeyleri, NC grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş, ancak PC grubuna göre anlamlı derecede daha düşük seviyelerde seyretmiştir

($p<0,05$). Bu sonuç, keratinosit kaynaklı inflamatuvar yanıtın sınırlı düzeyde indüklendiğini göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te ve Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.5. IL-6 Düzeylerine ilişkin bulgular.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0,05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0,05$: pozitif kontrolden farklı

Tablo 4.4. IL-6 Düzeyleri (ng/L).

| Gruplar | IL-6 (ng/L) ± SS |
|----------------|-----------------------------|
| NC | 19.2 ± 1.7 [#] |
| PC | 198.8 ± 10.6 [*] |
| 1 | 78.3 ± 8.65 ^{*,#} |
| 2 | 106.9 ± 7.45 ^{*,#} |
| 3 | 105.6 ± 10.6 ^{*,#} |
| 4 | 116.3 ± 15.3 ^{*,#} |
| 5 | 85.9 ± 6.5 ^{*,#} |

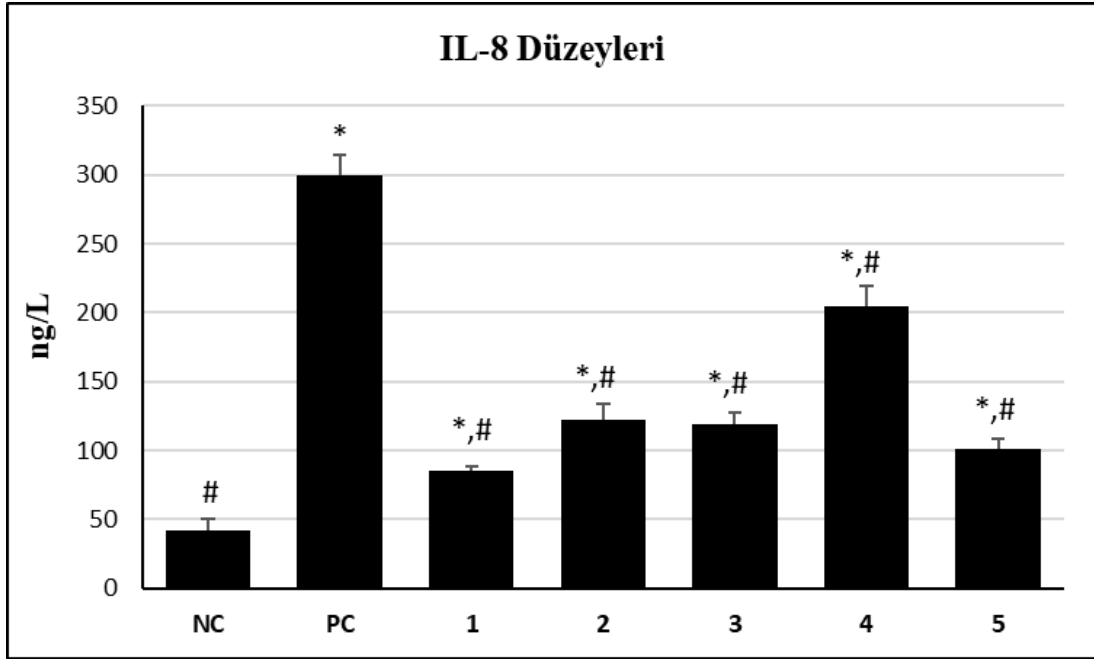
NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p < 0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p < 0.05$: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

4.6. IL-8 Düzeylerine ilişkin bulgular

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, doku kültür medyumlarında IL-8 düzeyleri değerlendirilmiştir.

IL-8 düzeyleri, NC grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmış, PC grubuna göre ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu bulgu, epidermal modelde kemotaktik ve proinflamatuvar yanıtın test materyalleri tarafından sınırlı düzeyde uyarıldığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da ve Tablo 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.6. IL-8 Düzeylerine ilişkin bulgular.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p < 0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p < 0.05$: pozitif kontrolden farklı.

Tablo 4.5. IL-8 Düzeyleri (ng/L).

| Gruplar | IL-8 (ng/L) ± SS |
|---------|-----------------------------|
| NC | 42 ± 8.2 [#] |
| PC | 299.5 ± 15.2 [*] |
| 1 | 85.4 ± 3.45 ^{*,#} |
| 2 | 122.6 ± 11.3 ^{*,#} |
| 3 | 118.9 ± 8.75 ^{*,#} |
| 4 | 204.3 ± 14.9 ^{*,#} |
| 5 | 100.8 ± 7.85 ^{*,#} |

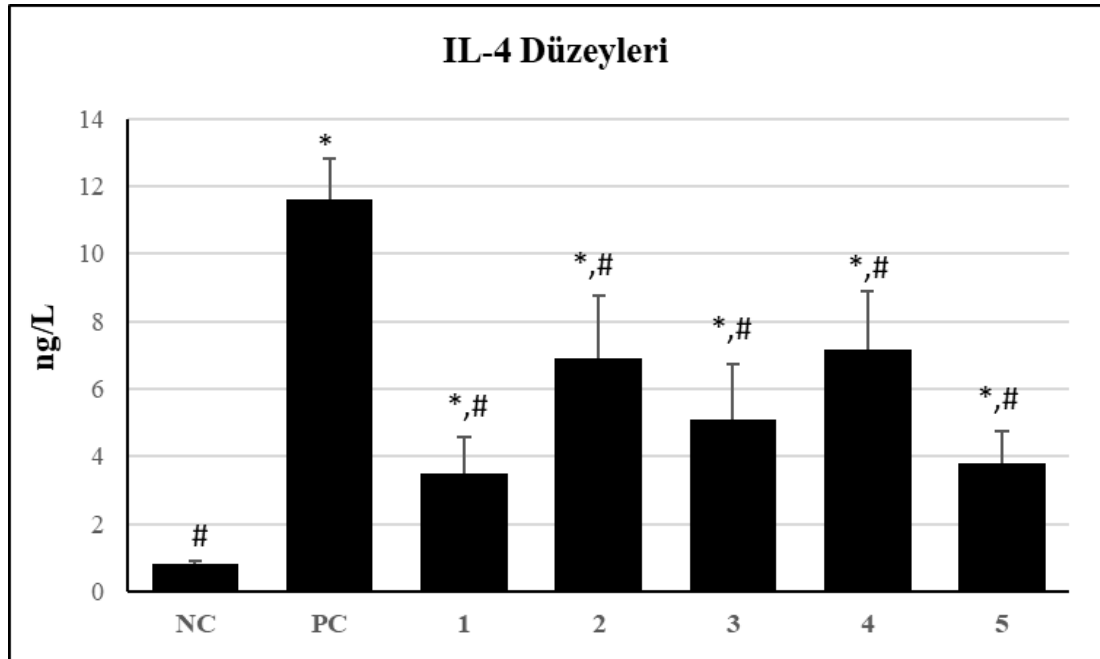
NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p < 0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p < 0.05$: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

4.7. IL-4 Düzeylerine ilişkin bulgular

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, doku kültür medyumlarında IL-4 düzeyleri değerlendirilmiştir.

IL-4 düzeyleri, NC'ye kıyasla anlamlı artış göstermiş, buna karşılık PC grubuna göre anlamlı derecede düşük seviyelerde kalmıştır ($p<0,05$). Bu durum, epidermal hücrelerin stres yanıtı kapsamında sitokin salınımının arttığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de ve Tablo 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.7. IL-4 Düzeylerine ilişkin bulgular.

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. * $p<0.05$: negatif kontrolden farklı; # $p<0.05$: pozitif kontrolden farklı.

Tablo 4.6. IL-4 Düzeyleri (ng/L).

| Gruplar | IL-4 (ng/L) ± SS |
|----------------|----------------------------|
| NC | 0.8 ± 0.1 [#] |
| PC | 11.6 ± 1.2 [*] |
| 1 | 3.5 ± 1.08 ^{*,#} |
| 2 | 6.9 ± 1.85 ^{*,#} |
| 3 | 5.1 ± 1.63 ^{*,#} |
| 4 | 7.15 ± 1.75 ^{*,#} |
| 5 | 3.8 ± 0.95 ^{*,#} |

NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol; 1: Hiyolüronik Asit Dermal Dolgu; 2: Ultrason Jeli; 3: Yara Bakım Jeli; 4: Kalsiyum Hidroksi Apatit Dermal Dolgu; 5: Hiyolüronik Asit Dudak Dolgusu. *p<0.05: negatif kontrolden farklı; #p<0.05: pozitif kontrolden farklı. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tıbbi cihazların biyoyumluluk ve güvenlik profillerinin değerlendirilmesinde *in vitro* test yöntemlerinin kullanımı uzun yıllardır sitotoksisite taramaları ile sınırlı kalmıştır. Ancak, tıbbi cihazların irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla üç boyutlu yeniden yapılandırılmış doku modellerinin kullanımı, ISO 10993-23:2021 standardının yürürlüğe girmesiyle resmi bir kılavuz niteliği kazanmıştır. Bu doğrultuda, NAMs kapsamında değerlendirilen *in vitro* 3D doku modellerine olan eğilim ve bu yöntemlerin güvenilirliğini destekleyen bilimsel çalışmalar ivme kazanmıştır (6, 10, 13, 59, 61, 77).

Bu tez çalışmasının amacı, ekstraksiyona uygun olmayan formülasyon yapısına sahip farklı risk sınıflarındaki tıbbi cihazların biyolojik güvenliklerinin, hayvan deneylerine alternatif olarak geliştirilen *in vitro* yöntemler kullanılarak değerlendirilmesidir. Bu kapsamda tıbbi cihaz örneklerinin sitotoksisite ve irritasyon potansiyellerinin 3T3 fibroblast hücre hattı ve RhE modeli ile belirlenmesi, ayrıca TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeylerinin analiz edilerek oluşan biyolojik yanıtın daha kapsamlı şekilde karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Böylece ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyoyumluluk değerlendirilmesinde yeni yaklaşım metodolojilerinin uygulanabilirliğine yönelik bilimsel veri sağlanması hedeflenmiştir.

Tez kapsamında çalışılan dermal dolgular estetik ve rekonstrüktif uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hiyalüronik asit dermal enjeksiyonların en yaygın bileşeni olmakla birlikte kollajen, poli-l-laktik asit, polimetilmetakrilat, kalsiyum hidroksiapatit gibi farklı hammaddeler de bu alanda kullanılmaktadır. Yüz dolguları, yaşa bağlı yüz hacmi kaybını gidermek ve yaşlanmaya bağlı ince çizgilerin ve kırışıklıkların görünümünü azaltmak amacıyla kullanılmaktadır(78, 79). Estetik amaçlı kullanımının yanı sıra tıbbi amaçlı kullanımı da söz konusudur. Günümüzde kullanımı gittikçe artan bu ürün gruplarının güvenilir bir şekilde insanlara ulaşması için tıbbi cihaz yönetmeliği kapsamındaki ürün gerekliliklerini karşılaması gerekmektedir. Hiyalüronik asit bazlı dolguların genel olarak yüksek biyoyumluluğa sahip olduğu gösterilmekle birlikte; çapraz bağlayıcı ajanlar, partikül boyutu, viskozite ve üretim sürecine bağlı safsızlıklar biyolojik yanıtı etkileyebilmektedir (80, 81).

Canella ve ark. (2019) tarafından piyasada bulunan Hiyalüronik asit içeren 9 farklı dermal dolgunun sitotoksosite profiline ilişkin yapılan çalışmada ürünler ISO 10993-5:2009 standardında belirtilen yöntemlere uygun olarak ekstrakte edilmiş ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ürünlerin, sitotoksik olmadığı hücre çoğalması üzerinde farklı derece olumlu etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışma ile sitotoksosite değerlendirmesinde *in vitro* yöntemlerin hayvan deneyleri yerine tercih edilebileceği vurgulanmaktadır (80).

Pantermehl ve ark. (2024) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise sıkça kullanılan 39 farklı ticari Hiyalüronik asit bazlı dermal dolgu materyalinin sitotoksosite potansiyeli ISO 10993-5 protokollerine göre L929 fibroblastları üzerinde doğrudan ve dolaylı uygulama ile değerlendirilmiştir. Sitotoksosite XTT, BrdU ve LDH testleri ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, XTT testi sonucunda tüm dolguların ISO standardı tarafından öngörülen %70 biyoyumluluk sınırının üzerinde kaldığını raporlamıştır. Buna karşın, LDH analizinde, test edilen 39 dolgudan yalnızca 7 tanesinin sitotoksik eşik değerlerin altında kaldığı, büyük bir kısmının ise yüksek LDH salınımına yol açtığı belirtilmiştir. Bu durumun HA parçacıklarından kaynaklanan mekanik tahriş, çapraz bağlama ajanlarının (örn. BDDE (1,4-bütandiol diglisidil eter)) olası kalıntıları veya dolguların yüksek vizkozitelere bağlı *in vitro* ortamda meydana gelebilecek mekanik/fiziksel baskından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Bu nedenle hücresel yanıtın değerlendirilmesinde farklı biyolojik sonlanım noktalarının birlikte kullanımı önerilmektedir (81).

Bu tez kapsamında çalışılan dermal dolgular sitotoksosite testinde DPBS solüsyonunda seyreltilerek %10'luk konsantrasyonda hazırlanmış ve 8 farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. 1 ve 5 numaralı örnekler Hiyalüronik asit bazlı dermal dolguları 4 numaralı örnek caHA içerikli dolguyu temsil etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, 1 ve 5 numaralı test örneklerinin içeriğinde bulunan hiyalüronik asit nedeniyle tüm test edilen konsantrasyonlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Bu sonuç, Canella ve ark. (2019)'nın HA dolguların hücre çoğalması üzerindeki olumlu etkilerine yönelik değerlendirmesiyle uyumludur. 4 numaralı test örneğinde ise %5 ve %10 (h/h) konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı, daha düşük

konsantrasyonlarda ise hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). 4 numaralı örneğin yüksek konsantrasyonunda gözlenen düşüşün, Pantermehl ve ark. (2024)'nin çalışmasında da tartışıldığı üzere, ürünün yapısının fiziksel özellikleri, polimerik yoğunluğu ve *in vitro* ortamda hücreler üzerinde yaratabileceği mekanik/fiziksel baskıdan kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulguların, literatürde yer alan çalışmalar ile uyumlu olduğu; hiyalüronik asit içerikli dermal dolguların sitotoksosite açısından güvenli biyouyumluluk profili sergilediği, içeriğinde yer alan Hiyalüronik asit ve kalsiyum hidroksiapatit miktarına bağlı olarak farklı oranlarda hücre proliferasyonunu olumlu etkilediği değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında ultrason jeli bir diğer tıbbi cihaz örneği olarak seçilmiştir. Ultrason jeli genel olarak güvenli kabul edilen bir cihaz olmakla birlikte içeriğinde yer alan bazı yardımcı maddelerden kaynaklanabilecek irritasyon riski söz konusu olduğu literatürde bildirilmektedir (82, 83). Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksosite testlerinde ultrason jelinin %5 ve %10 (h/h) konsantrasyonlarında sitotoksik etki gözlenmiş, buna karşılık daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Artan konsantrasyonlarda gözlenen bu düşüşün ultrason jellerindeki yoğun kıvamlaştırıcı yardımcı bileşenlerin (akrilat/karbomer türevleri) hücre kültürlerinde yol açabileceği difüzyon kısıtlaması ile veya jel yapısının fiziksel özellikleri ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında çalışılan diğer ürün grubu yara bakım jelleridir. Yara bakım jelleri hasarlı dokunun iyileşme sürecini hızlandırmak ve estetik açıdan görünümünü düzenlemek amacıyla kullanılan ürün gruplarıdır. Bu amaçla silikon türevi ürünler uzun yıllardır tercih edilmektedir. Yara izi ve skar oluşumunda silikon ve silikon türevi materyallerin yara yüzeyini mikroorganizmalara karşı koruduğu, bariyer etkisi göstererek su kaybını engellediği ve doku onarımında destek sağladığı düşünülmektedir (84, 85).

Yara bakım jeli ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmasında %10 (h/h) konsantrasyonda sitotoksisite tespit edilirken, %2,5 (h/h) ve altındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Artan konsantrasyonlardaki bu düşüşün jel yapısının fiziksel özellikleri, koruyucu maddeler ve yardımcı bileşenler ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Ürünlerin ekstrakte edilmeden direkt uygulaması ile gerçekleştirilen çalışmamızda, ürün içeriği ve konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının değişimi *in vitro* hücre kültürü çalışması ile etkili ve doğru bir şekilde analiz edilebilmiştir.

Tıbbi cihazların güvenlik değerlendirmesinde irritasyonun potansiyelinin değerlendirilmesi önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Bu amaçla, ISO 10993 standartları kapsamında genellikle *in vivo* Draize testi kullanılmakta ve bu amaçla tavşanda deri irritasyon testleri gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte hayvan kullanımının azaltılmasına yönelik yaklaşımlar ve tavşan derisinin insan derisini temsil etmedeki sınırlılıkları nedeniyle alternatif *in vitro* test metotlarına yönelik çalışmaların sayısı giderek artmıştır. Bu alanda RhE doku modelleri ile yapılan çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. RhE doku modelleri bazal hücre tabakasından (stratum basale) keratinize olan dış deri tabakasına (stratum corneum) kadar normal derinin tüm farklı katmanlarını içerebilen modellerdir (6, 10, 57, 60, 61, 86).

Bu doku modelleri ile yapılan çalışmalarda irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla epidermal dokuların canlılık seviyesi ve sitokin salınımı (IL-1 α) analizi sonlanım noktası olarak seçilmektedir. ISO 10993-23:2021 standardında tıbbi cihazların irritasyon potansiyelinin RhE doku modelleri ile değerlendirilmesine yönelik metot tanımlanmış olmakla birlikte, metodun validasyonuna yönelik farklı çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda RhE dokuların etkinliğinin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmaların daha çok ekstrakte edilen tıbbi cihaz örnekleri ile gerçekleştirildiği, ekstrakte edilemeyen tıbbi cihaz örneklerinin değerlendirilmesine yönelik çalışma verilerinin daha sınırlı sayıda olduğu görülmüştür (10, 57). Bu amaçla mevcut tez çalışması kapsamında ekstrakte edilemeyen tıbbi cihaz örnekleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Literatürlerdeki çalışmalar incelendiğinde; Casas ve ark. (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada, EpiDerm™ yeniden yapılandırılmış insan epidermisi modeli kullanılmış, tıbbi cihaz ekstraktlarının irritasyon potansiyelinin değerlendirilebilir olup olmadığı incelenmiştir. Örnekler ISO 10993-12 standardına uygun olarak hem polar (serum fizyolojik) hem de apolar (susam yağı) çözücüler kullanılarak 37°C'de 72 saat ekstrakte edilmiştir. Çalışmada test edilecek tıbbi cihaz ekstraktları içerisinde salınan maddelerin düşük oranda bulunabileceği ve OECD 439 kapsamında kullanılan kısa süreli maruziyet koşullarının yeterli duyarlılığı sağlamayabileceği değerlendirilmiş ve bu nedenle örnekler 24 saat uygulanmıştır. Bu çalışmada hücre canlılığı MTT yöntemi ile değerlendirilmiş, inflamatuvar yanıtın göstergesi olarak IL-1 α salınımı ölçülmüştür. Sonuç olarak iritan içeren ekstraktlarda hücre canlılığının belirgin şekilde azaldığı ve IL-1 α salınımının arttığı gösterilmiş, EpiDerm™ modelinin tıbbi cihaz ekstraktlarının irritasyon değerlendirmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür (67).

Casas ve ark. (2013) tarafından ortaya konulan yaklaşıma ilave olarak, Kandarova ve ark. (2018) tarafından OECD 439 kapsamında onaylanmış EpiDerm™ SIT-MD, Pellevoisin ve ark. (2018) tarafından ise SkinEthic™ RHE tabanlı doku kitleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışmada da tıbbi cihaz ekstraktları 18–24 saat süre ile doku modellerine uygulanmıştır (59, 77).

De Jong ve ark. (2018) tarafından tıbbi cihaz ekstraktlarının irritasyon potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla EpiDerm™ ve SkinEthic™ RHE modelleri ile uluslararası çok merkezli bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmaya 18 farklı laboratuvar dâhil edilmiş, RHE dokuları ISO 10993-12 standardı doğrultusunda ekstrakte edilen tıbbi cihaz örneklerine 18–24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Yapılan çalışmada hücre canlılığı değerlendirilmiş ve hücre canlılığında %50'den fazla azalma, cilt tahrişinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda tuzlu çözelti, susam yağı veya her iki çözücü ekstraktında düşük seviyede bulunan tahriş edici polimer örneklerinin doğru şekilde tanımlanabildiği belirtilmiştir (13).

Ekstrakte edilmeyen tıbbi cihazlara yönelik çalışmalar sınırlı olmakla birlikte güncel literatürde irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yer almaktadır. Bu kapsamda ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazlar için Pellevoisin ve ark.

(2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada jel, krem sıvı formundaki tıbbi cihaz örneklerinin ISO protokolü ile çalışabilirliğinin değerlendirmesi amacıyla 9 adet cihaz örneği seçilmiş ve irritasyon potansiyelleri üç boyutlu dokular ile değerlendirilmiştir. Çalışma örneği olarak dört krem, iki dolgu maddesi, birer adet intraartiküler jel, ultrason jeli ve spreyden oluşan dokuz adet tıbbi cihaz seçilmiştir. Örnekler ekstrakte edilmeden pazarlandığı şekilde ve güçlü ve hafifi irritasyon edici kimyasal maddeler ile karıştırılarak üç boyutlu dokular üzerine direk uygulanmış ve sonlanım noktası olarak doku canlılığı ölçülmüştür. Uygulama metodu olarak OECD 439 ve ISO 10993-23 kapsamında bir metot oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda ISO protokolünün örnekler içindeki irritasyon edici kimyasalları tespit etmede başarılı olduğu gösterilmiştir (10).

Pobis ve arkadaşları tarafından 2024 yılında göz ile temas eden tıbbi cihazların *in vitro* biyoyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* yöntemleri içeren protokoller üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada EpiOcular™ doku modeli ile çalışılmış, cihaz örnekleri ekstrakte edilerek veya pazarlandığı şekilde doku üzerine uygulanmıştır. EpiOcular göz irritasyonu testinin, canlılık ve IL-1 α salınımına dayalı tahmin modelleriyle, oftalmik ürünlerden ve oftalmolojik ilaçlardan kaynaklanabilecek potansiyel göz irritasyonunu tespit edebilecek hassasiyete sahip olduğu değerlendirilmiş yeni doku modellerinin hayvan deneyleri yerine alternatif olarak kullanılabileceğine yönelik destekleyici bir veri sunulmuştur (86).

Pobis ve arkadaşları tarafından 2025 yılında yapılan bir diğer çalışmada ağız içine temas eden tıbbi cihazların biyoyumluluğu 3 boyutlu doku modelleri EpiOcular™ ve EpiOral™ ile çalışılmıştır. EpiOcular™ doku modeli üzerinde gerçekleştirilen oküler irritasyon ve fotoirritasyon protokolünden yola çıkılarak ISO 10993-23:2021 standardı doğrultusunda yanak mukozası irritasyon testi için bir protokol geliştirilmesi amaçlanmıştır. EpiOcular™ (OCL-200), *in vitro* 3 boyutlu kornea benzeri doku modelidir. EpiOral™ (ORL-200) ise keratinleşmemiş 3 boyutlu yeniden yapılandırılmış insan ağız (bukkal) mukozası doku modelidir. Protokol hassasiyetini arttırmak için diş protez yapıştırıcı kremler, ülser tedavisinde kullanılan kremler; diş eti iltihabının tedavisinde kullanılan çözünebilir tabletler; dokularla uzun süreli temas edecek katı malzemeler (örneğin cerrahi iplikler, biyopolimerler) gibi

çeşitli tıbbi cihaz örnekleri seçilmiştir. Örnekler ISO 10993-12:2021 standardına uygun olarak ekstrakte edilerek, seyreltilerek veya direk saf formülasyon haliyle dokulara uygulanmıştır. Test sonucunda hücre canlılığı analizi ve sitokin analizi (IL-1 α) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, higroskopik ve polimerleşen malzemelerin 3D doku modelleri için bir zorluk oluşturabileceğine dair bir değerlendirme yapılmıştır. Bununla birlikte ağız mukozasına temas edecek tıbbi cihazların deri irritasyonu testi için ISO 10993-23:2021 protokolünün uygulanabilir olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ekstrakte edilmeden uygulanan preparatlar doku maruziyet süresince doku modellerine uygulanmıştır. Doku irritasyon riskini belirlemek için örneklerin dokulara kısa süreli (4 saat) ve uzun süreli (18 saat) uygulanması ve IL-1 α seviyesinin analizinin bir yöntem olarak tercih edilebileceği belirtilmiştir. Sitotoksikite ve cilt hassasiyeti verileriyle desteklenen RhE modellerine dayalı protokolün, ağız içi tıbbi cihazların klinik öncesi biyouyumluluk değerlendirmesi için uygun bir *in vitro* test yöntemi olabileceği belirtilmiştir (60).

Bu tez kapsamında Pellovisin ve ark. tarafından 2022 yılında yapılan çalışmada tanımlanan ekstraksiyona uygun olmayan yapıdaki benzer tıbbi cihaz örnek olarak seçilmiştir. Sitotoksikite çalışması sonucunda belirlenen konsantrasyonlara uygun olarak örnekler DPBS içerisinde belirli oranda seyreltilerek ekstrakte edilmeden direk olarak EpiDerm™ doku modeli dokusuna uygulanmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmada hücre canlılığı seviyesi analizine ilave olarak TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu tez kapsamında test yöntemi doku modeli ile temin edilen Mattek firmasına ait İn Vitro EpiDerm™ Cilt Irritasyon Testi (EPI-200-SIT) deney protokolü çerçevesinde düzenlenmiştir. Uygulama sonucunda doku canlılığı ve sitokin salınımı (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6,IL-8) analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, tüm test örneklerinin uygulandığı doku gruplarında canlılık oranlarının, deney prosedüründe irritasyon kriteri olarak kabul edilen %50 eşik değerinin üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan SDS uygulanan dokularda ise, beklendiği üzere hücre canlılık oranının %50'nin altına düştüğü ve belirgin irritan etki olduğu saptanmıştır. Böylece test sisteminin geçerliliği doğrulanmıştır. Bununla birlikte TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeyleri NC'ye kıyasla anlamlı artış göstermiş, buna karşılık PC grubuna göre anlamlı derecede düşük seviyelerde kalmıştır ($p<0,05$). Bu durum, epidermal

hücrelerin stres yanıtı kapsamında sitokin salınımının arttığını ancak irritasyona yol açacak seviye ulaşmadığını göstermektedir.

Tez kapsamında kullanılan dermal dolguların üretici firma tarafından *in vivo* irritasyon testi sonuçları tarafımızla paylaşılmıştır. İritasyon kapsamında yapılan çalışmalar ile üretici firma tarafından sunulan sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada, dermal dolgu ürünlerinin epidermal seviyede düşük irritasyon potansiyeli sergilediği değerlendirilmiştir.

Ultrason jeline yönelik yapılan incelemede literatürde yer alan çalışmalarda koruyucu olarak kullanılan paraben (metilparaben), fenoksietenol ve izotiyazolinon (MI/MCI) gibi yardımcı maddelerin kontakt dermatite yol açabildiği görülmüştür(82, 83). Bu tez kapsamında yapılan çalışmada Pellovisin ve arkadaşları tarafından 2022 yılında gerçekleştirilen çalışma ile uyumlu olarak kullanılan ultrason jelinin irritasyona yol açmadığı görülmüştür.

Silikon bazlı yara bakım jelleri için literatürde güvenli olduğuna yönelik makaleler yer almaktadır. Bu literatürlerle ve Pellovisin ve arkadaşları tarafından 2022 yılında gerçekleştirilen çalışma ile uyumlu olarak tez kapsamında kullanılan yara bakım jelinin doku modellerinde irritasyona yol açmadığı değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasının önemli bulgularından biri, test edilen tüm tıbbi cihaz örneklerinin RhE modelinde irritan olarak sınıflandırılmamasına rağmen TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeylerinde negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışların gözlenmesidir. Bununla birlikte söz konusu artışların tamamı pozitif kontrol grubunda elde edilen düzeylerin altında kalmıştır. Bu durum, test edilen cihazların epidermal dokuda belirli bir biyolojik yanıt oluşturduğunu ancak bu yanıtın doku bütünlüğünü bozacak veya irritasyon sınıflandırmasına yol açacak şiddete ulaşmadığını göstermektedir.

RhE modelleri esas olarak keratinositlerden oluşmaktadır ve bu hücreler yalnızca fiziksel bariyer görevi görmez; aynı zamanda çevresel uyarılara karşı aktif immünolojik yanıt geliştirebilen hücrelerdir. Keratinositler yabancı maddeler, mekanik stres, ozmotik değişiklikler veya yüzey aktif bileşiklerle karşılaştıklarında

çeşitli proinflamatuvar sitokinler salgılayabilmektedir. Bu nedenle sitokin artışı her zaman hücrel hasar veya klinik anlamda irritasyon geliştiği anlamına gelmemektedir. Aksine, hücre canlılığının korunduğu koşullarda gözlenen sitokin artışları adaptif veya koruyucu stres yanıtı olarak değerlendirilmektedir (87).

TNF- α ve IL-6 epidermal inflamasyonun erken faz belirteçleri arasında yer almaktadır. Keratinositlerin fiziksel veya kimyasal uyarılara maruz kalması sonucunda NF- κ B ve MAPK sinyal yollarının aktive olmasıyla bu sitokinlerin üretimi artabilmektedir. Ancak inflamatuvar sitokinlerdeki artışın irritasyon sınıflandırmasına dönüşebilmesi için genellikle buna eşlik eden belirgin hücre hasarı, bariyer bütünlüğünün bozulması ve canlılık kaybı da beklenmektedir (88, 89). Bu tez çalışmasında TNF- α ve IL-6 düzeyleri tüm örneklerde negatif kontrole göre artmış olmasına rağmen doku canlılığı %50 eşik değerinin üzerinde kalmıştır. Bu bulgu, test edilen ürünlerin epidermal hücrelerde düşük düzeyli biyolojik aktivasyon oluşturduğunu ancak sitotoksik veya irritan düzeyde hasar meydana getirmediğini düşündürmektedir.

IL-8, keratinositlerden salınan ve inflamasyon bölgesine nötrofil göçünü düzenleyen önemli bir kemokindir. RhE modellerinde IL-8 artışı birçok durumda erken hücrel stres yanıtının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Özellikle partikül içeren veya yüksek viskoziteli materyallerin uygulanması sonrasında IL-8 düzeylerinde artış görülebilmektedir (90) Çalışmanızda özellikle Kalsiyum hidroksiapatit içeren dermal dolguda IL-8 artışının daha belirgin olması dikkat çekicidir. Kalsiyum hidroksiapatit mikropartiküllerinin çevresel hücrelerle fiziksel etkileşime girebildiği ve düşük seviyeli inflamatuvar sinyalleri aktive edebildiği bilinmektedir. Bununla birlikte bu biyolojik aktivasyonun hücre canlılığında anlamlı bir kayba neden olmaması, gözlenen yanıtın irritasyondan çok fizyolojik hücrel adaptasyon veya materyal-hücre etkileşimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada IL-2 ve IL-4 düzeylerinde de anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bununla birlikte bu sonuçlar dikkatli yorumlanmalıdır. Çünkü RhE modelleri temel olarak keratinositlerden oluşmakta olup T-lenfosit içermemektedir. IL-2 ve IL-4 klasik olarak T hücre kaynaklı sitokinler olarak bilinmektedir. Ancak epidermal hücrelerin düşük düzeylerde bu sitokinleri veya benzer immünomodülatör sinyalleri üretebildiği

bildirilmiştir(91-93). Dolayısıyla bu tez kapsamında gözlenen IL-2 ve IL-4 artışları gerçek bir adaptif immün yanıtın göstergesi olarak değil, epidermal hücrelerin materyal uygulamasına karşı geliştirdiği lokal immünomodülatör aktivitenin bir göstergesi olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca ticari ELISA kitlerinin düşük konsantrasyon aralıklarında biyolojik varyasyonları da yansıtabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu interlökinlerdeki hafif yükseliş, doku modelinin maruz kaldığı eksojen formülasyonu absorbe etme veya bariyer bütünlüğünü homeostatik olarak yeniden dengeleme çabasını (kutanöz immün-stres yanıtı) yansıttığı düşünülebilir.

ISO 10993-23:2021 standardında irritasyon sınıflandırması esas olarak doku canlılığı sonuçlarına dayanmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda yayınlanan çalışmalar, yalnızca canlılık verilerinin materyal-doku etkileşiminin tüm biyolojik boyutlarını açıklamakta yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Bu nedenle IL-1 α , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi biyobelirteçlerin yardımcı sonlanım noktaları olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında yalnızca doku canlılığı değil, aynı zamanda beş farklı sitokin analiz edilmiş olması, ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların oluşturduğu biyolojik yanıtın daha kapsamlı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar, bazı tıbbi cihazların irritan olarak sınıflandırılmaksızın epidermal hücrelerde düşük düzeyli inflamatuvar veya stres yanıtı oluşturabileceğini göstermektedir. Bu durum gelecekte RhE modellerinde sitokin panellerinin yardımcı biyobelirteç olarak kullanılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayabilecek niteliktedir.

Test edilen cihazlar ISO 10993-23 kriterlerine göre irritan değildir; ancak sitokin analizleri, epidermal hücrelerde materyale bağlı düşük düzeyde biyolojik aktivasyon oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle sitokin profillemesi, özellikle ekstrakte edilemeyen tıbbi cihazların biyoyumluluk değerlendirmesinde hücre canlılığı analizlerini tamamlayıcı bir sonlanım noktası olarak değerlendirilebilir.

Çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde hücre kültürü temelli sitotoksosite testleri ile üç boyutlu RhE modellerinin uygulanabilir, güvenilir ve düzenleyici gerekliliklerle uyumlu alternatif yöntemler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca

sitokin analizlerinin, yalnızca hücre canlılığına dayalı değerlendirmelerin ötesine geçerek materyal-doku etkileşimlerine ilişkin ek biyolojik bilgi sağladığı ve inflamatuvar yanıtın daha kapsamlı şekilde karakterize edilmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışması, NAMs kapsamında yer alan *in vitro* hücre ve doku modellerinin, ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyouyumluluk değerlendirilmesinde etkin bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, insan biyolojisini hayvan modellerine kıyasla daha iyi temsil edebilen, daha hızlı sonuç sağlayan, standardizasyonu yüksek ve etik açıdan daha sürdürülebilir test yaklaşımlarının tıbbi cihaz güvenlik değerlendirmelerinde kullanılabilirliğini desteklemektedir. Bunun yanı sıra çalışma, doğrudan ürün uygulamasına dayalı *in vitro* değerlendirme stratejilerinin biyolojik risk analizinde güvenilir veri sağlayabileceğini göstererek, hayvan deneylerinin azaltılması ve uzun vadede yerini alabilecek bilimsel olarak geçerli NAMs yaklaşımlarının yaygınlaştırılmasına katkı sunmaktadır. Bu yönüyle tez, ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyouyumluluk değerlendirilmesinde yeni nesil test stratejilerinin geliştirilmesine ve düzenleyici kabul süreçlerinin bilimsel temellerinin güçlendirilmesine katkı sağlayan özgün veriler ortaya koymuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ekstraksiyona uygun olmayan formülasyon yapısına sahip farklı risk sınıflarındaki tıbbi cihazların biyolojik güvenliklerinin NAMs kapsamında değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda sınıf I ultrason jeli, sınıf IIb yara bakım jeli ve sınıf III dermal dolgu örneklerinin sitotoksosite ve irritasyon potansiyelleri sırasıyla 3T3 fibroblast hücre hattı ve RhE modeli kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca irritasyon değerlendirmesine ek biyolojik sonlanım noktaları kazandırmak amacıyla TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmanın temel amacı, ekstrakte edilmeden uygulanabilen tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde *in vitro* yöntemlerin uygulanabilirliğini ortaya koymak ve bu alandaki bilimsel veri eksikliğine katkı sağlamaktır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında, test edilen tıbbi cihaz örneklerinin konsantrasyona bağlı olarak farklı hücresel yanıtlar oluşturduğu belirlenmiştir. Hiyalüronik asit bazlı dermal dolgu örneklerinin tüm test konsantrasyonlarında hücre canlılığını artırdığı görülmüş, bu durumun Hiyalüronik asidin hücre proliferasyonu ve hücresel metabolizma üzerindeki olumlu etkileri ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Kalsiyum hidroksiapatit içeren dermal dolgu, ultrason jeli ve yara bakım jeli örneklerinde ise yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma gözlenirken, daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular, test edilen materyallerin kimyasal özelliklerinin yanı sıra viskozite, partikül yapısı ve fiziksel özelliklerinin de hücresel yanıt üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

RhE modeli kullanılarak gerçekleştirilen irritasyon çalışmalarında, test edilen tüm tıbbi cihaz örneklerinde doku canlılığının ISO 10993-23:2021 standardında belirtilen %50 eşik değerinin üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Buna göre çalışılan ultrason jeli, yara bakım jeli ve dermal dolgu örneklerinin hiçbirinin irritan olarak sınıflandırılmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Pozitif kontrol grubunda ise beklenildiği şekilde hücre canlılığının belirgin düzeyde azaldığı ve test sisteminin geçerliliğinin sağlandığı gösterilmiştir.

Sitokin analizleri sonucunda TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzeylerinin tüm test örneklerinde negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte söz konusu artışların tamamının pozitif kontrol grubunda gözlenen seviyelerin altında kaldığı saptanmıştır. Bu bulgular, test edilen cihazların epidermal hücrelerde biyolojik aktivasyon ve hücrel stres yanıtı oluşturabildiğini, ancak bu yanıtın doku hasarı veya irritasyon sınıflandırmasına yol açacak düzeye ulaşmadığını göstermektedir. Özellikle IL-6, IL-8 ve TNF- α düzeylerinde gözlenen artışlar, keratinositlerin materyal uygulamasına karşı verdiği erken inflamatuvar yanıtın göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde hücre kültürü temelli sitotoksisite testleri ile üç boyutlu insan epidermisi modellerinin uygulanabilir ve güvenilir alternatif yöntemler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca sitokin analizlerinin, yalnızca hücre canlılığına dayalı değerlendirmelerin ötesinde materyal-doku etkileşimine ilişkin ek bilgi sağlayabildiği ve biyolojik yanıtın daha kapsamlı karakterizasyonuna katkıda bulunabileceği gösterilmiştir.

Bu tez çalışması, ekstraksiyona uygun olmayan tıbbi cihazların biyoyumluluk değerlendirilmesinde doğrudan ürün uygulamasına dayalı *in vitro* yaklaşımların kullanılabileceğine yönelik bilimsel veri sunmakta ve hayvan deneylerinin azaltılmasına yönelik uluslararası çabalara katkı sağlamaktadır.

Öneriler

- Gelecekte yapılacak çalışmalarda daha fazla sayıda tıbbi cihaz örneğinin değerlendirilmesi ve farklı cihaz kategorilerinin çalışmalara dahil edilmesi planlanmaktadır.
- Sitokin analizlerine ek olarak IL-1 α , IL-18 gibi irritasyon ve inflamasyonla ilişkili diğer biyobelirteçlerin de değerlendirilmesi, biyolojik yanıtın daha ayrıntılı karakterizasyonuna katkı sağlayabilir.

- RhE modellerinde elde edilen sitokin yanıtlarının klinik irritasyon bulguları ile ilişkisini ortaya koyabilmek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* korelasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi yararlı olacaktır.
- Ekstrakte edilmeyen tıbbi cihazların değerlendirilmesine yönelik standartlaştırılmış uygulama protokollerinin geliştirilmesi, laboratuvarlar arası uyumun artırılmasına katkı sağlayabilir.
- Uzun süreli veya tekrarlı maruziyet senaryolarını içeren çalışmaların gerçekleştirilmesi, özellikle kronik kullanıma sahip tıbbi cihazların biyolojik etkilerinin daha kapsamlı değerlendirilmesine olanak sağlayabilir.
- Sitokin analizlerinin irritasyon değerlendirmesinde yardımcı sonlanım noktası olarak kullanılabilirliğinin doğrulanması amacıyla daha geniş örnek gruplarıyla validasyon çalışmalarının yürütülmesinin uygun olacağı değerlendirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Medical Devices n.d [Available from: <https://www.who.int/health-topics/medical-devices>]
2. Hocaoğlu A, Topuz F, Özkan G, Suna B. Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmalarında Süreçler. Eurasian Journal of Health Technology Assessment. 2022;6(1):35–45.
3. European Commission. Questions and Answers: Commission proposes an extension of the transitional periods for the application of the Medical Devices Regulation 2023 [updated Jan 6, 2023].
4. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Tıbbi Cihaz Onaylanmış Kuruluşlar ve Uygunluk Değerlendirme Faaliyetleri: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu; [Available from: <https://www.titck.gov.tr/faaliyetalanlari/tibbicihaz/tibbi-cihaz-onaylanmis-kuruluslar-ve-uygunluk-degerlendirme-faaliyetleri>].
5. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices — Part 1: Requirements and general principles for the evaluation of biological safety within a risk management process. ISO,; 2025.
6. Kandarova H, Pobis P. The "Big Three" in biocompatibility testing of medical devices: implementation of alternatives to animal experimentation-are we there yet? Front Toxicol. 2023;5:1337468.
7. European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices. 2017.
8. Coleman K, Christian W, Zhang W. Accelerating medical device biocompatibility evaluation: An industry perspective. Biocompatibility and Performance of Medical Devices: Elsevier; 2020. p. 223–62.
9. Medical Device Coordination Group - MDCG. MDCG 2021-24 Rev.1 Guidance on classification of medical devices. 2026.
10. Pellevoisin C, Coleman KP, Hoffmann S. ISO 10993-23 In vitro irritation testing for medical devices: Substantiating applicability to mild irritants and non-extractables. Toxicol In Vitro. 2022;82:105371.
11. Rowan MLSAMGAN. The First Forty Years of the Alternatives Approach: Refining, Reducing, and Replacing the Use of Laboratory Animals. In: Salem DJ, Rowan AN, editors. The state of the animals 2001. Washington, DC: Humane Society Press; 2001. p. 121–35.
12. Grimm H, Biller-Andorno N, Buch T, Dahlhoff M, Davies G, Cederroth C, et al. Advancing the 3Rs: innovation, implementation, ethics and society. Front Vet Sci 10: 1185706. 2023.
13. De Jong WH, Hoffmann S, Lee M, Kandárová H, Pellevoisin C, Haishima Y, et al. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. Toxicology in Vitro. 2018;50:439–49.

14. Romaniello A, Magri G. Medical Device Categories, Characteristics and Developments. Springer Nature Switzerland; 2026. p. 109–27.
15. Daryanani AE, Maduekwe UN, Baird P, Ehrenfeld JM. Ensuring medical device safety: The role of standards organizations and regulatory bodies. *Journal of Medical Systems*. 2025;49(1):16.
16. Aimer O, Baldrige C. Navigating Medical Device Safety: Current Status, Challenges, and Future Regulatory Directions: O. Aimer, C. Baldrige. *Drug Safety*. 2026;49(2):163–75.
17. T.C. Dışişleri Bakanlığı Avrupa Birliği Başkanlığı. Avrupa Birliği'nin Tarihçesi: AB Başkanlığı; 01/10/2025 [Available from: https://www.ab.gov.tr/avrupa-birliginin-tarihcesi_105.html].
18. European Union. History of the EU [Available from: https://european-union.europa.eu/principles-countries-history/history-eu_en].
19. Institute of Medicine (IOM). History of Medical-Device Legislation and Regulation in the United States. *Medical Devices and the Public's Health: The FDA 510(k) Clearance Process at 35 Years* The National Academies Press; 2011. p. 207–70.
20. Pisac A, Wilson N. FDA Device Oversight From 1906 to the Present. *AMA J Ethics*. 2021;23(9):E712–20.
21. U.S. Food and Drug Administration. A History of Medical Device Regulation & Oversight in the United States [Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/overview-device-regulation/history-medical-device-regulation-oversight-united-states>].
22. Fraser AG, Redberg RF, Melvin T. The Origins of Regulations for Pharmaceutical Products and Medical Devices – What Can be Learned for the Governance of Medical Devices in Europe? *European Review*. 2025;33(5):521–54.
23. Fink M, Akra B. Comparison of the international regulations for medical devices-USA versus Europe. *Injury*. 2023;54 Suppl 5:110908.
24. Sharma A, Luthra G. Significance of ISO 10993 Standards in ensuring biocompatibility of medical devices: A review. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2023;35(8):23–34.
25. Reeve L, Baldrick P. Biocompatibility assessments for medical devices—evolving regulatory considerations. *Expert Review of Medical Devices*. 2017;14(2):161–7.
26. Kramer DB, Xu S, Kesselheim AS. Regulation of medical devices in the United States and European Union. *The ethical challenges of emerging medical technologies*: Routledge; 2020. p. 41–8.
27. Marlowe DE, Phillips PJ. FDA recognition of consensus standards in the premarket notification program. *Biomed Instrum Technol*. 1998;32(3):301–4.
28. U.S. Food and Drug Administration. Quality Management System Regulation Frequently Asked Questions 2026 [updated February 2, 2026. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/quality-management-system-regulation-qmsr/quality-management-system-regulation-frequently-asked-questions>].

29. Keene A. Biological evaluation and regulation of medical devices in the European Union. *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*: Elsevier; 2020. p. 413–40.
30. Simova I, Petkova V, Ognyanov S, Andreevska K, Dimitrov M. The historical evolution of European medical device regulation: from fragmented national systems to a harmonized supranational framework. *Pharmacia*. 2026;73:1–10.
31. Behan R, Watson M, Pandit A. New EU medical device regulations: Impact on the MedTech sector. *Medical Writing*. 2017;26(2).
32. Hocaoğlu AT, Fatih; Sarıhan, Servet; Kuru, Ömer Faruk. *Tıbbi Cihaz Ekosistemi: Yasal Düzenlemeler, Süreçler ve Uygulamalar*: Scala Yayıncılık; 2023.
33. The ‘Blue Guide’ on the implementation of EU product rules 2022, (2022).
34. Organization WH. *Medical device regulations: global overview and guiding principles*: World Health Organization; 2003.
35. Group MDC. *MDCG 2022–5 Rev. 1: guidance on borderline between medical devices and medicinal products under Regulation (EU) 2017/745 on medical devices*. European Commission; October 2024. 2024.
36. Rocco P, Musazzi UM, Minghetti P. Medicinal products meet medical devices: Classification and nomenclature issues arising from their combined use. *Drug Discovery Today*. 2022;27(10):103324.
37. Marangoz S. Kemik çimentosu (Bone cement). *TOTBİD Dergisi*. 2011;10(2):103–8.
38. Nguyen DH, Nguyen TT. Antibiotic-Loaded Bone Cement in Orthopedic Infections: Review of Evidence and Clinical Applications. *Journal of Orthopaedic Reports*. 2026:100976.
39. Aronson JK, Heneghan C, Ferner RE. Medical devices: definition, classification, and regulatory implications. *Drug safety*. 2020;43(2):83–93.
40. Flaticon. Medical device icons 2026 [Available from: <https://www.flaticon.com/free-icons/medical-device>].
41. Chinmai B, Prasanthi D. EU MDR Regulatory Update and Compliance Strategies. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2025;13(6):54–60.
42. Meloni M. The biological evaluation of medical devices: Transition to 2017/745 MDR in progress. *ALTEX*. 2019:479–80.
43. Neubauer R, Schröttner J, Baumgartner C. Safety requirements for medical devices in compliance with European standards. *Medical Devices and In Vitro Diagnostics: Requirements in Europe*: Springer; 2023. p. 157–86.
44. De Jong W, Carraway J, Geertsma R. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. *Biocompatibility and performance of medical devices*: Elsevier; 2020. p. 123–66.
45. Baumgartner C, Harer J, Schröttner J. *Medical devices and in vitro diagnostics: Requirements in Europe*: Springer Nature; 2023.

46. Sevastianov VI, Perova NV, Arzumanyants EV, Perova NM, Kaminskaya NV, Dovzhik IA. Evaluation of the Biological Effect of Medical Devices: General Requirements for Biological Safety (Analytical Review). *Inorganic Materials: Applied Research*. 2024;15(5):1300–10.
47. Liu X, Rodeheaver DP, White JC, Wright AM, Walker LM, Zhang F, et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2018;97:24–32.
48. Kuruca T, Demir D, Akarsu E, Akarsu M. Chemical characterization and toxicological evaluation of acrylic-based dental implant devices used for different purposes within the scope of ISO 10993. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2026;164:105949.
49. International Organization for Standardization. ISO 10993-18:2020 Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process. ISO,; 2020.
50. Ecker W. *Medical Devices and In Vitro Diagnostics: Requirements in Europe*. Cham: Springer. 2022:1–33.
51. Gad SC. *Integrated safety and risk assessment for medical devices and combination products*: Springer Nature; 2020.
52. Kandarova H, Pôbiš P, Sáková O, Jakubovská A. Assessment of cytotoxicity, skin and oral irritation of medical devices with hydrating properties: A case study. *Interdisciplinary Toxicology*. 2025;15(1):19–24.
53. Liu C, Luo H, Wan M, Hou L, Wang X, Shi Y. Strategy on biological evaluation for biodegradable/absorbable materials and medical devices. *Bio-medical materials and engineering*. 2018;29(3):269–78.
54. Nalezinková M. In vitro hemocompatibility testing of medical devices. *Thrombosis research*. 2020;195:146–50.
55. Badnjević A, Pokvić LG, Deumić A, Bećirović LS. Post-market surveillance of medical devices: a review. *Technology and Health Care*. 2022;30(6):1315–29.
56. Bernard M, Jubeli E, Pungente MD, Yagoubi N. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices—regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomaterials science*. 2018;6(8):2025–53.
57. International Organization for Standardization. *Biological evaluation of medical devices Part 23: Tests for irritation*. 2021.
58. Olsen DS, Lee M, Turley AP. Assessment of test method variables for in vitro skin irritation testing of medical device extracts. *Toxicology in Vitro*. 2018;50:426–32.
59. Pellevoisin C, Videau C, Briotet D, Grégoire C, Tornier C, Alonso A, et al. SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology in Vitro*. 2018;50:418–25.
60. Pôbiš P, Milasová T, Kandárová H. Exploring the potential of reconstructed human epithelial tissue models for safety assessment of intraoral medical devices. *Toxicology in Vitro*. 2025;104:105956.


61. Pellevoisin C, Puskar M, Mollignano J, Coen K, Klausner M, Letasiova S. Development of an In Vitro Method for Assessing the Potential Irritation of Medical Devices and OTC Products Used in the Oral Cavity. *Toxics*. 2025;13(4):233.
62. Kato R, Miyajima A, Komoriya K, Haishima Y. Novel cytokine marker available for skin irritation testing of medical devices using reconstructed human epidermis models. *Toxicology in Vitro*. 2020;68:104919.
63. Başaran N, Baydar T, Bucurgat ÜÜ, Dilsiz SA, Erkekoğlu P, Girgin Gözde, et al. *Toksikoloji: Hacettepe Üniversitesi Yayınları*; 2020.
64. Parascandola J. *A History of the Development of Alternatives to Animals in Research and Testing*: Purdue University Press; 2024.
65. Sreelatha HV, Patel S, Nagarajan P. *Animal Models in Research Principles and Practice* 2024.
66. Kinter LB, DeHaven R, Johnson DK, DeGeorge JJ. A brief history of use of animals in biomedical research and perspective on non-animal alternatives. *ILAR journal*. 2021;62(1-2):7–16.
67. Casas J, Lewerenz G, Rankin E, Willoughby Sr J, Blakeman L, McKim Jr J, et al. In vitro human skin irritation test for evaluation of medical device extracts. *Toxicology in vitro*. 2013;27(8):2175–83.
68. Perales SG, Rodriguez M, Rajasingh J, Al Dayeh A, Zhang Y, Dixon D. Advancements in 3D in vitro cell culture models for dental research. *Journal of Oral Biosciences*. 2025;67(4):100702.
69. Athira R, Kripamol R, Anju M, Maya B, Pai RR, Ajit S, et al. Alternatives to animal testing: Concepts, state of art, and regulations. *Biomedical product and materials evaluation*. 2022:501–29.
70. Empl MT, Paul P, Moriarty O, Ponzano S, Beken S, Adler-Flindt S, et al. 3Rs at the European Medicines Agency: Past and future activities. *NAM Journal*. 2026:100086.
71. Food U, Administration D. *Roadmap to reducing animal testing in preclinical safety studies*. US Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA. 2025:1–11.
72. Schmeisser S, Miccoli A, Von Bergen M, Berggren E, Braeuning A, Busch W, et al. New approach methodologies in human regulatory toxicology—Not if, but how and when! *Environment international*. 2023;178:108082.
73. Pintor A, Queiroz L, Barcelos R, Primo L, Maia L, Alves G. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. *International Endodontic Journal*. 2020;53(10):1348–73.
74. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*. 2018;120(4):303–11.
75. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*. 2018;2018(6):pdb. prot095505.

76. Corporation M. In Vitro Skin Models and Their Predictability in Defining Normal and Disease Biology, Pharmacology, and Toxicity [Available from: <https://www.mattek.com/reference-library/rhe-skin-models-and-predictability-in-defining-biology/#:~:text=In%20vitro%20skin%20model%20systems,skin%2C%20including%20clinical%20skin%20toxicity>].
77. Kandarova H, Willoughby JA, De Jong WH, Letasiova S, Milasova T, Bachelor MA, et al. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. *Toxicology in Vitro*. 2018;50:407–17.
78. Clark NW, Pan DR, Barrett DM. Facial fillers: Relevant anatomy, injection techniques, and complications. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2023;9(3):227–35.
79. Czumbel LM, Farkasdi S, Gede N, Mikó A, Csupor D, Lukács A, et al. Hyaluronic Acid Is an Effective Dermal Filler for Lip Augmentation: A Meta-Analysis. *Frontiers in Surgery*. 2021;8.
80. Cannella V, Altomare R, Leonardi V, Russotto L, Di Bella S, Mira F, et al. In Vitro Biocompatibility Evaluation of Nine Dermal Fillers on L929 Cell Line. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8676343.
81. Pantermehl S, Foth A, Meyer E, Barbeck M, Jung O. In vitro cytocompatibility analysis and comparison of different hyaluronic acid fillers for minimally invasive esthetics. *in vivo*. 2024;38(4):1621–35.
82. Verdelli A, Francalanci S, Palleschi GM. Contact allergic dermatitis due to Kathon CG contained in ultrasound gel. *Dermatitis*. 2014;25(1):35–6.
83. Aranzabal MA, Arruti N, Joral A, Lasa EM, Martinez S, Echenagusia MA. Contact urticaria caused by phenoxyethanol in ultrasound gel. *Contact Dermatitis*. 2019;81(2):132–3.
84. Bains P, Kaur S. Silicone in Dermatology: An Update. *J Cutan Aesthet Surg*. 2023;16(1):14–20.
85. Chrusciel JJ. Most Important Biomedical and Pharmaceutical Applications of Silicones. *Materials (Basel)*. 2025;18(11).
86. Pöbiš P, Kubalcová J, Milasová T, Kandárová H. Development of sensitive in vitro protocols for the biocompatibility testing of medical devices and pharmaceuticals intended for contact with the eyes: Acute irritation and phototoxicity assessment. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2024;52(5):261–75.
87. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(3):211–22.
88. Welss T, Basketter DA, Schröder KR. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in vitro*. 2004;18(3):231–43.
89. Corsini E, Galli CL. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicology Letters*. 1998;102:277–82.

90. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT, editors. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*; 2008: Elsevier.
91. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2002;88(1-2):1–12.
92. Junghans V, Jung T, Neumann C. Human keratinocytes constitutively express IL-4 receptor molecules and respond to IL-4 with an increase in B7/BB1 expression. *Experimental dermatology*. 1996;5(6):316–24.
93. Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, Ward NL, Harms PW, Zeng C, et al. Cytokinocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI insight*. 2020;5(20):e142067.

8. EKLER

EK-1: Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below:

| | |
|--------------------|--|
| Submission author: | Betülây GümüŖ |
| Assignment title: | EKSTRAKTE EDİLEMEYEN TIBBİ CİHAZLARIN SİTOTOKSİSİTE VE ... |
| Submission title: | BETÜLAY GÜMÜŖ YÜKSEK LİSANS TEZİ.pdf |
| File name: | BETÜLAY_GÜMÜŖ_YÜKSEK_LİSANS_TEZİ.pdf |
| File size: | 1.97M |
| Page count: | 115 |
| Word count: | 25,821 |
| Character count: | 181,488 |
| Submission date: | 09-Jun-2026 07:38AM (UTC+0300) |
| Submission ID: | 2979524646 |

T.C.
BAĞIŞTIP ENYERBİTESİ
SALIA BİLİM ENYERBİTESİ

EKSTRAKTE EDİLEMEYEN TIBBİ CİHAZLARIN
SİTOTOKSİSİTE VE İRİTASYON POTANSİYELERİNİN
ALTERNATİF DOKU MODELLEİ İLE ARASTIRILMASI

Yaz. Betülây GÜMÜŖ

Farmakölk Toksikolojik Program
SÜNERK LİSANS TEZİ

ANKARA
2026

Copyright 2026 Turnitin. All rights reserved.

EK-2: Orijinallik Raporu

BETÜLAY GÜMÜŞ YÜKSEK LİSANS TEZİ.pdf

ORIGINALITY REPORT

| | | | |
|------------------|------------------|--------------|----------------|
| 7% | 4% | 0% | 9% |
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

PRIMARY SOURCES

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Submitted to Hacettepe University Student Paper | 5% |
| 2 | openaccess.hacettepe.edu.tr Internet Source | 2% |

| | | | |
|----------------------|----|-----------------|------|
| Exclude quotes | On | Exclude matches | < 2% |
| Exclude bibliography | On | | |

9. ÖZGEÇMİŞ**KİŞİSEL BİLGİLER**

| | |
|--|--|
| | |
| | |

EĞİTİM

| YILI | DERECESİ | ÜNİVERSİTE | ÖĞRENİM ALANI |
|------|----------|------------|---------------|
| | | | |

MESLEKİ DENEYİM

| GÖREV DÖNEMİ | ÜNVAN | GÖREV YERİ |
|--------------|-------|------------|
| | | |
| | | |