MARMARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Maltepe, İstanbul/Türkiye

İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE DENEY RAPORU

Rapor No : SA_2025-1_6

Rapor Tarihi : 17.01.2025

Müşteri İsmi : Apron İlaç Med İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti.

Müşteri Adresi : Kozyatağı Mah. Saniye Ermutlu Sok. By Otel No:3/1 Kadıköy/İstanbul

Konu : Nirexx Ürününe Ait İn Vitro Sitotoksisite Raporu

Bu sonuçlar sadece analiz edilen numuneler için geçerlidir.

Testi yürüten : Dr. Öğr. Üyesi Ceyda EKENTOK ATICI - Arş. Gör. Işınsu MUTLU

Onaylayan : Prof.Dr. Ali Demir SEZER

Bu raporun tamamı ya da herhangi bir parçası kopyalanamaz veya yayınlanamaz.

İmzasız raporlar geçerli değildir.

Bu rapor bir adet müşteriye verilmek üzere ve bir adet kuruluş arşivinde saklanmak üzere iki kopya halinde 6 sayfa olarak hazırlanmıştır.

İÇERİK

		Sayfa
1.	Başlık	3
2.	Ürün tedarikçisi	3
3.	Testin yapıldığı yer	3
4.	Kılavuzlar	3
5.	Ürün	3
6.	Çalışma tarihleri	4
7.	Sitotoksisite çalışması	4
7.1.	Materyal, çözelti, cihaz	4
7.2	Deneysel prosedür	5
8.	Sonuçlar	6

1. Başlık

Nirexx Ürünü İçin Yapılan In Vitro Sitotoksisite Çalışması

Bu raporun amacı, çalışmada elde edilen sonuçların bildirilmesi, çalışmanın nasıl yapıldığının ve verilerin nasıl toplandığının açıklanmasıdır.

2. Ürün tedarikçisi

Apron İlaç Med İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti.
Kozyatağı Mah. Saniye Ermutlu Sok. By Otel No:3/1 Kadıköy/İstanbul

3. Testin yapıldığı yer

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Maltepe, İstanbul/Türkiye

4. Kılavuzlar

Bu çalışma aşağıda belirtilen uluslararası kabul görmüş kılavuzlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir:

EN ISO 10993-5	"Tests of cytotoxicity: in vitro methods"
EN ISO 10993-12	"Sample preparation and reference materials"

5. Ürün

Ürün	**Nirexx**
Lot	-
Materyal	Bitki ekstreleri karışımı
Tarifi	Oral süspansiyon
Gönderilen örnek sayısı	2 adet
Üretici/Lisans sahibi	Apron İlaç Med İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti.
Saklama koşulları	Oda sıcaklığı

6. Çalışma tarihleri

Numune geliş tarihi: 30.12.2024
Çalışma başlangıç tarihi: 06.01.2025
Çalışma bitiş tarihi: 10.01.2025
Rapor tarihi: 17.01.2025

7. Sitotoksisite çalışması

Bu çalışmanın amacı, test edilen ürünün memeli hücrelerinde in vitro sitotoksisitesini belirlemektir. Hücre canlılığı, kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak belirlenmiştir.

Test prensibi, metabolik olarak aktif hücrelerin, çözünür boyayı [MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid)] mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile metabolik redüksiyona uğratarak çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır. Bu, oluşturulan hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunu belirlemeye olanak tanır. Canlı hücre sayısı, üretilen formazan miktarıyla orantılıdır.

Çalışma, EN-ISO10993-5:2009 standardının spesifikasyonlarına göre yapılmıştır.

7.1. Materyal, çözelti, cihaz

Materyal:

. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakaları
. T-25 hücre kültürü flaskları
. Steril pipet ve pipet uçları
. 1,5 ml santrifüj tüpleri

Cihaz:

. Laminar flow kabin
. CO_2 inkübatör
. İnvert mikroskop
. İnkübatör
. ELISA Reader

Çözelti ve reaktifler:

. Hücre hattı L929 (memeli fibroblast)
. Fetal bovin serum
. DMEM besiyeri
. Steril PBS (pH: 7,4) tamponu
. DMSO (dimetil sülfoksid)

. Absolu etanol
. Cell Proliferation Kit I (MTT kit) (Roche)

7.2. Deneysel prosedür

- L929 hücreleri %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO_2 de kültüre edilerek 96-kuyulu kültür kaplarına $5x10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı ve 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.

- Sonraki gün kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklendi ve kuyulara örnekler uygulandı.

- Çalışma grupları:
  . Ürün: son konsantrasyon %5 (h/h) olacak şekilde 100 µl besiyerine 5 µl örnek
  . Ürün: son konsantrasyon %10 (h/h) olacak şekilde 100 µl besiyerine 10 µl örnek
  . Kontrol: sadece hücre (L929)
  . Pozitif kontrol: %20 (h/h) DMSO
  . Negatif kontrol: PBS

Her grup n=6 olacak şekilde çalışıldı.

- 48 saat inkübasyondan sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak kuyular 100 µl PBS ile yıkandı ve her kuyuya 100 µl yeni besiyeri eklendi. Kuyulara 10 µl MTT çözeltisi eklenerek kristallerin oluşması için 4 saat inkübasyona bırakıldı.

- Her kuyuya 100 µl %10 SDS eklenerek karıştırıldı ve kristallerin çözünmesi için 37°C'de bekletildi.

- Daha sonra ELISA Reader'da 550 ve 690 nm'deki absorbanslar okunarak hesaplamalar yapıldı.

- Hesaplamalar yapılırken 550 ve 690 nm'de ölçülen absorbansların farkı alınarak elde edilen değer kontrol grubunun absorbansına kıyaslanarak aşağıdaki formülle % canlılık hesaplandı.

% canlılık= absorbans x 100 / kontrol grubu ortalama absorbans

8. Sonuçlar

- Çalışılan her iki konsantrasyonda da hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla %75'in üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

- Elde edilen verilere göre ürün sitotoksik değildir.