

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERUM İNFÜZYON SETLERİNDEN SIZAN KİMYASALLARIN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül ÖZLÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER

OCAK 2020

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERUM İNFÜZYON SETLERİNDEN SIZAN KİMYASALLARIN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül ÖZLÜ

(171083113)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER

OCAK 2020

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 171083113 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ayşegül ÖZLÜ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "SERUM İNFÜZYON SETLERİNDEN SIZAN KİMYASALLARIN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Mete YILMAZ**
Bursa Teknik Üniversitesi
Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ
Bursa Uludağ Üniversitesi

Savunma Tarihi : 09 Ocak 2020

FBE Müdürü : **Doç. Dr. Murat ERTAŞ**
Bursa Teknik Üniversitesi/...../.....

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşegül ÖZLÜ

İmzası :



Ayşe Beren Özlü'ye

ÖNSÖZ

Bilimsel bakış açısını ve vizyonunu ömür boyunca örnek alacağım, ders, deney ve tez sürecimde her türlü fikrime değer veren, çalışmalarımda kıymetli desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan, bilgi birikimini benimle paylaşan, gülyüzü ve pozitif bakış açısıyla bana destek olan sevgili Çiğdem İNCİ AYDEMİR'e,

Çalışma hayatı ile birlikte lisansüstü eğitim için birbirimizi yüreklendirdiğimiz, birlikte başladığımız bu süreci yakın zamanlarda yine birlikte tamamladığımız, çok değerli arkadaşım Bilgen ÇALIŞKAN'a,

Sağladıkları imkanlar ve verdikleri destek için Bursa Teknik Üniversitesi tüm idari ve akademik personele,

Lisansüstü eğitim için beni her zaman destekleyen, çalışma sürecimde her anlamda uygun koşulların oluşması için elinden geleni yapan değerli eşim Sezer ÖZLÜ'ye

Eğitim hayatımın en başından itibaren toplum için faydalı, bağımsız ve güçlü bir birey olmam için maddi ve manevi her türlü desteği sunan babam Osman KILICEL ve annem Fatma KILICEL'e,

Hayatımdaki ilk arkadaşım olan Serpil KILICEL, her şeyi en başından öğrenmeyi birlikte keşfettiğim sevgili kardeşim Sude KILICEL'e,

Sonsuz teşekkürlerimle,

Ocak 2020

Ayşegül ÖZLÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 İntravenöz Tedavi.....	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 İntravenöz tedavi uygulamaları	4
2.1.3 İntravenöz tedavi endikasyonları	4
2.1.4 İntravenöz girişimlere bağlı komplikasyonlar	6
2.2 İntravenöz Tedavide Kullanılan Tıbbi Malzemeler	7
2.2.1 Serum infüzyon setleri	7
2.2.2 Pompa cihazları	9
2.2.2.1 İntravenöz infüzyon pompaları.....	9
2.2.2.2 Enjektör pompası.....	9
2.2.3 Serum infüzyon setlerin değiştirilmesi	10
2.3 Ekstrakte Edilebilir ve Sızıntı Kimyasallar	12
2.3.1 Genel kavramlar	12
2.3.2 İnfüzyon setlerinde sızıntılar	14
2.4 Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	19
2.4.1 Nötral kırmızı alım (NKA) testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	20
2.4.2 MTT yöntemi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	20
2.4.3 Mikroçekirdek testi ile genotoksik etkinin belirlenmesi	21
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.2 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	25
3.3 Hazırlanan Çözeltiler	25
3.3.1 NKA ve MTT testinde kullanılan çözeltiler	25
3.3.2 Mikroçekirdek yönteminde kullanılan çözeltiler	26
3.4 Nötral Kırmızı Alım Yöntemi.....	26
3.5 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ..	28
3.6 Mikroçekirdek Yöntemi.....	29
3.7 İstatistiksel Analizler	32
4. BULGULAR.....	33
4.1 NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	33

4.2 MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	35
4.3 Mikroçekirdek Yöntemi ile Genotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	37
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ	59



KISALTMALAR

BPSA	:Biyoproses Sistem Birliği
bEND	:Fare beyin kapiller endotel hücresi
CDC	:Amerika Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezi
cEND	:Serebral kapiller endotel hücresi
CPR	:Kardiyopulmoner resüsitasyon
Cyt-B	:Sitokalsin-B
DBP:	:Di-n-bütil ftalat
DEP	:Dietil ftalat
DEHP	:Dietilheksilftalat
DEHT	:Dioktil teraftalat
DINCH	:Diizononil 1,2-siklo hegzan dikarboksilik asit
DiNP	:Diizononil ftalat
DMP	:Dimetil ftalat
DMSO	:Dimetilsülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	:Fetal Sığır Serumumu
GC-MS	:Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HeLa	:Henritta Lacks (rahim ağzı hücre hattı)
IARC	:Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ISO	:Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
IV	:İntravenöz
LDPE	:Düşük yoğunluklu polietilen
MÇ	:Mikroçekirdek
MEHP	:Mono (2-etil heksil) ftalat
MMC	:Mitomisin C
MTT	:3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür
NBİ	:Nükleer Bölünme İndeksi
NK	:Nötral Kırmızı
NKA	:Nötral Kırmızı Alım
PHA	:Fitohemaglutinin
PVC	:Polivinilklorür
PICC	:Periferik yolla yerleştirilen santral kateter
RPMI	:Roswell Park Memorial Institute
TOTM	:Trioktil trimellitat
TPN	:Total Parenteral Nutrisyon

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Örneklere ait tartım ağırlıkları (mg).....	23
Çizelge 4.1: NKA yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	35
Çizelge 4.2: MTT yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	37
Çizelge 4.3: Serum infüzyon setlerinin sızıntı kimyasalları ile muamele edilen insan lenfositlerindeki mikroçekirdek frekansları ve nükleer bölünme indeksi değerleri.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: a: Serum infüzyon seti b: Delici pin ve damla odası c: Roller klemp d1: Enjeksiyon portu d2:iğne adaptörü.....	7
Şekil 2.2: Farklı türlerde damla odaları: Sağdan sola pediatrik büret (60 damla/ml, hava aspirasyonu veya ekzojen sıvılar için erişim noktası içerir), basınç rezervuarlı uygulama seti (viskoz sıvıların uygulanmasında oldukça faydalıdır, 15 damla/ml) standart uygulama seti (15 damla/ml), piggyback set (60 damla/ml).....	8
Şekil 2.3: Ekstrakte edilebilir ve sızıntı kimyasallar arasındaki ilişki	13
Şekil 2.4: a) Kromozom fragmenti ya da bütün kromozomdan mikroçekirdek oluşumunun şematik diyagramı b) Mitojen stimule, sitokinezi blok bir mikroçekirdeğe sahip lenfosit hücresi.....	22
Şekil 3.1: Mikroçekirdek içeren insan lenfositlerinin mikroskop görüntüsü a) bir mikroçekirdek b) iki mikroçekirdek c) üç mikroçekirdek.....	32
Şekil 3.2: Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) çekirdekli lenfositlerin mikroskop görüntüsü.....	32
Şekil 4.1: NKA yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyasallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	36
Şekil 4.2: MTT yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyasallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	38
Şekil 4.3: Serum infüzyon setlerinin sızıntı kimyasalları ile muamele edilen insan lenfositlerindeki mikroçekirdek frekansları.....	40

SERUM İNFÜZYON SETLERİNDEN SIZAN KİMYASALLARIN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Medikal malzeme güvenliği biyomühendislik araştırmalarında önemli bir yere sahiptir. Özellikle tek kullanımlık medikal malzemelerle ilgili belirli standartlar olmasına rağmen malzeme biyouyumluluğu anlamında detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, klinikte oldukça önemli bir yere sahip olan serum infüzyon setlerinden sızan kimyasalların memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırmada farklı markalardan serum infüzyon setlerinin plastik hortum kısımlarından alınan eşit miktarlardaki numunelerden sızıntı kimyasalları içeren ortamlar hazırlanmış, bu ortamlarda kültüre edilen hücrelerdeki etkiler negatif ve pozitif kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Sızıntı kimyasalların elde edilmesi için çeşitli yayınlarda da belirtildiği üzere klinikte rutin set değişim süresi olan 72 saatlik periyot baz alınmıştır. Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla L929 fare fibroblast hücrelerinde nötral kırmızı alım (NKA) testi ve 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, genotoksitenin belirlenmesi amacıyla insan periferel kan lenfosit hücrelerinde sitokinezi blok tekniği ile mikroçekirdek testi yapılmıştır. Hücre canlılık oranları, mikroçekirdek frekansı ve nükleer bölünme indeksi değerlendirilerek farklı marka ürünlerden kaynaklanan sitotoksik ve genotoksik etkiler kıyaslanmıştır.

Deneylerden elde edilen sonuçlar setlerin hücre canlılığında azalmaya, mikroçekirdek frekanslarında ise genel olarak istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlara sebep olduğunu göstermiştir. Literatürde benzer nitelikteki çalışma sayısı son derece sınırlı olup, bu tez çalışmasında serum infüzyon seti kullanımının kısa süreli dönemdeki etkilerinin yanı sıra, tek kullanımlık medikal malzeme biyogüvenliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılabilecek örnek testler hakkında da bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: biyomalzeme, serum infüzyon seti, MTT, nötral kırmızı alım, mikroçekirdek testi

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF LEAKING CHEMICALS FROM SERUM INFUSION SETS

SUMMARY

Medical device safety plays an important role in bioengineering research. Although there are specific standards regarding disposable medical materials, detailed research is needed in terms of biomaterial biocompatibility. In this study, the effects of cytotoxic and genotoxic properties of chemicals leaking from serum infusion sets which have an important place in the clinic were investigated. In our study, media containing leakage chemicals were prepared from equal samples taken from the plastic line sections of different brands of serum infusion sets and the effects on the cultured cells were compared against negative and positive control groups. In order to obtain leaking chemicals, our study period was based on the 72 hour period, which is the routine set change time in the clinic as indicated in various publications. Neutral red uptake (NRU) test and 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test were performed in L929 mouse fibroblast cells for the determination of cytotoxicity and cytokinesis blocked micronucleus technique was performed in human peripheral blood lymphocyte cells for the determination of genotoxicity. Cytotoxic and genotoxic damage levels in different brand products were compared by evaluating cell viability rates, micronucleus frequency and nuclear division index values.

The results obtained from the experiments showed that sets caused a decrease in cell viability and statistically insignificant increases in micronucleus frequencies in general. In the literature, the number of similar studies is extremely limited and in this thesis in addition to the short-term effects of the use of the serum infusion sets, the information about the sample tests to determine the biosecurity of disposable medical materials is given.

Keywords: biomaterials, serum infusion set, MTT, neutral red uptake, micronucleus test

1. GİRİŞ

Tıbbi malzemelerin kullanımına bağılı olarak çeşitli kimyasalların hasta maruziyeti son dönemde tartışılan medikal konulardan birisi olmuştur. Özellikle invaziv işlemlerde doğrudan kanla temas eden ürünlerden, ürünün uygulandığı hastaya geçebilecek, vücut için yabancı ürünlerin oluşturabileceği sağlık tehditleri alanında yeterli düzeyde çalışma mevcut olmayıp, tıbbi malzemelerin biyouyumluluğu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sağlık hizmetlerinin sunumunda, tek kullanımlık malzeme tüketim kültürünün yaygınlaşması ile ticari plastik materyallerin en çok tüketildiği alanlardan biri de medikal malzeme alanı olmuştur. Ticari plastikler tüm alanlarda talebin yüksek olduğu ve yüklü miktarlarda üretilen plastiklerdir. Polietilen, polipropilen gibi polimerlerin yanı sıra en sık kullanılan polimerlerden biri de polivinilklorürdür. Polivinilklorür (PVC) düşük maliyeti, işleminin kolay olması ve pek çok uygulama alanı için uygun özelliklerinin olması nedeni ile oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Pek çok pazar araştırmasına göre tüm plastik medikal ürünlerin yaklaşık %25'inin PVC olduğu tahmin edilmektedir (Sastri, 2013).

Medikal malzeme alanında en sık kullanılan polimerlerden birisi olan PVC kullanımı öncesinde plastikleştirilmektedir. Plastikleştirilmeyen PVC daha sert ve katı bir yapıya sahiptir. Plastikleştirme işlemi için, dioktil ftalat, di-n-desil ftalat, dietil heksil ftalat gibi ftalat türevleri yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda ftalat türevlerinin toksik etkileri tartışılmaktadır (Hauser ve Calafat, 2005). Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda damar yolu ile kan, trombosit transfüzyonu veya total parenteral beslenme yapılan, mekanik ventilatöre bağlanan, diyalize giren hastalarda di-etilheksil ftalat (DEHP) düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Literatürde DEHP maruziyetinin üreme sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem, immünolojik ve lenforetiküler sistem, üriner sistem, nörolojik sistem üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Durmaz ve Özmert, 2010).

Ftalatların zararlı etkileri nedeni ile dünyada PVC olmayan materyallerin arayışına da girilmiştir. Sonuç itibari ile DEHP'siz plastikleştiriciler ve PVC'nin yerine farklı polimerlerin kullanımı olmak üzere iki farklı yaklaşım uygun bulunmuş ve DEHP'siz alternatifler için de toksikolojik testler açısından büyük veri boşluklarının olduğu belirtilmiştir (Van Vliet ve diğ, 2011).

Özellikle medikal alanda yoğun bir kullanımı olan PVC infüzyon hatlarından, enteral beslenme torbalarına, kanüllerden serum setlerine kadar pek çok medikal malzeme hammaddesi olarak pratikte kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ülke genelinde kullanımda olan ve hastanelerde oldukça yoğun şekilde kullanılan PVC hammaddeli farklı markalardaki serum infüzyon seti isimli malzemelerin sızıntı kimyasallarının olası sitotoksik ve genotoksik özelliklerinin araştırılması planlanmıştır.

Serum infüzyon seti, serum torbası ile hasta arasındaki bağlantıyı sağlayan bir tıbbi sarf malzemedir. Bir ucunda hastanın damar yoluna giren iğne, ortada bir hat, bu hatta bağlı bir damla odası ve delici pin kısımlarından oluşur. Bu tez çalışmasında farklı firmalara ait 13 farklı marka serum infüzyon setinin plastik hat kısımlarından alınan örneklerin sızıntı kimyasallarının sitotoksik ve genotoksik etkileri memeli hücrelerinde araştırılmıştır. Sitotoksik etkiler L929 fare fibroblast hücrelerinde nötral kırmızı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksisite testleri ile araştırılmıştır. Genotoksik etkiler ise insan periferik kan lenfosit hücrelerinde sitokinezi blok tekniği ile mikroçekirdek testi kullanılarak araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 İntravenöz Tedavi

İntravenöz (IV) girişim modern tıbbın temeli olan bir erişim yöntemidir. IV kanülasyon olarak da ifade edilen bu yöntem doktorlar, hemşireler, doktor asistanları, flebotomistler ve acil tıbbi teknisyenler dahil olmak üzere pek çok sağlık profesyoneli tarafından gerçekleştirilen bir prosedürdür. Acil serviste komplike olmayan periferik venöz erişim genellikle bir hemşire veya teknisyen tarafından güvenle uygulanır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, her yıl 25 milyondan fazla hastaya ilaç ve sıvı verilmesi ve kan testleri için periferik IV kateter takılmaktadır.

IV erişim genellikle 5 dakikadan daha az bir sürede gerçekleştirilebilir (Jones ve diğ, 1989; Lawrence ve Lauro, 1988). Ancak, oluşturulan spesifik IV ekipleri çok maliyetlidir ve her zaman maliyet etkin değildir (Meier ve diğ, 1988; Soifer ve diğ, 1998). Ayrıca, acil servis şartlarında birden fazla uygulayıcı tarafından uygulanması gereken IV girişimi, hem acil doktorlarının hem de hemşirelerin uzmanlaşmaları gerekli bir beceridir. IV girişimde teknikteki incelikler önemlidir ve pratikle geliştirilebilir. Ultrason gibi yeni teknolojiler, en zorlu durumlarda bile IV girişimi yapan kişilerin IV hatlarını doğru yerleştirmelerine yardımcı olmaktadır (Bonnie ve diğ, 2007).

2.1.1 Tarihçe

Kan alma veya kanama kavramları Hipokrat zamanlarından beri bilinmektedir. Antik dönemde kan alma tekniği, önkol damarlarını belirginleştirmek için kolun etrafına bir bandaj bağlamak, keskin bir bıçakla damarı açmak ve kanı bir kaba toplamaktan ibarettir. Orta çağlarda, kan alma işlemleri berber cerrahlar tarafından yapılmıştır. 1656'da, Sir Christopher Wren, intravenöz yolla kaz tüyüne bağlı bir hayvan mesanesi

ile yaptığı enjektör ile köpeklere afyon enjekte etmiş ve böylece modern IV terapinin mucidi olmuştur (Weinstein, 2006).

Kan transfüzyonu ise 1600'lü yılların ortalarına dayanmaktadır. Fransız doktor Jean Denis bir kuzudan aldığı kanı 15 yaşında bir erkek çocuğuna başarılı bir şekilde naklederek ilk kan transfüzyonunu gerçekleştirmiştir (Farr, 1980; McGrew ve McGrew, 1985). Başlangıçta, IV infüzyonlar için 16-18 gauge'lık çelik iğneler kullanılmıştır. 1950'li yıllarda çelik girişim iğnesinin etrafında reçine bir kateter bulunduran Rochester iğnesi piyasaya sürülmüştür. Hasta konforunu ve hareket kabiliyetini arttırması nedeniyle de günümüzde plastik kateterler metal iğnelerin yerini almıştır (Bonnie ve diğ, 2007; Weinstein, 2006).

2.1.2 İntravenöz tedavi uygulamaları

İlaç ve/veya sıvı uygulama yollarından biri olan intravenöz yol, oral yolla ilaç alamayan veya diğer yollarda absorpsiyonun mümkün olmadığı hastalarda kullanılır. Gastrointestinal yolla sıvı veya ilaç tolere edemeyen hastalar veya farklı herhangi bir yolla ilaç absorpsiyonunun olmadığı hastalarda önemli avantajlar sağlar. Gastrik aside dayanıksız ilaçlar veya intramusküler veya subkütan verildiğinde irritasyona neden olan ilaçların uygulanmasında önemli bir yoldur. Vasküler sisteme verilen bir ilacın biyoyararlanımı %100 kabul edilir çünkü gastrointestinal sistemi geçişe ihtiyaç kalmayıp doğrudan kan dolaşımına karışmıştır. Bu anlamda da ilaçların etkinliğini arttırdığı söylenebilir. Bununla birlikte ilacın uygulanma hızı dışarıdan kontrol edilebildiğinden uzun süre terapötik etkileri devam eden konsantrasyonlardan bahsedilebilir.

2.1.3 İntravenöz tedavi endikasyonları

Herhangi bir resüsitasyon (solunumu veya kan dolaşımı durmuş bir kişiye dışarıdan yapılan destekleyici müdahale) anında, zamanında ve yeterli vasküler erişim sağlanması oldukça önemli bir öncelik durumudur. Yeterli perfüzyonu olan hastalarda, enjeksiyonun hedefe ulaşması anlamında santral uygulama ile periferik uygulama arasında sadece saniyelik farklılıklar vardır (Barsan ve diğ, 1986). Ancak kardiyopulmoner resüsitasyon (CPR) durumlarında santral ilaç uygulamalarının

periferik uygulamalara göre dolaşıma çok daha hızlı katıldığı gösterilmiştir (Hedges ve diğ, 1984). İleri kardiyak destekleyici ilaçların merkezi uygulamalarının sonuca bir katkısı gösterilmemekle birlikte, CPR durumunda bile IV kanülasyon hızlı, kolay ve güvenli bir şekilde uygulanabildiği için tercih edilmektedir. Daha az kritik durumdaki hastalarda, IV tedavinin rolü tartışmalı olup, hastaların çok büyük bir kısmında gerekli olmadığı kanısı mevcuttur (Kuzma ve diğ, 2009).

Yaygın adıyla IV erişim/televi, intravenöz ilaç alması gereken veya oral tedavinin yetersiz olduğu (ciddi şok durumları), kontrendike olduğu (cerrahi acil müdahaleler) veya imkansız (ciddi kusma durumları) olduğu durumlarda gereklidir. İğnesiz ven valfleri (saline lock/heparin lock) de IV medikasyonun gerektiği durumlarda kullanılabilir ve ancak bu ürünler için öngörülebilir sıvı gereksinimleri sınırlıdır. Bu malzemeler tam bir IV sıvı ve uygulama ekipmanlarına göre daha uygun fiyatlı olup, özellikle aniden vasküler erişimin gerekli olduğu durumlarda oldukça yararlıdır (Gausche ve diğ, 1998; Schwarzman ve Rottman, 1987).

Periferik yolla yerleştirilen merkezi kateterler (PICC) hem merkezi hem de periferik kateterlerin özelliklerini paylaşmaktadır. PICC, kateter bağlantı kısmına sahip ince biyouyumlu bir tüpten oluşur. Özel bir ekip tarafından ultrason rehberliğinde perkütan olarak periferik vene yerleştirilir ve daha sonra büyük bir merkezi vene ilerletilir, ardından radyografik olarak yerleşimin teyidi sağlanır. PICC'ler uzun kan örnekleme, antibiyotik infüzyonu ve total parenteral beslenme gibi hiperosmolar çözeltiler ve bazı kemoterapötik ajanların infüzyonunda uzun süreli vasküler erişim için uygundur. Uzun süreli erişim gerektiğinde en kısa sürede bir PICC line yerleştirilmelidir. (Stovroff ve Teague, 1998).

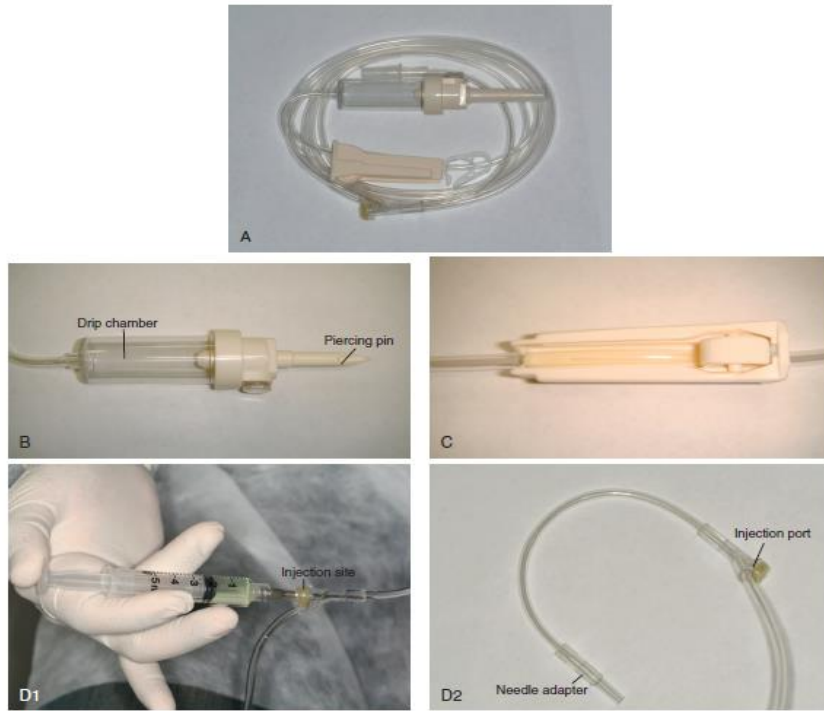
Periferik IV hatları, ekstrasvazyon veya suboptimal hacim akışı riski nedeniyle masif ödem, yanıklar, skleroz, flebit veya trombozlu ekstremitelere yerleştirilmemelidir. Periferik erişimin mümkün olmadığı veya acil durumlarda kullanılabilir olmakla birlikte, radikal mastektomilerde IV hatları aynı bölgeye yerleştirilmemelidir. Selülit alanları, şant veya fistül içeren ekstremiteler gibi enfekte bölgelerin kanülasyonundan kaçınılmalıdır çünkü bu durum bakteremi veya tromboza neden olabilir. Mümkünse herhangi bir ekstremitede kırık bölgesine yakın yerlerin üzerinde veya distalindeki bir venin kanülasyonundan kaçınılmalıdır. Travmadan veya majör vasküler bozulmadan

intranöral mikrovasküler hasara da bağlı olabilir (Selander ve diğ, 1977). Trombozis ve devamında pulmoner emboli santral kateterlerin yerleşimine bağlı olarak yaygın görülebilirler (Weinstein, 2006). Venöz hava embolisi de diğer önemli nadir görülen periferik katetere bağlı ciddi komplikasyonlardan birisidir. (Bonnie ve diğ, 2007).

2.2 İntravenöz Tedavide Kullanılan Tıbbi Malzemeler

2.2.1 Serum infüzyon setleri

İntravenöz infüzyonun hastaya verilmesinde serum torbası ve hasta arasında bir bağlantı sağlayan malzemelere serum infüzyon seti denir. Bir serum infüzyon seti delici pin, damla odası, roller klemp, line (hortum), enjeksiyon portu ve iğne adaptörü kısımlarından oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 a: Serum infüzyon seti b: Delici pin ve damla odası c: Roller klemp d1: Enjeksiyon portu d2: iğne adaptörü.

IV setin kısımlarından biri olan delici pin (spike) serum torbasına geçirilir. Bu kısım sert bir plastikten üretilmekte olup, serum torbasına takılana kadar steril tutulmalıdır. Delici pinin hemen altında damla odası bulunmaktadır. Damla odası, esnek, geniş, şeffaf, plastik bir yapıda olup, torbadan gelen sıvının damladığı kısımdır. Bu bölümün iki fonksiyonu vardır; IV hatta hava gitmesini engellemek ve solüsyonun akış hızının

düzenlenmesini sağlamak. IV hatta hava gitmesini engellemek için damla odası hemen hemen yarısına kadar doldurulmalıdır. Damla odası tam doldurulmamışsa hava kabarcıkları damar yoluna sürüklenir. Aşırı doldurulması durumunda da IV sıvının akış hızı takip edilemeyebilir.

Standart bir yetişkin serum infüzyon setinde genellikle 15 veya 20 damla 1 ml'ye eşittir ve bu bilgi malzeme ambalajlarında yer alır. Bu bilgiden hareketle damar yoluna verilecek sıvıların gidiş hızları hesaplanmaktadır. Serum setlerinde kullanım amacına göre farklı türlerde damla odaları olabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Farklı türlerde damla odaları: Sağdan sola pediatrik büret (60 damla/ml, hava aspirasyonu veya ekzojen sıvılar için erişim noktası içerir), basınç rezervuarlı uygulama seti (viskoz sıvıların uygulanmasında oldukça faydalıdır, 15 damla/ml) standart uygulama seti (15 damla/ml), piggyback set (60 damla/ml)

Damla odasından IV iğneye kadar farklı uzunluklarda olabilen plastik ince hortum uzanmaktadır. Bu hattın üzerinde farklı fonksiyona sahip kısımlar bulunur;

- Roller klemp (hız ayarlayıcı)
- Enjeksiyon portu
- Kauçuk puar (tüm setlerde bulunmayabilir)
- Enjektör veya iğne adaptörü

İnfüzyon hızını ayarlamak için kullanılan klemp sıvı akış hızını düzenler. Yuvarlak yapıdaki kontrol mekanizması döndürülerek IV hatta basınç uygulanır veya basınç ortadan kaldırılır. Böylelikle mekanik bir şekilde IV sıvının akışı ayarlanır.

Enjeksiyon portu genellikle IV hattından dışarı doğru çıkan sert bir plastiğin içine yerleştirilmiş kauçuk bir diyaframdır. Serum infüzyonunun yanı sıra dışarıdan bir ilaç verilmek istendiğinde ilacı içeren enjektör bu porta yerleştirilir ve ilaç infüzyona dahil edilmiş olunur. Potansiyel iğne yaralanmaları riski nedeniyle infüzyon setlerinde enjektörün porta luer lock bir adaptörle bağlandığı “iğnesiz sistemler” geliştirilmiştir (Boccaccio ve Boccaccio, 2019).

Venöz kateterler de IV tedavide yaygın şekilde kullanılan medikal malzemelerdendir ve kullanılacağı amaca göre değişik kalınlık ve uzunlukta üretilirler. Periferik yerleştirilen kateterler 2 F kadar ince, diyaliz amacıyla kullanılan kateterler ise 15 F'e kadar kalın olabilmektedir. Yine kullanım amacına göre bir veya birden fazla lümenine sahip olabilirler. Kateterler kimyasal olarak inert, trombus oluşturmeyen, esnek ve radyopak materyalden yapılmış olmalıdır. Sert kateterlerin yerleştirilmesi kolay ve ucuzdur ancak damar duvarına hasar vererek trombozu hızlandırır. Bu nedenle uzun dönemli kateterizasyon için uygun değildirler. Yumuşak kateterler kan akımıyla venin daha orta kesiminde yer aldığı için bu tür sorunlara daha az neden olurlar. Ancak bunlarda yumuşak olmalarından dolayı yerleştirilmeleri zordur ve pahalıdır. Bu nedenle uzun dönemli kateterizasyonda tercih edilmelidirler (Tercan, 2006).

2.2.2 Pompa cihazları

2.2.2.1 İntravenöz infüzyon pompaları

İntravenöz (IV) infüzyon pompaları, tüm hastalara perioperatif ve yoğun bakım ortamlarında ilaç ve sıvı vermek için kullanılır. Verilecek sıvının hacmine göre infüzyon pompası veya enjektör pompası kullanılmaktadır. Cihazla belirlenen sürede ve belirlenen akış hızında otomatik ilaç/sıvı gönderimi sağlanan bu sistemlerde hastaya verilen ilaçların belirli bir terapötik pencerede kalması sağlanmaktadır.

2.2.2.2 Enjektör pompası

Enjektör pompaları infüzyon pompaları ile benzer mekanizmalarda çalışan, daha küçük hacimlerdeki ilaç/sıvıları vermek için kullanılan cihazlardır. Bu cihazlarda

gönderim doğruluğunu belirleyen en önemli kriter enjektörün tanınmasıdır. Çoğu cihazın kendine spesifik enjektörü varken, yazılımsal olarak enjektör üreticisi girildiğinde enjektörü otomatik olarak tanıyan cihazlar da vardır (Paulsen ve Ruskin, 2019).

2.2.3 Serum infüzyon setlerin değiştirilmesi

IV setlerin değiştirilme sıklığı tartışmalı bir konudur. Yapılan çalışmalar detaylı incelendiğinde elde edilen teorik verilerin kliniğe uygulanmasında daha fazla soru ortaya çıkmaktadır. Soruların büyük kısmı aralıklı infüzyon için kullanılan setlere odaklanmaktadır. Aralık 2006'da, Lynn Hadaway Associates, Inc., (Milner, Georgia) aralıklı setlerin nasıl kullanıldığı ve kullanımlar arasında nasıl yönetildiğiyle ilgili çevrimiçi bir hemşire anketi yapmıştır. Bu çalışmadan elde edilen cevaplar bu konuda daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu ve bu uygulama setlerini yönetmek için kullanılan yöntemlere daha fazla dikkat edildiğini ortaya koymuştur (Hadaway, 2007).

ABD'de 1971 yılında meydana gelen epidemik intrinsik sıvı kontaminasyonu ABD Hastalık Kontrol Merkezinin (CDC) tüm setlerin 24 saatte bir rutin olarak değiştirilmesini tavsiye etmesine neden olmuştur. Bundan sonraki 30 yılda uygulama setlerinin kalış sürelerinin daha uzun olduğu pek çok çalışmada, süre artışı ile kan dolaşımına bağlı enfeksiyon risklerinin artmadığı ortaya konmuştur. Bir setin kalma süresi 72 saate kadar uzatılırken optimal değişim sıklığı 96 saat olarak belirlenmiş, bazı kaynaklar da bir setin 7 güne kadar kalabileceğini ifade etmiştir (Raad ve diğ, 2001; Rickard ve diğ, 2004; Simon ve diğ, 2006). 2002 yılında CDC'nin "İntravasküler Cihazlara Bağlı Enfeksiyonları Önleme Rehberi"nde kateterle ilgili enfeksiyondan şüphelenilmediği veya belgelenmediği sürece, ikincil setlerin ve ilave cihazları içeren uygulama setlerinin en fazla 72 saatlik aralıklarla değiştirilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Bu ifade en yüksek Kategori 1A derecesine sahip veya uygulama için şiddetle tavsiye edilmiş olan uygulama şeklini tanımlamaktadır (O'Grady ve diğ, 2002). Bu ifade ayrıca sağlık tesislerinin bu setlerin kullanımı için uygunluğunu seçmesine olanak tanır. Bu rehberin yazarları, uygulama setlerinin gerçekte kullanılma biçimlerinin çeşitliliğini ayırt etmek için herhangi bir girişimde bulunmamıştır. Yayınlanan araştırmalarda, sürekli infüzyonla verilen sıvılar için bir

katetere bağlı olan uygulama setleri incelenmiştir. Maki ve diğ. (1987) enjektörler veya küçük hacimli infüzyonlar halinde primer bir sete bağlı olarak ve tüm setlerin birbiri ile bağlantılı olduğu geri besleme metoduyla dilüe edilerek verilen IV medikasyonları tanımlamışlardır. Bu çalışmada infüzyonun amacı, taşıyıcılar, solüsyonlar ve tüm taşıyıcılara ilave edilen katkı maddeleri, uygulama setlerine enjekte edilen ilaçlar ve sürekli kullanımda kalan setin kalma süresi gibi veriler toplanmıştır (Maki ve diğ, 1987). Raad ve diğ. (2001) ise üniversite bünyesinde bulunan bir kanser merkezinde randomize bir çalışma yürütmüşlerdir. Toplanan veriler Maki ve diğ. (1987) tarafından yapılan çalışma ile oldukça benzer bulunmuştur. Raad çalışmasında uygulanan ilaçlar hakkında detay vermemiş olup, infüzyon çeşitlerini antibiyotikler, antikoagülanlar, kemoterapi ilaçları ve total parenteral nütrisyon (TPN) olarak sınıflandırmıştır (Raad ve diğ, 2001).

Bu ve benzeri pek çok çalışma, onkoloji ve yoğun bakım hastalarını içermekte olup, bu grupların enfeksiyon riski açısından yüksek risk grubunda bulunduğu vurgulanmaktadır. Yapılan alışmalarda TPN, lipidler ve lipid bazlı ilaçları içermekte olup, santral ve periferik katetere dair veriler içermektedir. Bu çalışmalarda gözden kaçırılan bir nokta uygulama setlerinin aralıklı bir kullanım zeminine dayandırılmasıdır. İnfüzyon Hemşireleri Topluluğunun (The Infusion Nursing Society's) Uygulama Standartları'nda aralıklı IV tedavi, "infüzyonun durdurulduğu periyotlarda uygulanan reçeteli girişimler" olarak tanımlanmaktadır (Infusion Nurses Society, 2006). İnfüzyon hemşireleri yıllar boyunca, infüzyon tedavisi alan hasta konforunu arttırmak için, setlere, sıvı taşıyıcılarına ve pompa setlerine bağlı kalmaksızın serbest bir şekilde hareket etme yeteneğini sağlamak için pek çok girişimde bulunmuşlardır. Sonuç olarak aralıklı IV tedavisi giderek yaygınlaşmıştır. İlave olarak infüzyon tedavisinin özellikle yoğun bakım şartlarında daha yaygın uygulanan şekli sürekli infüzyondansa aralıklı infüzyon olarak uygulanması yaygınlaşmaktadır. İnfüzyon Hemşireleri Topluluğunun Uygulama Standartlarında sürekli infüzyonda ve aralıklı infüzyonda kullanılan uygulama setleri arasındaki belirgin farklılıkların altı çizilmektedir. Standartların 2006 yılındaki versiyonunda, primer ve sekonder sürekli uygulama setleri için kullanılan tanımlar değiştirilmiş ve CDC rehberlerinde "72 saatten daha sık değiştirilmeyen ve şüpheli kontaminasyonlarda veya sistem bütünlüğünün şüpheli hale gelmesi halinde

değiştirilen setler” şeklinde tanımlanmıştır. Bu standartlar çalışmalarla da iyi bir şekilde desteklenmektedir (Hadaway, 2007).

2.3 Ekstrakte Edilebilir ve Sızıntı Kimyasallar

2.3.1 Genel kavramlar

Tıbbi malzemelerin kullanımına bağlı çeşitli kimyasalların hasta maruziyeti son dönemde tartışılan medikal alanlardan birisi olmuştur. Özellikle invaziv işlemlerde doğrudan kanla temas eden ürünlerden, ürünün uygulandığı hastaya geçebilecek, vücut için yabancı ürünlerin oluşturabileceği sağlık tehditleri alanında yeterli düzeyde çalışma mevcut olmayıp, tıbbi malzemelerin biyoyumluluğu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

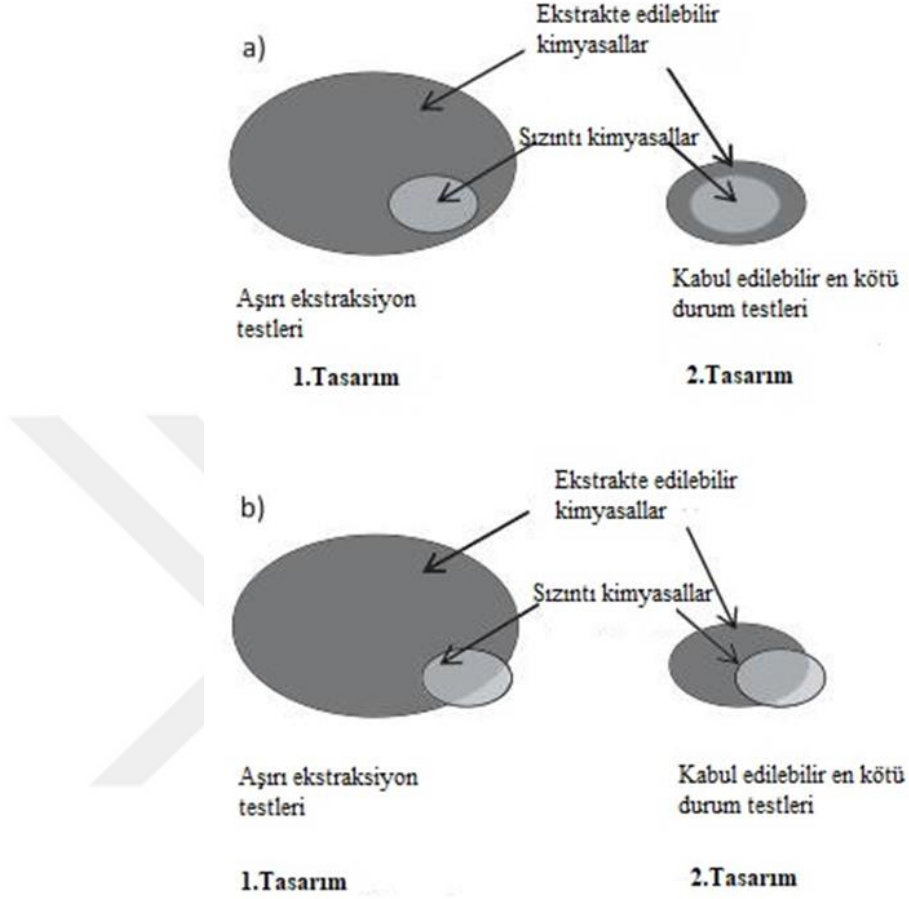
Tıbbi malzemelerin kullanımı kaynaklı maruziyetlerden sıklıkla karşımıza çıkan araştırma alanı ekstrakte edilebilir ve sızıntı kimyasalların (extractables and leachables) konu edildiği çalışmalardır. Özellikle ilaç ambalajlarından ilaç ürününe geçen kimyasalların araştırılması endüstri için bir çeşit zorunluluktur. The BioProcess Systems Alliance-Biyoproses Sistem Birliği (BPSA) ekstrakte edilebilir kimyasalları “Uygun bir çözücü ile temas halinde iken abartılı zaman ve sıcaklık koşullarında elastomerik, plastik, cam, paslanmaz çelik veya kaplama materyalleri gibi herhangi ürüne temas eden maddelerden sızan/geçen kimyasal yapılar” olarak tanımlamaktadır.

Ekstraktlar bir materyalin bir ilaca ya da işlem akışkanına sızıntı kimyasal salımı potansiyelini gösterebilir. BPSA sızıntı kimyasalları “Ekstrakte edilebilir kimyasalların bir alt türü olan, normal proses şartlarında veya hızlandırılmış depolama şartlarında ilaç formülasyonu ile doğrudan temasın bir sonucu olarak elastomerik, plastik, cam, paslanmaz çelik veya kaplama bileşenleri dahil ürünle temas eden herhangi bir materyalden ilaç formülasyonuna göç eden ve son ilaç ürününde bulunan kimyasallar” olarak tanımlamaktadır (BPSA, 2007).

Burada düşünülmesi gereken iki anahtar yaklaşım bulunmaktadır;

1. Ekstrakte edilebilir kimyasallar model bir solvan kullanılarak test edilirken, sızıntılar gerçek ilaç ürününde veya proses akışkanında çalışılırlar.
2. Ekstrakte edilebilir kimyasallar aşırı ve agresif şartlarda elde edilirken, sızıntılar için yapılan testler normal şartlar altında gerçekleştirilirler.

Ekstrakte edilebilir ve sızıntı kimyasallar arasındaki ilişki iyi anlaşılmalıdır. Genel manada sızıntı kimyasallar ekstrakte edilebilirlerin bir alt kümesi olup Şekil 2.3’de görülebilir.



Şekil 2.3: Ekstrakte edilebilir ve sızıntı kimyasallar arasındaki ilişki (Ding,2013)

Bazı durumlarda proses akışkanı ya da ilaç ürünün proses ekipmanı ile etkileşimine bağlı olarak bazı sızıntı maddeler ekstrakte edilebilirlerin bir alt kümesi olmayabilir. (Şekil 2.3.b). Agresif çözücüler veya çok yüksek sıcaklıklar gibi aşırı şartlar mevcutsa, birinci tasarımda olduğu gibi yüksek miktarda ekstrakte madde elde edilebilir. Ekstrakte edilebilir maddelerin denge durumları pek çok bu türden maddenin sızıntılarıyla ilişkisi olmayabileceğini göstermektedir. Birbiri ile ilişkili olmayan bu maddelerin bütün kimyasal ve fiziksel analizleri oldukça zaman kaybedici olup, spesifik prosesler için gerekli olmayabilir. Tasarım 2’de ise kabul edilebilir en kötü test şartları kullanılmış ve ekstrakte edilebilir kimyasal sonuçları prosesle daha alakalı bulunmuştur. Bu nedenle temel amaç, eğer bilimsel doğrulama yapılacaksa sızıntıların da göstermek için kullanılacak uyumlu ve ekstrakte edilebilir kimyasal madde

verisi elde etmek olmalıdır. En uygun veriyi elde etmek için de proses ekipmanlarının destekleyicilerinden başlanmalıdır.

BPSA destekleyicilerin tek kullanımlık ürünler üzerinde yoğun çalışmalar yapılması ve kullanıcılar için uygun veri sunabilmesi nedeniyle bu yöntemi tavsiye etmektedir. Proses için veri uygun veya kullanılabilir değilse ürüne spesifik bir yöntemin çalışılması gerekmektedir. Ekstrakte edilebilir madde verisi düzgün şekilde çalışılırsa, sızıntı testlerinin çalışılması sadece bilimsel doğrulama için gereklidir. Bazı durumlarda da, sızıntı kimyasallar ekstrakte edilebilirlerin bir alt kümesi olmayıp ayrıca çalışılmaları gerekebilir (Ding, 2013).

2.3.2 İnfüzyon setlerinde sızıntılar

İnfüzyon setleri, kateterler, kan torbaları gibi tek kullanımlık tıbbi sarf malzemeler klinik pratikte yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Çoğu sağlık hizmeti sunucusuna göre güvenli olarak kabul edilmekle birlikte tıbbi sarf malzemeler klinik kullanımları sırasında toksik materyaller salabilirler (Jenke ve diğ., 2006; Paskiet ve diğ., 2013). Özellikle pek çok infüzyon seti ve farklı tıbbi sarf malzemelerin bileşenlerinden biri olan doğal kauçuk lateks, lokal enflamasyon, alerjik reaksiyonlar, sistemik toksisite ve enfeksiyon riskinde artış gibi pek çok etkiyle toksisitenin şiddetini arttırabilir (Cormio ve diğ., 1993; Dakwar ve diğ., 2012).

Ftalat plastikleştiriciler (di-(2-etilheksil) ftalat (DEHP); di-(etilheksil)-tereftalat, (DEHT); trioktil trimellitat (TOTM) gibi) tıbbi sarf malzemedeki PVC kısımlardan sızarak lokal ve sistemik toksisiteyi doz bağımlı bir şekilde indükleyebilirler (Bernard ve diğ., 2015; Feigal, 2002). Bununla birlikte, infüzyon setlerindeki sızıntıların analitik araştırmaları DEHP varlığında potansiyel diğer toksik sızıntılar (bütil hidroksitoluen gibi) ve partiküllerle birlikte araştırılmıştır. Dakwar ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada, infüzyon setlerinin her bir kısmının toksik sızıntılar salgıladığını tespit etmiş ve infüzyon seti sızıntılarının in vitro güvenlik değerlendirmeleri için yeni bir metod geliştirmişlerdir. Bunun yanı sıra infüzyon setlerinden sızan kalıntıların in vitro deneysel mekanizmalarını çalışarak, infüzyon setlerinin lateks hammaddeli kısımlarının hücre ölümüne onkosis mekanizması ile neden olduklarını göstermişlerdir (Kozlovskaya ve Stepensky, 2015). İnfüzyon setlerinin diğer kısımlarından gelen sızıntılar daha az toksik olup, bazı biyokimyasal değişiklikler

yapmakla birlikte sitotoksisite açısından anlamlı bulunmamıştır. Bir önceki çalışmada her bir infüzyon set örneğinin toksisite analizine odaklanılmıştır. Bununla birlikte farklı üreticiler tarafından üretilen setlerin tasarım ve bileşimlerinde belirgin farklılıklar bulunmuştur (Kozlovskaya ve diğ, 2015).

Bernard ve diğ. (2015), infüzyon ve yapay beslenme ürünlerinde kullanılan PVC'deki farklı plastikleştiricilerin sızma özelliklerini belirlemek ve 2010 yılında tıbbi malzemelerde kullanımı yasaklanan DEHP ile kıyaslamak için bir araştırma yapmışlardır. PVC medikal cihazlar alanında infüzyon setleri, hemodiyaliz bağlantı hortumları veya ekstrakorporeal dolaşım tüpleri gibi esnek tüp/hortumların üretiminde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. PVC matriksine esneklik kazandırmak ve sürdürmek için ilave edilen plastikleştiriciler PVC zincirleri arasındaki bağlayıcı kuvvetleri güçlendirerek matriksin serbest hacmini arttırmaktadır (Bernard ve diğ, 2014). Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde tıbbi cihazlarda sıklıkla kullanılan di-(2-etilhekzil)-ftalat (DEHP) gibi bazı PVC plastikleştiriciler için toksikolojik etkileri hakkında yeni endişeler ortaya çıkmıştır (Calò ve diğ, 2011). DEHP toksisitesi (aslında tüm ftalatların toksisitesi) hakkında ortaya çıkan bu endişeler bu bileşiklerin reprotoksik madde 1B'de sınıflandırılmalarına neden olmuştur (European Union, 2008). Bu bulguların ışığında DEHP'in ilaçlar, biyolojik sıvılar veya insan vücudundan alınan veya giren maddelerin uygulanması veya uzaklaştırılması için kullanımı kısıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, yakın zamanda Fransız Hukuku DEHP'in pediatrik, neonatal ve maternal yoğun bakım ünitelerinde kullanımını 1 Temmuz 2015 tarihinden itibaren yasaklamıştır. PVC, eğer mümkünse poliüretan, silikon veya polietilen gibi diğer maddelerle yer değiştirmelidir. Örneğin, PVC serum torbaları PVC'siz çok katmanlı torbalarla değiştirilmiştir. Buna rağmen her zaman bu durum geçerli olmamaktadır. Enteral veya parenteral nütrisyon tüpleri, hemodiyaliz bağlantı hortumları, infüzörler gibi belirli tek kullanımlık malzemelerde materyali değiştirmekle fayda elde edilememektedir. Çünkü esneklik, elastikiyet, fiziksel ve kimyasal stabilite (sterilizasyon şartlarına dayanıklılık gibi), biyogeçimlilik ve düşük maliyet (sağlık uygulamalarında yaygın şekilde kullanılırlar ve oldukça uygun fiyatlı olmalıdırlar) gibi faktörlerin tamamı karşılanamamaktadır. Kurallar, üreticileri DEHP yerine alternatif plastikleştirici (di-(etilheksil)-tereftalar (DEHT), di-izo nonil 1,2 sikloheksan-dikarboksilat (DINCH), trioktil trimellitit (TOTM) gibi) arayışına

yönlendirmiştir. Bu moleküller, çeşitli kimyasal sınıflara ait olmanın yanı sıra her biri spesifik plastikleştirici etki kazandıran farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptirler. Bu spesifik özellikleri sağlamak için pek çok medikal cihazda çeşitli oranlarda kullanılmaktadırlar. Bazı özellikleri tıbbi cihazdan ilaç çözeltisi veya biyolojik sıvılara geçmesine katkıda bulunmakla birlikte, istenmeyen hasta maruziyetine de neden olabilir.

Alternatif plastikleştiricilerdeki mevcut fizikokimyasal veriler bu maddelerin daha az dallanmaları ve/veya düşük su çözünürlüklerinden gelen daha iyi sterik engel ve yüksek molekül ağırlığı nedeniyle PVC'den gelen sızıntının daha az olduğunu öne sürmektedir (Wilkes ve diğ, 2005). Bununla birlikte, polarite, volalite ve partiyon katsayısı her bir plastikleştiricinin özellikle yağlı bir ortamda sızma oranını belirlemede oldukça yüksek öneme sahiptir. Alternatif plastikleştiricilerin PVC'den sızıntıları hakkında klasik yolla plastikleştirilmiş PVC'den sızmaya göre oldukça az veri bulunmaktadır. Bununla birlikte, tıbbi malzemelerin kullanımı sırasında plastikleştiriciye bağlı risklerin değerlendirilmesi için klinik benzeri koşullarda plastikleştiricilerin davranışlarının bilinmesi önemlidir. Bu yaklaşım, plastik ambalajlardaki ilave katkı maddelerinin gıdalara sızma riskinin olduğu gıda alanında geliştirilmiş olup, değerlendirme açısından ilgili düzenleyici kuruluşların araştırma konusudur (European Union, 2011). İlave katkı maddelerinin bir listesinde kabul edilebilir eşik değerlerinin (global ve spesifik sızıntı limitleri) belirtilmesi ve üreticiler için sızma testlerine dair öneriler bulunmaktadır. Bu transfer değerlendirme metodu gerçek ortam şartlarının simülasyonuna dayanmakta olup EU 10/2011 kurallarında tanımlanan modeller kullanılır. Yine de tıbbi cihazlar için bu şekilde bir model bulunmamakta olup, risk değerlendirmesinin ilk adımı daha zordur.

Bernard ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada farklı plastikleştiricilerin ilaç çözeltileri veya biyolojik sıvılarla temas halinde sızma performansını in vitro şartlarda değerlendirmişlerdir. Yöntem olarak gaz kromatografisini kullanan çalışma ekibi infüzyon ve yapay beslenme ürünlerinde kullanılan PVC'deki farklı plastikleştiricilerin sızma özelliklerini belirlemiş ve 2010 yılında tıbbi malzemelerde kullanımı yasaklanan DEHP' le kıyaslamışlardır. Bu çalışmadan elde edilen en önemli bilgilerden birisi de PVC hammaddeli ürünlerden sızan temel kimyasalın plastikleştiriciler olduğudur. Sonuçlar aynı zamanda temas halinde benzer koşullar

altında plastikleştiricilerin farklı sızma davranışları gösterdiğini net bir şekilde ortaya koymuştur. DEHP, zamanla değişen bir şekilde en fazla sızan plastikleştirici olmuştur. Maruziyetten 24 saat sonra başlangıçta mevcut olan DEHP miktarının 1/8'i plastik matriksten ayrılmış olup, bu sızıntı maruziyet süresi arttıkça artmıştır. Diğer plastikleştiricilerin sızma oranı belirgin şekilde farklılaşmıştır. TOTM en düşük sızıntı özelliği ile DEHP'e en uygun alternatif gibi görünmektedir. TOTM'in başlangıç miktarının sadece %0,2'si medikal malzemedan ortama sızmıştır. Sızıntı da zamanla devam etmemiştir. Hortum kısmında TOTM miktarı (%36), DEHP ve diğer plastikleştiricilere göre plastikleştirme özelliğinin daha az olması nedeniyle daha yüksektir (Wilkes ve diğ, 2005).

DEHT de DEHP'le karşılaştırıldığında ilginç sızma davranışlarına sahiptir. DEHT'nin tıbbi malzemedan sızan miktarı izomerine göre üç kat daha az miktardadır. Wirnitzer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DEHT'nin yağlı ilaç çözeltilerine sızma özelliklerini ortaya koymuşlardır (Wirnitzer ve diğ, 2011). Bununla birlikte DEHP veya diğer plastikleştiricileri aynı şartlarda kıyaslayan bir çalışma yoktur. DINCH ile ilgili olarak ise, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar simulanla maruziyetin 24 saatlik süresi boyunca DEHP ile benzer bir sızma profili göstermiştir. Her iki plastikleştiriciden sızan miktar yüksek olup, başlangıç miktarının 1/8'i kadardır. Bununla beraber, PVC matriksten DINCH salımı zamanla daha kalıcı görünmektedir. Aslında Welle ve diğ. (2005) PVC hammaddeli enteral beslenme tüpleri ile yaptıkları çalışmada DINCH diffüzyonu DEHP'e göre daha düşük bulunmuş olup, bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla örtüşmemektedir. Bunun nedeninin de her iki çalışmada kullanılan modellerdeki farklılıklar ve sonuçların nasıl verildiği (başlangıç miktarı ve salınan miktar) ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Plastikleştirici sızma özelliklerinde görülen farklılıklar, maddelerin fizikokimyasal özellikleri arasındaki farklılıklar ile açıklanabilir. Polarite ve çözünürlük bir plastikleştiricinin sızma oranını belirlemede oldukça yüksek öneme sahiptir. Genel olarak DEHP'e alternatif plastikleştiriciler yeterli polarite özelliklerine bağlı olarak güçlü PVC çözücü niteliğe sahiptirler. Fakat sızıntılarda çözünürlük PVC-plastikleştirici ve simulan arasındaki etkileşime bağlı olarak oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum, DINCH'in Kastner ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada sulu simulana neden en az geçme potansiyeli olduğunu açıklamaktadır.

Bununla birlikte, yüksek molekül ağırlığı, daha az dallanma, daha iyi sterik engel polimer matriksin stabilitesine katkıda bulunmaktadır (Wilkes ve diğ, 2005). Bunlar da trimellitit plastikleştiricilerin temel karakteristiklerindedir. Her üç alkil zinciri ve ester grupları daha yüksek molekül ağırlığına katkıda bulunmakta, yeterli polarite PVC ile geçimliliğini sağlamakta ve PVC matriksin performansını iyileştirmektedir (Bernard ve diğ, 2014). Bununla beraber partiyon katsayısı gibi diğer faktörler de plastikleştiricilerin sızmasını etkileyebilir. Örneğin DINCH'in yüksek miktarlarda salımının açıklaması muhtemelen belirgin derecedeki nonpolar bölgelere sahip olması ve dallı yapısının yüksek partiyon katsayısına neden olmasıdır. Bu özellikler bir plastikleştiricinin tıbbi malzeme üretiminde önemli bir konu olan plastikleştirme özelliklerini de etkilemektedir. PVC matriksinden tıbbi malzemeye plastikleştirici sızıntısı tıbbi malzemenin esnekliğini dolayısıyla etkinliğini etkileyerek suboptimal kullanıma neden olabilir. Bu çalışmada gıda ambalajlama gelişimindeki yaklaşımlar temel alınmış olup, Jenke ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada belirttikleri gibi gıdalarda veya gıda simulanlarında spesifik olarak biriken ekstrakte edilebilir kimyasalların miktarını yansıtan veriler farmasötik uygulamalar ile doğrudan ilgili olmayabilir. Fakat yapay beslenme ve infüzyon durumlarını bu iki medikal durumdan adapte edilen parametreler ve şartlarla simüle etmek faydalı olacaktır. Bu şartların bazıları infüzyon setleri gibi bazı tıbbi malzemelerin kullanıldığı tüm klinik durumları temsil edebilen sızma modellerinin geliştirilmesi için optimize edilmelidir. Bu türden bir klinik sızıntı modeli oluşturulurken, maruziyetin klinik şartları (ilaç çözeltisi ve infüzyon setinin temasta olduğu süre, tıbbi malzemenin ilaç çözeltisi ile etkileşimde olduğu yüzey alanı, çözelti özellikleri gibi) ve tahmin edilebilir maruziyet şartları gibi pek çok parametre göz önüne alınmalıdır. Örnek olarak DEHP'in PVC tüplerden sızdığı ve inkübasyon sıcaklığı ile bu durumun arttığı yapılan çalışmalarda açıkça ortaya konulmuştur (Bourdeaux ve diğ, 2004; Loff ve diğ, 2002; Rose ve diğ, 2012). Bu çalışmalar her plastikleştiricinin salınan miktarlarının hastaların infüzyon prosedürleri boyunca maruz kaldıkları dozlara karşılık gelip gelmeyeceğini ve toksik düzeye erişmeden tolere edilebilir sınır dozlara erişmeyi amaçlamaktadır. Bu türden bir model oluşturmak için temas halinde olan plastikleştirilmiş PVC yüzeyi/simulan hacmi oranı iyi belirlenmeli ve Gıda Ambalajlama Regülasyonunda olduğu gibi klinik teorik varsayımlara dayalı olmalıdır. Bahsedilen çalışmada sonuç itibarıyla ekstrakte plastikleştiricilerin güvenlik etkileri, plastikleştiricinin kimliği, konsantrasyonu ve

maddeye özgü spesifik toksikolojik veri ile sonuç dozaj bilgisi verileri doğrulanarak tahmin edilebilmektedir (Jenke, 2007). Alternatif plastikleştiriciler açısından da tıbbi malzeme alanında toksisite verisi eksiktir. Plastikleştiricilere beslenme veya çevresel kaynaklı maruziyetle ilişkili toksik riski hayvan modellerinde değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Scenihr, 2014).

İnfüzyon ve yapay nütrisyon alanında kullanılan tıbbi malzemelerde oldukça yaygın şekilde kullanılan DEHP'e alternatif olarak, TOTM ve daha az miktarda DEHT, DEHP'e göre daha düşük sızma özellikleri gösterdiğinden hastalar için daha az maruziyet riski oluşturmaktadır. Bu çalışmada da bahsedildiği gibi standardize şartlarda, DINCH hemen hemen yasaklanan DEHP'e benzer şekilde sızıntı potansiyeli göstermektedir (Bernard ve diğ, 2015).

Sızıntı kimyasallar ilaç endüstrisinin yanı sıra tek kullanımlık tıbbi malzemelerin uzun dönemde kullanımları esnasında hastada olabilecek potansiyel etkilerin önceden tespiti için çalışılması gereken oldukça geniş bir alandır. Literatür, ağırlıklı olarak ilaç ambalajından sızan kimyasallar ve PVC materyallerden sızan plastikleştiriciler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bileşen analizinin de yapıldığı daha detaylı sitotoksosite ve genotoksosite çalışmaları bu alandaki önemli bir boşluğu dolduracaktır.

2.4 Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Sitotoksosite ve genotoksosite çalışmaları kimyasal maddelerin hücre ve dokular üzerindeki etki mekanizmalarını aydınlatmak için önemlidir. Hücre ve DNA hasarı kanser ve enflamasyon gibi birçok patolojik durumun gelişmesinde de rol oynamaktadır (Putnam ve diğ, 2002). Son yıllarda, hücre kültüründe hücre canlılığı ve çoğalmasını araştırmak amacıyla pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı, 96 kuyucuklu plaklarda yapılan sitotoksosite değerlendirmeleridir. Bu yöntemlerle hızlı ve kolay şekilde birçok örneğin sitotoksik analizi yapılabilmektedir (Weyermann ve diğ, 2005). Bu tez çalışmasında farklı markalara ait serum infüzyon setlerinin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkileri nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksosite testleri ile araştırılmıştır. NKA ve MTT sitotoksosite tayin yöntemleri canlı hücre sayısını, lizozomal ve mitokondriyal fonksiyonları değerlendirmek için uygun biyogöstergelerdir (Melo ve diğ, 2003).

2.4.1 Nötral kırmızı alım (NKA) testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

Nötral kırmızı alım oldukça yaygın şekilde kullanılan, hücre hasarını ve hücre canlılık düzeyini gösteren bir sitotoksisite yöntemidir (Repetto ve diğ, 2008). Supravital bir boya olan nötral kırmızı (3-amino-m-dimetilamino-2metil-fenazin hidroklorür) boyasının canlı hücrelere penetrasyonu ve devamında lizozomal matrikse bağlanan boya miktarının kolorimetrik olarak ölçülmesi mekanizmasına dayanan NKA yöntemi Borenfreund ve Puerner tarafından geliştirilmiştir. Nötral kırmızı boyası katyonik bir boya olup, lizozomal matriksteki anyonik bölgelere elektrostatik olarak bağlanır ve birikim miktarı değerlendirilerek hücre canlılığı tespit edilir (Weyermann ve diğ, 2005).

Nötral kırmızı boyası hücre membranını noniyonik difüzyon ile geçer ve lizozomol membranda veya hücre yüzeyinde bir hasar nötral kırmızı alımını azaltır. Böylelikle canlı/sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreler ayrılabilir (Komissarova ve diğ, 2005). Sağlıklı hücreler uygun kültür ortamında devamlı bölünerek canlılıklarını devam ettirirler. Toksik bir madde ise hücrenin bölünme döngüsüne etki ederek büyüme sürecini yavaşlatır veya durdurur. Sitotoksisite de herhangi kimyasal bir maruziyetten sonra hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre bölünmesine negatif etkide bulunarak nötral kırmızı alımının azalmasına neden olur. Dolayısıyla nötral kırmızı boyası, canlı ve sağlıklı hücrelerin lizozomlarına daha fazla alınır ve bu alınma oranı da hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Fotakis ve Timbrell, 2006; Yano ve Marcondes, 2006).

2.4.2 MTT yöntemi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

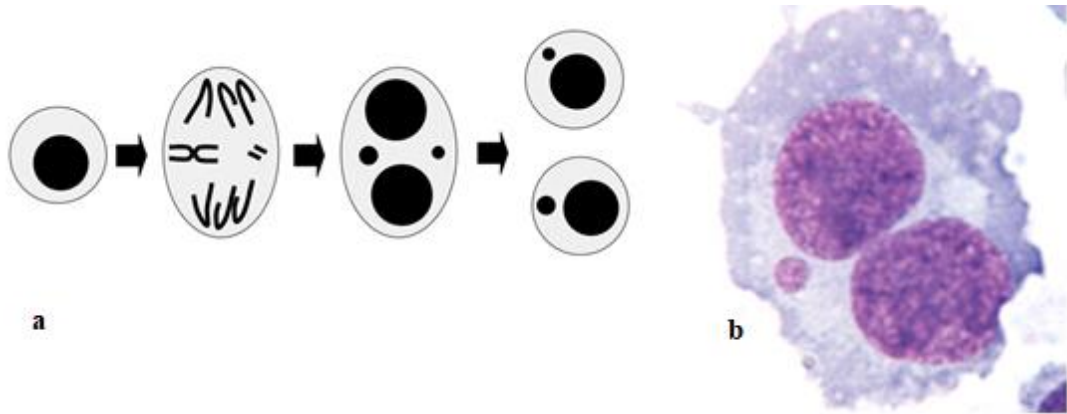
MTT (3-[4,5-dimetilliyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid) testi, MTT boyasının canlı hücrelerde mitokondriyal aktivitenin bir göstergesi olan formazana dönüşümü prensibine dayanan bir sitotoksisite testidir. Çoğu hücre popülasyonu için, total mitokondriyal aktivite canlı hücre sayısı ile ilişkili olduğundan, bu yöntem ilaçların hücre hatları veya primer hasta hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkilerini ölçmek için yaygın olarak kullanılır. MTT'nin genel amacı ayrıntılı hücre sayımına gerek kalmadan nispeten yüksek verimli (96 kuyucuklu plaklarda) canlı hücreleri ölçmektir. Bu nedenle, en yaygın kullanımı, çeşitli konsantrasyonlarda çeşitli ilaçların sitotoksisitesini belirlemektir. MTT yönteminin prensibi, yaşayabilir hücrelerin çoğunda mitokondriyal aktivitenin sabit olması ve dolayısıyla canlı

hücrelerin sayısındaki bir artışın veya azalmanın, mitokondriyal aktivite ile doğrusal olarak ilişkili olmasıdır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, tetrazolyum tuzu MTT'nin homojen ölçüm için çözündürülebilir formazan kristallerine dönüştürülmesiyle yansıtılır. Böylelikle, canlı hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunlukta (OD) yansıyan formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle tespit edilebilir (Van Meerloo ve diğ, 2011).

2.4.3 Mikroçekirdek testi ile genotoksik etkinin belirlenmesi

Genotoksisite hücrenin genetik materyallerinde meydana gelen hasarları ifade eden bir kavramdır. Gen mutasyonları, DNA füzyonu, kromozom anormalileri, DNA zincirinde kırıkları gibi hasarlara neden olan maddelerin DNA'da meydana getirdiği istenmeyen etkilere genotoksik etki denilmektedir. Genotoksik hasarın tespitinde de çeşitli biyoizlem testleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başlıcaları; Ames testi, Comet testi, kardeş kromatid değişim testi, kromozomal aberasyon testi ve mikroçekirdek testidir (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Choy, 2001).

Mikroçekirdek, hücre bölünmesi sırasında kromozom parçalarından veya tam kromozomlardan oluşan genetik materyalin hücre çekirdeği içine katılmadan varlığını sürdürmesidir. Hücre bölünmesinin anafaz aşamasında oluşan bu yapılar, ana çekirdekten farklı küçük çekirdekleri oluşturmaktadır. Bu çekirdeklere de mikroçekirdek adı verilmiştir.



Şekil 2.4: a) Kromozom fragmenti ya da bütün kromozomdan mikroçekirdek oluşumunun şematik diyagramı b) Mitojen stimule, sitokinezi blok bir mikroçekirdeğe sahip lenfosit hücresi (Bonassi ve diğ, 2007)

İyonize radyasyon, oksidatif stres ve her türlü fiziksel ve kimyasal mutajene maruz kalmak farklı kromozom bozuklukları oluşturabilir. Anöploidiyi uyaran anojenik

maddeler sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarken, klastojen maddeler de kromozom kırıkları oluşturarak mikroçekirdek oluşumuna katkıda bulunurlar (Countryman ve Heddle, 1976; Fenech, 2000; French, 2007).

Mikroçekirdek testi sitogenetik hasarın tespitinde ve değerlendirilmesinde sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerini güvenilir bir şekilde tespit eden bir yöntemdir. Günümüzde kullanılan mikroçekirdek yönteminde kullanılan sitokinezi-blok yöntemi bu teknikteki bazı problemlerin ortadan kalkmasına ve güvenilirliğinin artmasına katkıda bulunmuştur. Tekniğin temel prensibi mitoz bölünmede sitokinezi durdurmaştır. Sitokalsin-B isimli bir küf mantarı metaboliti olan madde, aktin polimeraz inhibitörüdür. Sitokinez aşamasında nükleer bölünmeyi durdurmadan, sitoplazmanın bölünmesini sağlar. Böylelikle tek sitoplazmada iki çekirdek içeren hücreler ortaya çıkar. Mikroçekirdekler de genotoksik hasar nedeniyle veya spontan bir şekilde ana çekirdek haricinde yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadırlar. Mitozun anafaz evresinde sentrik elementler kutuplara çekilirken, asentrik elementler ve iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara çekilemeyerek hücre çekirdeğinden ayrı olarak farklı bir membranla çevrilerek yeni bir yapı oluştururlar. Lenfosit kültürüne Cyt-B ilavesi ile çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazma bölünmesini yapamamış çift çekirdekli hücrelerin tanınması ve sayılması oldukça kolay olup, mikroçekirdek içeren hücrelerin tayini de yapılabilmektedir (Fenech, 2000).

3. MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışmasında farklı firmalara ait serum infüzyon setlerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Etik açıdan ticari amaçla faaliyet gösteren firmalar tarafından satışa sunulan farklı markaların adları tez içeriğinde belirtilmemiştir. Bu ürünlerin firma bilgileri listelenerek tüm setlere bir örnek numarası verilmiştir. 1-13 numara ile kodlanan bu setlerden alınan eşit uzunluktaki numuneler tamamen aynı şartlarda ve eş zamanlı olarak sitotoksisite ve genotoksisite deneylerinde kullanılmıştır. Yapılan çalışmada 13 farklı marka serum infüzyon setinin sızıntı kimyasallarının etkileri incelenmiştir. Sızıntı kimyasallarının elde edilmesi amacıyla her bir setin plastik line (hortum) kısmı kullanılmıştır. Deneyler için serum setlerinin hortum kısımlarından 2,5 cm'lik kesitler şeklinde eşit örnekler alınarak hassas terazide tartılmış ve yeniden steril edilmişlerdir. Mikroçekirdek testi için 3 tekrarlı çalışmada kullanılmak üzere alınan numunelerin tartım ağırlıkları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Böylece tekrarlı çalışmalar için alınan örneklerin birbirine yakın oldukları teyit edilmiştir.

Çizelge 3.1: Örneklere ait tartım ağırlıkları (mg)

Örnek	X	Y	Z
Serum seti 1	0,120	0,127	0,122
Serum seti 2	0,106	0,104	0,107
Serum seti 3	0,117	0,119	0,118
Serum seti 4	0,122	0,119	0,121
Serum seti 5	0,116	0,118	0,115
Serum seti 6	0,106	0,103	0,108
Serum seti 7	0,115	0,113	0,113
Serum seti 8	0,118	0,124	0,128
Serum seti 9	0,115	0,113	0,115
Serum seti 10	0,149	0,158	0,156
Serum seti 11	0,115	0,120	0,118
Serum seti 12	0,116	0,114	0,122
Serum seti 13	0,123	0,122	0,120

Malzemelerin yapısal özelliklerinin bozulmaması için sterilizasyon işlemi, 1 saat süreyle UV ışık altında bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite ve genotoksosite testlerinde kullanılmak üzere ortamın hazırlanması için örneklerin her biri laminar flow kabin içerisinde steril falkon tüplere konan 2,5 ml hücre besiyeri ortamına bırakılmıştır. Daha sonra numuneleri içeren tüm besiyerleri inkbatöre kaldırılarak 37°C'de 72 saat süre ile bekletilmiştir. Burada planlanan olgu serum setlerinden sıvı ortama geçen sızıntı kimyasalların bu ortamda çoğalan hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturup oluşturmayacağını incelenmesidir. Test materyalleri NKA ve MTT testlerinde kullanılmak üzere %99 RPMI 1640, %1 antibiyotik (Penisilin-streptomisin) içeren besiyerinde; mikroçekirdek testinde kullanılmak üzere hazır kromozom besiyerinde (Chromosome medium-B) hazırlanmıştır.

Sitotoksosite ve genotoksitenin belirlenmesi amacıyla uygulanan tüm deneylerde 13 farklı set numunesi, 1 negatif kontrol ve 1 de pozitif kontrol (%1 tritonX-100 veya 0,2µg/ml MMC) olmak üzere toplam 15 grup tüm deneylerde 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; Asetik Asit (Glasiyel, %99) (Sigma), Dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck), Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (Gibco), Etil Alkol (Etanol) (Sigma), Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma), Formaldehit (Tekkim), Giemsa boyası (Merck), Hidroklorik asit (%37) (Sigma), Kromozom besiyeri (Merck), Metil alkol (Metanol) (%99) (Sigma), Nitrik asit (HNO_3) (VWR), Nötral Kırmızı (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Sigma), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (Tekkim), Potasyum klorür (KCl) (İsolab), RPMI-1640 (Sigma), Sitokalsin B (Sigma), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), Tripan Mavisi (Sigma), Tripsin-EDTA (Gibco), 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (Sigma)'dür.

3.2 DeneYlerde Kullanılan Araç ve Gereçler

DeneYlerde kullanılan araç ve gereçler; 96 Kuyucuklu Plaklar (SPL), Buzdolabı (Arçelik, Beko), Derin Dondurucu (-20°C) (Arçelik), Derin Dondurucu (-80°C) (Arctico), Distile Su Cihazı (Merck), Hassas Terazi (UniBloc), Inverted Mikroskop (Olympus), Karbondioksit (CO₂) İnkübatörü (Panasonic), Lam (26x76 mm) (Marienfield), Manyetik Karıştırıcı (BioCote), Mikropipet (20-200µl) (Eppendorf), Mikropipet (100-1000µl) (Eppendorf), Mikropipet (30-300 µl 8 kanallı) (Eppendorf), Mikrosantrifüj (Beckman Coulter,), Mikroskop (upright) (Zeiss), Otoklav (Hirayama), pH metre (Mettler Toledo), Pipet tabancası (Thermo), Santrifüj (Onilab), Sayım lamı -Thoma lamı (Isolab), Spektrofotometre (BioTek), Steril enjektör (2 ve 10 ml'lik) (Set Inject), Steril Kabin (Telstar), Steril pipetler (10 ve 25ml) (SPL), Steril membran filtre (0,22µ) (Isolab), Steril tüp (12 ml, kırmızı kapaklı) (Cellstar), Steril Santrifüj Tüpleri (15 ml) (Isolab), Steril Tüpler (50 ml) (Isolab), Su Banyosu (Nuve, VWR), Terazi (Radwag), Vorteks (BioCote), Yatay Çalkalayıcı (Daihan), Yatay Hücre Kültürü Şişesi (75cm²) (Isolab),'dir.

3.3 Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1 NKA ve MTT testinde kullanılan çözeltiler

Hücre kültür ortamı, 500 ml RPMI 1640 besiyeri üzerine 50 ml (% 10) fetal sığır serumu (FBS) ve 5 ml (% 1) penisilin/streptomisin eklenerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) stok çözeltisi için 20 mg NK boyası 5 ml FBS içermeyen besi yeri içerisinde çözülmüştür. Su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) standart çözeltisi deney gününden bir gün önce 625 µl NK stok çözeltisi 50 ml FBS içermeyen besi yeri ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Membran filtreden süzülerek 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Fiksasyon (sabitleme) çözeltisi için 100 ml etil alkol, 2 ml asetik asit ve 98 ml distile su karıştırılarak hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi için 50 mg MTT 10 ml Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti membran filtreden steril, ışık geçirmeyen bir tüpe süzölmüştür. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak, 4°C'de saklanmıştır.

3.3.2 Mikroçekirdek yönteminde kullanılan çözeltiler

Sitokalsin B (Cyt-B) çözeltisi için 5 mg toz halindeki sitokalsin-B 7,375 ml DMSO içinde çözülmüştür. Küçük hacimler halinde -20°C'de saklanmıştır. Bu stoktan 50 µl besi ortamına eklenerek son konsantrasyonun 6 µg/ml olması sağlanmıştır.

Mitomisin C (MMC) çözeltisi için toz halindeki 2 mg MMC 10 ml distile su içinde çözümlenerek 200 µg/ml ana stok hazırlanmıştır. Bu ana stoktan 1/10 oranında seyreltilerek hazırlanan 20 µg/ml ara stoktan költürlere eklenen miktar ile son konsantrasyonun 0,2 µg/ml olması sağlanmıştır.

Nitrik asit (HNO₃) çözeltisi için % 65'lik nitrik asitten 68,75 ml alınmış, distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1N çözelti hazırlanmıştır. Koyu renk şişede, oda sıcaklığında saklanmıştır.

Hipotonik potasyum klorür (KCl) çözeltisi 1,397 g potasyum klorürü 250 ml suda çözümlenerek hazırlanmış, 4°C'de saklanmıştır.

Fiksasyon çözeltisi 3:1 oranında metanol-glasiyel asetik asit karışımı taze olarak hazırlanmıştır.

Giemsa boyası için 11,34 g KH₂PO₄ 250 ml distile suda çözümlenerek tampon A (pH:4,8) ve 7,37 g Na₂HPO₄.2H₂O 250 ml distile suda çözümlenerek tampon B hazırlanmıştır (pH:9.3). 5 ml tampon A, 5 ml tampon B, 5 ml Giemsa boyası ve 85 ml distile su karıştırılarak % 5'lik Giemsa boyası hazırlanmıştır. Çözeltinin pH değeri 6,8'e ayarlanmıştır.

3.4 Nötral Kırmızı Alım Yöntemi

Sitotoksite çalışmalarında L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde yürütölen çalışmalarda kullanılmak üzere hibe olarak verilmiştir. Temin edilen bu hücreler bir süre steril şartlarda çoğaltılıp

kryotüplerde dondurularak -80°C 'de saklanmıştır. Çalışma öncesinde hücreler 37°C 'ye getirilmiş olan su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiştir. Steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atılmıştır. Bu yıkama aşaması ile saklama ortamındaki RPMI uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre pelleti hacimce % 90 RPMI, % 10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), % 1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarılmıştır. 37°C 'de % 5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde kültür edilerek steril ortamda çoğaltılmıştır. 2-3 günlük süre içerisinde hücreler ve besiyeri inverted mikroskopta kontaminasyon durumu ve doyumluğu açısından kontrol edilmiştir. Büyümeye bırakılan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları %70 doyumluğa ulaştıklarında ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada, besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler 10 ml ılık PBS ile yıkanarak, üzerine 5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Hücreler yapıştıkları yerden kalkana kadar kültür kabının tabanına hafif hafif vurulmuştur. Steril bir tüpe 10 ml besiyeri konularak, tripsin sayesinde zeminden ayrılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 1000 devir/dakika hızda 25°C 'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı çalışma kabini altında uzaklaştırılmış ve dipte toplanan hücre pelleti 10 ml besiyeri ile dikkatlice karıştırılmıştır. Bu aşamada elde edilen hücre süspansiyonundan 100 μL alınarak bir ependorf tüpe aktararak üzerine 900 μL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerine lamel yerleştirilerek, yaklaşık 10 μL hücre süspansiyonu kapiler etkiyle doldurulmuştur. Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra hazırlanan hücreler çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara 200 μL 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Plaka etüve kaldırılarak 24 saat inkübasyona bırakılmış, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklenmiştir. 24 saat sonra yine steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha önceden hazırlanan serum setlerinin sızıntı kimyasallarını içeren besiyeri ortamları, negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %1 Tritonx-100 içeren besiyeri ile muamele edilen hücreler 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

Bir sonraki gün çalışma sırasında kullanılmak üzere nötral kırmızı çözeltilisi (100 ml besiyeri + 1250 µl Nötral kırmızı stok çözeltilisi) hazırlanarak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyeri boşaltılmıştır. Bir gün önceden hazırlanan nötral kırmızı çözeltilisinden her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 3 saat daha inkübasyon yapılarak, süre sonunda boya ortamdaki uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 3-4 kez ılık PBS ile yıkanmıştır. Süzgeç kağıdına vurarak plakalar kurutulmuştur. Tüm hücrelere 200 µl %50 metil alkol, %1 glasiyel asetik asit ve %49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklenmiştir. Plaka çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile çalkalanmıştır. Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları plak okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyin her aşaması, boya ışıkta bozulduğu için, mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır.

3.5 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi

Sitotoksikite çalışmalarında L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. NKA testinde anlatıldığı şekilde hücreler çoğaltılmıştır. Hücreler MTT analizi için 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda hücrelerin kuyucuklar içerisine tutunması sağlanmıştır. Ardından besiyeri uzaklaştırılarak 3 gün süre ile serum setlerinin bekletildiği besiyeri ortamı, negatif ve pozitif kontrol besiyeri ortamları 200 µl/kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri ve hazırlanan MTT çözeltilisinden 10 µl eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda MTT çözeltilisi uzaklaştırılmıştır. Oluşması beklenen formazan kristalleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde DMSO ile çözülmüştür. Kültür kabı 10 dakika yatay çalkalayıcıya konduktan sonra oluşan renk değişim miktarı spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Tüm deneyler ayrı zamanlarda 3 kez tekrarlanarak elde edilen sonuçların ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.6 Mikroçekirdek Yöntemi

Her bir serum infüzyon setinden hazırlanan sızıntı kimyasallarının etkisinin incelenmesi amacıyla insan periferik kan kültürleri hazırlanmıştır. Bu amaçla steril bir enjektörle sağlıklı vericilerden heparin kaplı tüplere 5 ml kan örneği alınmıştır. Kan örnekleri; sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan, 27-30 yaşlarında üç donörden temin edilmiştir. Periferik kandan lenfosit kültürlerinin yapılması için kan örneklerinin uygun besi yerine eklenmesi ve bölünmenin uyarılması gerekmektedir. Kanın 0,25 ml'si, içerisinde 2,5 ml'lik kromozom ortamı ve serum setlerinin sızıntı kimyasalları bulunan tüplere ekilmiştir. Tüpler 37°C'deki etüve 45° eğik şekilde yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Kültürdeki hücrelerin toplam inkübasyon süresi 72 saattir (3 hücre bölünmesi). Kültür süresince sabah akşam olmak üzere tüpler yavaşça altüst edilerek çalkalanmıştır.

Kültürün 44. saatinde sitokinezi engellemek için tüm kültürlere 50 µl sitokalin-B (6 µg/ml) eklenmiştir. Bu aşamadan sonra kültür tüpleri alüminyum folyo ile sarılarak ışık alması engellenmiştir. 72 saatlik sürenin sonunda inkübasyon sonlandırılmıştır. Tüpler, 10 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilerek, ardından üstte kalan süpernatant bir pastör pipeti yardımıyla dip kısımdaki hücreler kaldırılmadan dikkatlice atılmıştır. Geriye kalan 0,25-0,35 ml'lik kısım vorteks yardımıyla homojenize edildikten sonra, tüplere 4°C'deki 0,075 M KCl hipotonik çözeltisinden 5 ml damla damla ve çok yavaş şekilde vorteks üzerinde karıştırılarak ilave edilmiş ve sonra buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir.

Tüpler buzdolabından çıkarılarak, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra, tüplere, 5'er ml 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften ilave edilerek ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon amacıyla yapılan bu işlem iki kez daha uygulanmış ve her fiksatiften sonra tüpler 5 dakika buzdolabında bekletilmiştir. 3. fiksasyon aşamasında sitoplazmanın korunması amacıyla fiksatif çözeltisinde son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye kalan hücre çözeltisi pipetle yavaşça homojenize edilmiştir.

Preparatların hazırlanması aşamasında, önceden 1N HNO₃'de temizlenerek buzdolabında % 70 etil alkolde bekletilmiş ve sonrasında kurulanmış lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla damlatılarak süspansiyonun yayılması sağlanmıştır.

Preparatlar, 24 saat oda sıcaklığında toz olmayacak kapalı bir kap içinde bırakılarak kurutulmuştur.

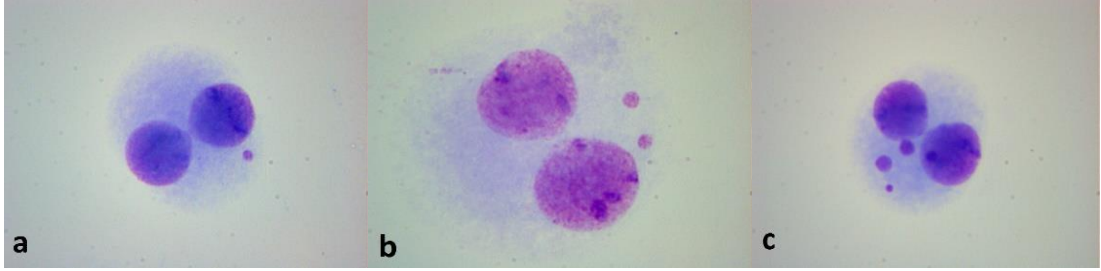
Hazırlanmış olan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa (pH: 6,8) boyası ile 12-15 dakika boyanmıştır. Boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın akması için üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek yıkanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

Tüm bu işlemler 3 farklı donörden alınan kanlarla tekrarlı olarak yapılmıştır. 13 farklı serum infüzyon setine ait örnekler, kontrol grubu için numune ekstraktı olmayan örnek ve pozitif kontrol için de 0,2µg/ml Mitomisin C eklenen örnek olmak üzere 15 grup hazırlanmıştır. Farklı donörlerden hazırlanan kültürlerde 3 tekrarlı olarak hazırlanan toplam 45 gruptan az 2 adet preparat yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için hazırlanan preparatlardan 1000 binükleat hücre mikroçekirdek frekansı belirlemek üzere ışık mikroskopunda sayılmıştır.

Mikroçekirdek frekansı ve nükleer bölünme indeksinin saptanması için sitokinezi blok metodu kullanılmıştır. Sitokinezi-blok metodu ile mikroçekirdek (MÇ) yönteminde, mitoz geçiren hücrelerde; sitokalsin-B ile sitokinez durdurulur. Böylece çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak ayırt edilebilir. MÇ incelemesi sırasında sitoplazma bölünmesini tamamlayamamış, çift çekirdekli hücreler esas alınır, çünkü bu hücreler, incelenen bileşiklerin eklenmesinden sonra bölünen hücrelerdir. Tek çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler ise incelenen bileşiklerin eklenmesinden kaynaklanmayan, başlangıçta lenfosit hücrelerinde mevcut olan veya spontan oluşan MÇ'lerdir. Vericilere ait her bir preparattan 1000 tane iki çekirdekli hücre, mikroçekirdek içerip içermediği yönünden incelenir.

Heddle ve Countryman'in kriterlerine göre; MÇ boyutu çekirdeğin %20'sinden fazla, %5'inden az olmamalıdır, MÇ boya alma yoğunluğu esas çekirdek ile aynı olmalıdır, sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler sayılmalıdır (Şekil

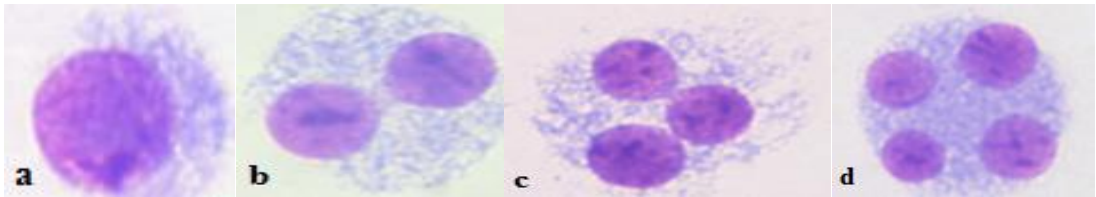
3.1). MÇ frekansı $[1x(1MÇ)+2x(2MÇ)+3x(3MÇ)] /n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MÇ sayısı (MÇ/hücre) olarak belirlenir.



Şekil 3.1: Mikroçekirdek içeren insan lenfositlerinin mikroskop görüntüsü a) bir mikroçekirdek b) iki mikroçekirdek c) üç mikroçekirdek (Taner, 2015)

Mikroçekirdek yönteminde kullanılan sitokalsin-B hücre bölünmesini durdururken nükleer bölünme üzerine etki etmediği bilinmektedir. Böylece sitokinezi bloke edilmiş olan hücreler içerdikleri çekirdek sayısına göre değerlendirilerek nükleer bölünme indeksi (NBİ) hesaplanabilmektedir. Bir kez bölünen hücreler iki çekirdeğe, iki kez bölünen hücreler ise üç veya dört çekirdeğe sahiptir. Fitohemaglütinin (PHA) uyarısına cevap veren ancak bölünmesini tamamlamamış olan hücrelerde ise yalnızca bir çekirdek bulunmaktadır (Fimognari ve diğ, 2005).

Nükleer bölünme indeksi hesaplamalarında tüm hücreler sayılır. Hiç bölünme geçirmemiş tek çekirdek bulunan hücreler N1, iki çekirdek bulunan hücreler N2, üç çekirdek bulunan hücreler N3, dört veya daha fazla çekirdek bulunan hücreler ise N4 olarak belirlenir (Şekil 3.2). $[1 \times (N1) + 2 \times (N2) + 3 \times (N3 + N4)] / n$ (n=incelenen toplam hücre) formülü ile nükleer bölünme indeksi hesaplanır.



Şekil 3.2: Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) çekirdekli lenfositlerin mikroskop görüntüsü.(Taner, 2015)

Mikroçekirdek yönteminde serum setlerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için hazırlanan lamlardan ışık mikroskobu altında sayımlar yapılmıştır. Her uygulama için 1000 çift çekirdekli hücre, 3 ayrı gönörden yapılan tekrarlı çalışmalarda toplam 3000 hücre MÇ içerip içermediği yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca her bir çalışmada

500 hücre, toplamda 1500 hücre de çekirdek sayısına göre sayılarak NBİ hesaplanmıştır.

3.7 İstatistiksel Analizler

Sitotoksisite testlerinde her bir örnek kontrol grubu ile kıyaslanarak % hücre canlılık olarak belirlenmiştir. Mikroçekirdek yönteminde elde edilen veriler negatif kontrol ve pozitif kontrol ile Z testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Ülke genelindeki hastanelerde kullanılan 13 adet farklı serum infüzyon setinden kaynaklanan sızıntı kimyasalların in vitro sitotoksik etkisi L929 hücrelerinde Nötral Kırmızı Alım yöntemi ile değerlendirilmiştir. Eşit oranda kesit alınarak 60 dakika UV ile sterilize edilen serum infüzyon seti örnekleri RPMI 1640 besiyerinde 72 saat süre ile bekletilmiştir. Bu işlemin sonucunda elde edilen sızıntı kimyasalları içeren 13 farklı ortam 96'lı plakalara ekilen hücreler ile muamele edilmiştir. NKA testi farklı zamanlarda üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Yapılan tekrarlı çalışmalardan elde edilen tüm verilerin ortalamaları alınarak yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Nötral Kırmızı Alım testi ile belirlenen yaşayan hücre ortalama absorbans değerleri ve kontrole oranla hesaplanan yaşayan hücre yüzdeleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

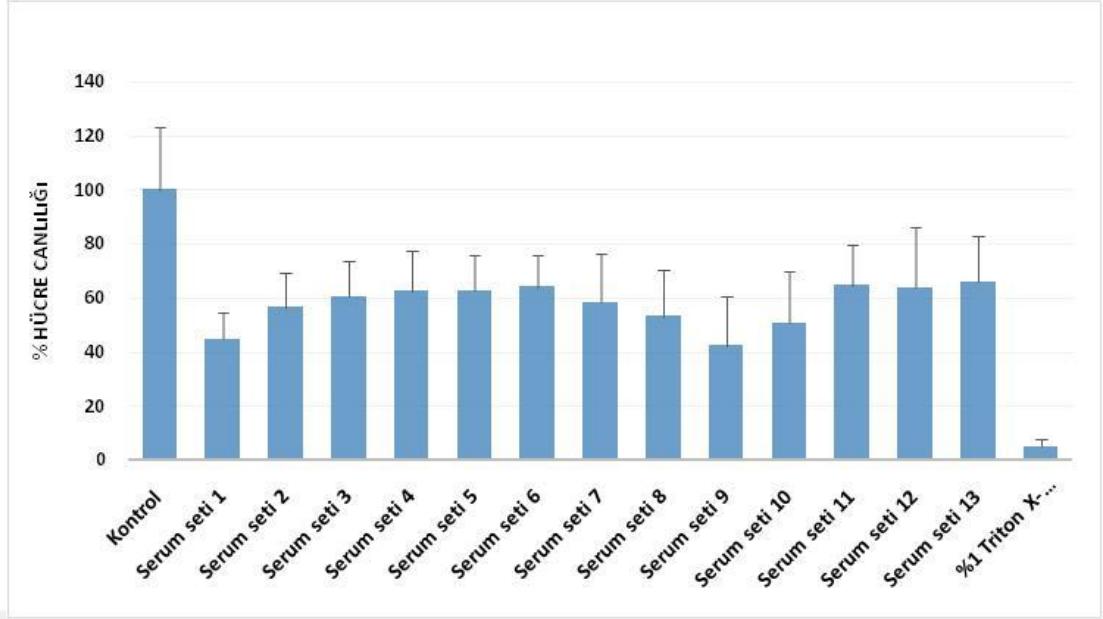
L929 hücrelerinin serum infüzyon setlerinden sızan kimyasallara 24 saat süre ile muamele edilmesinin ardından uygulanan Nötral Kırmızı Alım testi sonuçlarına göre serum seti grupları ve pozitif kontrol grubu olan %1 Triton X-100, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. Serum infüzyon setleri için belirlenen hücre canlılığı yüzdeleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla %70'in altında değerlere düştüğü görülmüştür. Özellikle 1 ve 9 numaralı serum infüzyon seti örneklerine ait sızıntı kimyasallarının hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla %50'nin altına düşmesine neden olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan 13 farklı serum infüzyon seti örneği içerisinde Nötral Kırmızı Alım testi sonuçlarına göre 9 numaralı serum infüzyon seti örneğinin kontrole oranla %42,34'lük yaşayan hücre değeri yüzdesi ile

en yüksek sitotoksik etkiyi gösteren örnek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1: NKA yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

Örnek	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri*	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
Kontrol	2,534 ± 0,587	100
Serum seti 1	1,137 ± 0,253	44,87
Serum seti 2	1,432 ± 0,321	56,51
Serum seti 3	1,538 ± 0,331	60,69
Serum seti 4	1,584 ± 0,379	62,51
Serum seti 5	1,587 ± 0,330	62,63
Serum seti 6	1,622 ± 0,301	64,01
Serum seti 7	1,496 ± 0,460	58,25
Serum seti 8	1,347 ± 0,437	53,16
Serum seti 9	1,073 ± 0,463	42,34
Serum seti 10	1,290 ± 0,482	50,91
Serum seti 11	1,639 ± 0,387	64,68
Serum seti 12	1,617 ± 0,569	63,81
Serum seti 13	1,672 ± 0,428	65,98
K+ (%1 Triton X-100)	0,130 ± 0,072	5,13

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.1: NKA yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

4.2 MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

13 adet serum infüzyon setinin sızıntı kimyasallarının sitotoksik etkisi L929 hücrelerinde MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sitotoksitenin belirlenmesi için RPMI 1640 besiyerinde hazırlanan ve 72 saat bekletilen numunelerin sızıntı kimyasalları içeren 13 farklı ortam 96'lı plakalara ekilen hücreler ile muamele edilerek 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve 3 ayrı çalışmadan elde edilen tüm verilerin ortalamaları alınarak yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrole grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir. MTT testi ile belirlenen yaşayan hücre ortalama absorbans değerleri ve yaşayan hücre yüzdeleri Çizelge 4.2'te gösterilmiştir.

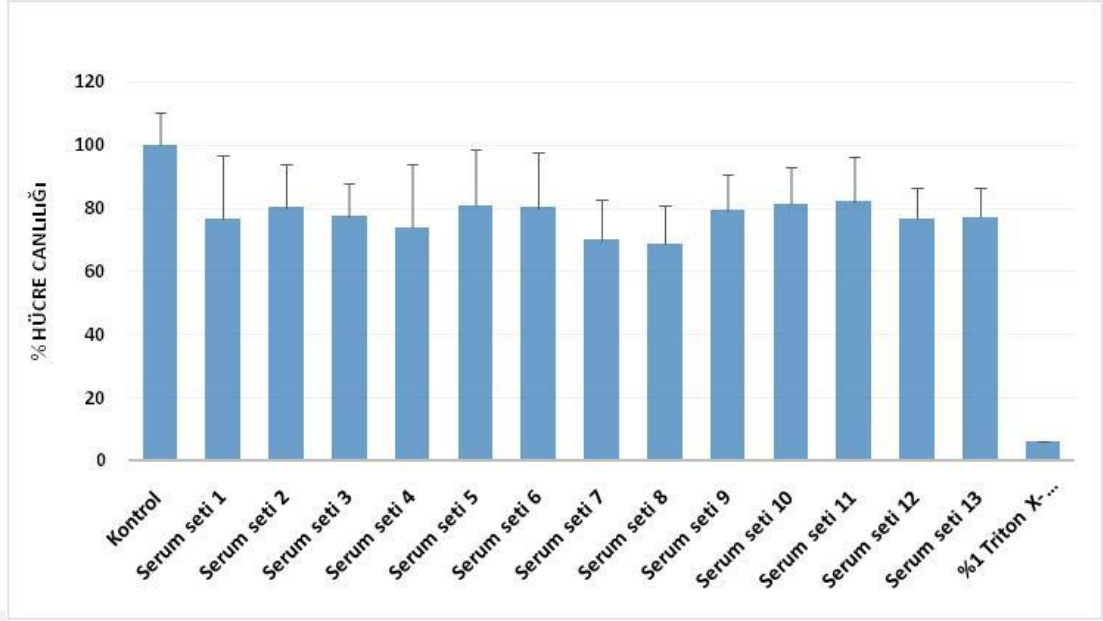
L929 hücrelerinde 24 saatlik kimyasal muamelesi ardından uygulanan MTT testi sonuçlarına göre serum setlerinden sızan kimyasallar ile muamele edilen gruplar ve pozitif kontrol grubu (%1 Triton X-100) negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda hücre canlılığında bir azalma olduğu görülmüştür. Serum infüzyon setleri için belirlenen hücre canlılığı yüzdeleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda hücre canlılığının sadece 7 ve 8 no'lu örneklerde %70'in altına düştüğü görülmüştür. 13

serum seti içerisinde MTT testi sonuçlarına göre 8 no'lu örneğin en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2: MTT yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

Örnek	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
Kontrol	0,791 ± 0,073	100
Serum seti 1	0,606 ± 0,080	76,61
Serum seti 2	0,634 ± 0,159	80,15
Serum seti 3	0,612 ± 0,109	77,37
Serum seti 4	0,583 ± 0,083	73,70
Serum seti 5	0,640 ± 0,159	80,91
Serum seti 6	0,634 ± 0,139	80,15
Serum seti 7	0,553 ± 0,138	69,91
Serum seti 8	0,543 ± 0,101	68,64
Serum seti 9	0,627 ± 0,096	79,26
Serum seti 10	0,642 ± 0,092	81,16
Serum seti 11	0,649 ± 0,095	82,05
Serum seti 12	0,605 ± 0,115	76,48
Serum seti 13	0,611 ± 0,079	77,24
K+ (%1 Triton X-100)	0,047 ± 0,001	5,94

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.2: MTT yöntemine göre serum infüzyon setlerine ait sızıntı kimyasallarının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

4.3 Mikroçekirdek Yöntemi ile Genotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

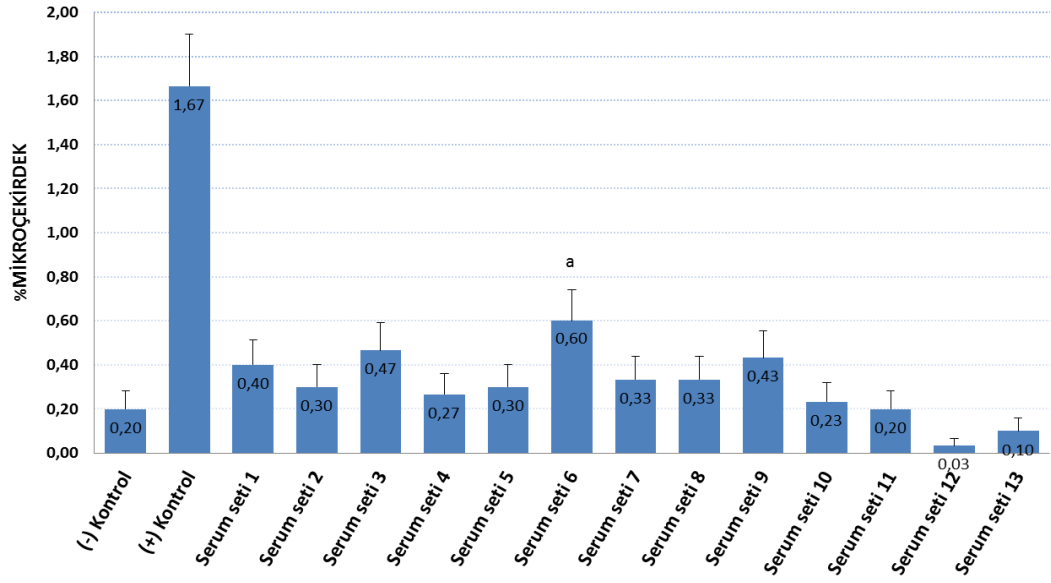
13 adet serum infüzyon setinin sızıntı kimyasalların sitotoksik etkisi insan periferik kan lenfosit hücrelerinde sitokinezi blok tekniği ile mikroçekirdek yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. 13 serum infüzyon seti, kontrol grubu ve pozitif kontrol olmak üzere hazırlanan 15 grubun her biri farklı donörlerden hazırlanan kültürlerde 3 tekrarlı olarak çalışılmış toplam 45 gruba ait preparatta belirlenen MÇ değerleri, ortalama mikroçekirdek frekansları ve nükleer bölünme indeksleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Serum setlerinden sızan kimyasallar ile muamele edilen gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında 1-10 numaralı örneklerde mikroçekirdek oluşumunda artışa neden olduğu ancak 11-13 numaralı örneklerde herhangi bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). Mikroçekirdek frekanslarındaki artışlar istatistiksel olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece bir serum setindeki (6 numaralı serum seti) artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. Bu artış pozitif kontrol ile kıyaslandığında, pozitif kontrol seviyesinde bir artış olmadığı da belirlenmiştir. NBİ değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında serum setlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.3: Serum infüzyon setlerinin sızıntı kimyasalları ile muamele edilen insan lenfositlerindeki mikroçekirdek frekansları ve nükleer bölünme indeksi değerleri

Uygulama Grubu	Donör			Toplam MÇ	MÇ/10 ³	%MÇ±SH	NBİ±SH
	X	Y	Z				
(-) Kontrol	2	2	2	6	0,20	0,2±0,08	1,17±0,28
(+) Kontrol	12	18	20	50	1,67	1,67±0,23	1,14±0,27
Serum seti 1	6	3	3	12	0,40	0,4±0,12	1,11±0,27
Serum seti 2	4	4	1	9	0,30	0,3±0,10	1,14±0,27
Serum seti 3	6	4	4	14	0,47	0,47±0,12	1,20±0,28
Serum seti 4	6	1	1	8	0,27	0,27±0,09	1,11±0,27
Serum seti 5	2	2	5	9	0,30	0,3±0,10	1,17±0,28
Serum seti 6	10	5	3	18	0,60	0,6±0,14 ^a	1,20±0,28
Serum seti 7	5	2	3	10	0,33	0,33±0,11	1,20±0,28
Serum seti 8	4	3	3	10	0,33	0,33±0,11	1,20±0,28
Serum seti 9	4	5	4	13	0,43	0,43±0,12	1,29±0,29
Serum seti 10	3	3	1	7	0,23	0,23±0,09	1,35±0,30
Serum seti 11	1	3	2	6	0,20	0,2±0,08	1,20±0,28
Serum seti 12	1	0	0	1	0,03	0,03±0,03	1,50±0,31
Serum seti 13	1	1	1	3	0,10	0,1±0,06	1,29±0,29

MÇ: Mikroçekirdek, SH: Standart hata, NBİ: Nükleer bölünme indeksi

^a Kontrole göre p<0.05'e göre anlamlı



Şekil 4.3: Serum infüzyon setlerinin sızıntı kimyasalları ile muamele edilen insan lenfositlerindeki mikroçekerdek frekansları

5. TARTIŞMA

Doğal veya sentetik kaynaklı biyomalzemeler metalik bileşenler, polimerler, seramikler veya kompozit malzemelerden sentezlenebilirler. Medikal uygulamalarda biyomalzemeler bir fonksiyonu tamamen karşılayabildikleri gibi bir işlevi arttırmak veya değiştirmek için de kullanılabilirler. Bir biyomalzemenin en özelliklerinden birisi toksik etki oluşturmaması ve biyoyumlu olmasıdır. İlaç taşıyıcı bir sistem, otogreft/allogreft/xenogreft gibi transplant materyalleri, kalp kapakları, stentler, kalça protezleri gibi çeşitliliği oldukça yüksek olan bu ürün grubunun güvenliliği anlamında da pek çok test standardı, iş akışı, altyapı çalışmaları yapılmaktadır.

Klinik kullanımda yaygın bir yeri olan biyomalzemelerden biri de tek kullanımlık medikal malzemelerdir. Bu medikal malzemelerin güvenlik değerlendirmeleri için de bazı test prosedürleri mevcuttur. Özellikle ISO 10993 standardı biyomalzemelerin geçimliliğinin araştırılması için temel kriterleri belirlemektedir. Bu tez çalışmasında 13 farklı marka serum infüzyon seti sitotoksik ve genotoksik etkileri açısından araştırılmıştır. Sitotoksik etkiler L929 fare fibroblast hücrelerinde nötral kırmızı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksisite testleri ile araştırılmıştır. Genotoksik etkiler ise insan periferik kan lenfosit hücrelerinde sitokinezi blok tekniği ile mikroçekirdek testi kullanılarak araştırılmıştır. Bu testler ISO 10993 biyoyumluluk testler protokollerinde yapılması önerilen testlerdir. Sitotoksisite araştırmaları için ISO 10993-5 (In vitro sitotoksisite testleri) kriterleri kullanılmıştır (Sharma, 2015).

Bu çalışma, hastanelerde kullanılan kalite standartları gereği genellikle 72 saat boyunca hastanın damar yoluna bağlı bir şekilde bulunan serum infüzyon setlerinden sızabilecek muhtemel kimyasalların biyomalzeme güvenliği açısından incelenmesi ve markalar arasında farklılıklar olup olmayacağını araştırılması temeline dayanmaktadır. Serum setlerinin line (hortum) kısmının ağırlıklı olarak PVC hammaddesinden yapılması nedeniyle tez çalışması planlaması sırasında başta ftalat

türevleri olmak üzere bir sızıntı kimyasal maruziyetinin olacağı düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında malzeme bileşenleri için herhangi kantitatif analiz yapılmamış olmakla birlikte, Bernard ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada PVC kaynaklı ürünlerden temel sızıntının ftalatlar olduğu belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında serum setlerine ait plastik malzemelerin kimyasal sızıntılarının ve ekstratlarının memeli hücreleri üzerinde olası sitotoksik ve genotoksik bir etkisinin araştırılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Medikal malzeme alanında en sık kullanılan polimerlerden birisi olan PVC kullanımı öncesinde plastikleştirilmektedir. Plastikleştirilmeyen PVC daha sert ve katı bir yapıya sahiptir. Plastikleştirme işlemi için, dioktil ftalat, di-n-desil ftalat, TİOTM, DEHP gibi ftalat türevleri yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Ftalatlar (ftalat esterleri), ftalik asitin dialkil ya da alkil aril esterleridir. İlk olarak 1920'lerde üretilen ftalatlar, 1950'lerde ilk defa geliştirilen ftalat esterleriyle yumuşatılmış polivinilchlorürün (PVC) büyük ölçekli ticari üretimiyle piyasaya sürülmüştür (Kimber ve Dearman, 2010). Ftalatlar, PVC ürünlerine esneklik ve dayanıklılık veren plastikleştirici gibi birçok amaç için kullanılan endüstriyel kimyasalların bir üyesidir. Çözücülerde, motor yağlarında, fiksaj maddelerinde ve deterjanlar gibi kişisel bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır. Ftalatlar PVC'ye katıldığı zaman kovalent olarak bağlı olmadığından kolayca çevreye salınmakta böylece insan ve hayvanlar da bu kimyasallara maruz kalmaktadır (Lyche ve diğ, 2009).

Ftalatların kullanımı başlıca molekül ağırlıklarına bağlıdır. Yüksek molekül ağırlıklı di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP), di-isononil ftalat (DiNP) inşaat malzemeleri, kıyafet, gıda ambalajları, çocuk ürünleri ve tıbbi malzeme ve cihazlar gibi birçok PVC ürünlerinde kullanılmaktadır (Lyche ve diğ, 2009). Düşük molekül ağırlıklı dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP) ve di-n-bütül ftalat (DBP) gibi ftalatlar ise daha çok çözücü olarak, kozmetikler, insektisitler ve farmasötiklerde kullanılmaktadır (Heudorf ve diğ, 2007).

Plastikleştirme işleminde kullanılan ftalat türevlerinden DEHP iyi geçimlilik, ışık stabilitesi, düşük volalite, yüksek suya dayanıklılık, iyi elektriksel özellikler, düşük sıcaklık esnekliği ile mükemmel bir fiyat-performans oranı sunmaktadır. DEHP aynı

zamanda etilen oksit, otoklav, buhar ve radyasyon sterilizasyon yöntemlerinde dayanıklıdır. Medikal malzeme uygulamaları için önemli bir özellik olan şeffaflık özelliği de plastikleştirme işlemi ile sağlanmaktadır. Plastikleştirilmiş PVC'den yapılan bir malzeme şeffaf ve esnektir, ayrıca bükülmeme özelliğine sahiptir. Bu özellikler hastaya kritik sıvıların doğru dozda verilmesini ve hastanın görsel olarak izlenmesi olanaklarını sunmaktadır. Avrupada, Avrupa Farmakopesi'nde kan, kan bileşenleri ve intravenöz infüzyonda kullanılacak sulu çözeltiler için PVC taşıyıcılarda kullanılmak üzere DEHP plastikleştirici olarak tavsiye edilmektedir. DEHP ile plastikleşmiş PVC'de depolanan kırmızı kan hücrelerinde DEHP bu hücrelere bağlanarak onları korumakta ve raf ömürlerini arttırmaktadır (Sastri, 2013).

Diğer yandan son yıllarda yapılan araştırmalarda ftalat türevlerinin toksik etkileri tartışılmaktadır (Hauser ve Calafat, 2005). Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda damar yolu ile kan, trombosit transfüzyonu veya total parenteral beslenme yapılan, mekanik ventilatöre bağlanan, diyalize giren hastalarda DEHP düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Literatürde DEHP maruziyetinin üreme sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem, immünolojik ve lenforetiküler sistem, üriner sistem, nörolojik sistem üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Durmaz ve Özmert, 2010). 84 yeni doğanın kordon kanında serum DEHP düzeylerinin incelendiği bir çalışmada altmış beş (%77) bebeğin kanında DEHP olduğu saptanmıştır. Doğum haftası normal olan bebeklerde DEHP seviyesi düşük bulunurken doğum haftası düşük bebeklerde DEHP seviyesi yüksek bulunmuştur. Düşük doğum haftasını DEHP'in indüklediği ve intrauterin inflamatuvar süreçler nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (Latini ve diğ, 2003). Jaakkola ve Knight, (2008) PVC ürünlerden kaynaklanan ftalat maruziyetine bağlı astım ve alerji gelişimine yönelik 54 makaleyi inceleyerek yaptıkları sistematik derlemede yüksek miktarda ftalat içeren PVC maruziyetine bağlı immün sistemin alerjenlere verdiği yanıtı değiştirebileceği, ısıtılmış PVC'den kaynaklanan zehirli gazlara maruz kalan yetişkinlerde astım gelişmesine neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Avrupa Komisyonunun DEHP içeren medikal malzemelerin ve PVC bazlı bileşenlerin alternatif plastikleştiricilerinin güvenliği hakkında 2008 yılında yayınladıkları görüş raporu 2015 yılında güncellenmiştir. Bu bulgular geçerli olmakla birlikte DEHP aktivitesi ve alternatif ajanlar için yeni çalışmalar da yayınlanmıştır. Temel endişe

DEHP veya medikal malzemelerden sızan diğer plastikleştirici bileşiklere yüksek maruziyet ile hastalarda meydana gelebilecek potansiyel sağlık risklerinin belirlenmesidir.

İnsanlarda DEHP glukronid konjugatı halinde toksik etkisi olmayan bir bileşik olarak atılır. DEHP'in oral akut toksisitesi düşüktür (LD50>25 g/kg rat ve farelerde). Daha düşük LD50 değerleri parenteral maruziyetten sonra gözlenmiştir (200-250 mg/kg in rats). Rodentlerde oral tekrarlı toksisite DEHP'in böbrek, karaciğer ve testislerde toksisiteyi indüklediğini göstermiştir. Hepatosit proliferasyonu, hipertrofisi ve hepatoselüler tümörler DEHP ve metaboliti olan MEHP'in peroksizom proliferatör aktive reseptör alfa ile etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmanın insanlarla ilişkili olmayıp rodentlere özel olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte yeni çalışmalar diğer yolların da hepatik tümör indüksiyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu yüzden rodentlerde karaciğer kanseriyle ilişkisi tamamen göz ardı edilemez. Yakın dönemde Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) DEHP'in karsinogenitesi için hayvan deneylerinin yeterli olduğunu belirtmiştir. Böylelikle DEHP 2008 Görüşü'nde insanlar için muhtemel karsinogen (Grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır (Scenihr, 2015).

İnsanlarda ve memelilerde DEHP sitokrom p450, çeşitli dokulardaki enzimler ve lipazlar tarafından pek çok metabolite dönüştürülür. Pankreatik lipaz özellikle oral alımı takiben oldukça önemli bir rol oynar. Dokular arasındaki lipaz aktivitesindeki tür farklılıkları belirlenmiş olup bunun DEHP etkilerindeki tür farklılıklarında rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif metabolizmadan sorumlu sitokrom p450 ve diğer enzimlerin etkisi tam anlaşılammıştır (IARC, 2012).

DEHP hidrolize edici enzimler pek çok dokuda (özellikle pankreas, intestinal dokular, mukoza ve karaciğer) ve ratlarda kan plazmasında bulunur. Kantitatif olarak daha düşük olmakla birlikte bu adım (kan dolaşımı) parenteral maruziyette oluşur (Scenihr, 2015).

Tüm dünyada PVC yerine alternatif malzemeler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ftalatların toksik etkilerinin ortaya çıkması ancak plastikleştirici olarak alternatiflerin de beklenen sonuçları vermemesi nedeni ile alternatif materyal arayışlarına devam

edilmektedir. Ancak PVC maliyetlerinin düşük olması bu polimeri kolay kolay vazgeçilemeyecek bir konumda tutmaktadır.

Hastanelerde sağlık hizmeti alan hemen her hastaya intravenöz sıvı verildiği göz önüne alındığında bu hastaların hepsine serum infüzyon seti kullanılmaktadır. Bu kadar yaygın kullanılan bir üründe hasta güvenliği ön planda tutulmalıdır. Ülkede kullanımda olan serum infüzyon setlerine bakıldığında hemen hepsinin PVC materyalinden yapıldığı ve DEHP içerdiği görülebilir. Bir serum infüzyon setinin maksimum kullanılma süresi ise 72 saattir. Her halükarda serum torbalarında raf ömürleri boyunca bekleyen mayiler hastalara serum infüzyon seti ile minimum 24 saat maksimum 72 saatte infüze edilmektedir. Bu infüzyon sırasında kullanılan serum infüzyon setindeki DEHP'in hastaya geçişinin olup olmadığı serum infüzyon setinden hastaya giden mayiye DEHP geçmiyor ise bile bunun bilimsel olarak kanıtlanması gerekmektedir.

Literatürde piyasada kullanılan medikal malzemelerdeki ftalatlar ile ilgili yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır. En güncel çalışma Kostic ve arkadaşlarının hastanelerden aldıkları birkaç medikal malzeme için DEHP miktarlarını belirledikleri bir analiz çalışmasıdır. Deneyde plastik diyaliz torbası ve tüpü, infüzyon şişesi ve infüzyon seti kullanılmıştır. Plastik materyaller yaklaşık 1 cm² alan olacak şekilde parçalara ayrılmıştır. Cam viallerde 5 ml n-heksana bırakılan örneklerden 3, 6, 15 ve 30. günlerde numuneler alınmıştır. Parenteral nütrisyon ve periton diyaliz formülasyonlarında kullanılan her bir solüsyon PVC torbalarda ve LDPE şişelerde oda sıcaklığında saklanmıştır. Analiz edilen örnekler sırasıyla periton diyaliz solüsyonu (%1,5 dekstroz), fizyolojik Salin çözeltisi (%0,9 NaCl) ve parenteral nütrisyonunda kullanılan Ringer solüsyonudur (NaCl, KCl ve CaCl₂). Sıvı örnekler analize kadar cam flasklarda 4 °C'de saklanmışlardır. Genel olarak infüzyon solüsyonlarının miadı 3 yıl olduğu için DEHP'in plastik taşıyıcılardan göç oranları tıbbi malzemenin miadı dolmadan önce sızması muhtemel maksimum DEHP miktarını belirlemek için 36 aylık bir periyot sonrasında ölçülmüştür. Ekstraksiyon prosedürü 500 cm³ örnek için 5 cm³ heksanla yürütülmüştür. Her 500 cm³'lük örnek için 5 cm³ heksan ilave edilmiş ve 60 dk ile 24 saat karıştırılmıştır. Organik katmanlar cam vialler alınmış, internal standart eklenmiş ve clean up fazı olmadan numuneler GC-MS'e verilmiştir. Çalışma

sonucunda PVC torbalardan sızan DEHP miktarı LDPE şişelere göre daha fazla bulunmuştur (Kostic ve diğ, 2016).

Ülkemizde ise Resmi Gazete'nin 7 Haziran 2011 tarih ve 27957 sayılı Sağlık Bakanlığı'nın Tıbbi Cihaz Yönetmeliğinin 7. maddesinde “Kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikler” başlığı altında ftalatlar aşağıdaki gibi tarif edilmektedir. “Tıbbi cihazlar, kendisinden sızan maddelerin meydana getirebileceği tehlikeleri asgariye indirebilecek şekilde tasarlanmalı ve imal edilmelidir. 26.12.2008 tarihli ve 27092 Mükerrer sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Tehlikeli Maddelerin ve Müstahzarların Sınıflandırılması, Ambalajlanması ve Etiketlenmesi Hakkında Yönetmeliğe göre kanserojen, mutajen veya üreme üzerine toksik etki gösteren maddelere özel önem verilir. İlaçları, vücut sıvılarını veya diğer maddeleri vücuda uygulamayı ve/veya vücuttan uzaklaştırmayı amaçlayan bir tıbbi cihazın veya tıbbi cihazın bir parçasının ya da bu tür vücut sıvılarını veya maddeleri taşıma ve depolama amaçlı tıbbi cihazların Tehlikeli Maddelerin ve Müstahzarların Sınıflandırılması, Ambalajlanması ve Etiketlenmesi Hakkında Yönetmeliğe göre kanserojen, mutajen veya üreme üzerine toksik etki gösteren kategori 1 ve 2 grubu ftalatlar içermesi durumunda, tıbbi cihaz üzerinde ve/veya her bir parçanın paketi üzerinde veya gerektiğinde satış paketi üzerinde tıbbi cihazın ftalat içerdiğini gösterir etiketleme yapılmalıdır (Resmi Gazete, 2011).

Literatür araştırmalarına göre her ne kadar yaygın kullanılan bir biyomalzeme olsa da bu tez çalışmasında planlanan şekilde serum setleri ile sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Dakwar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada infüzyon setlerinin nitel özelliklerindeki bozulmalar (renk değişimi, potansiyel toksik kimyasalların salımı gibi) araştırılmış, her bir infüzyon LOT serisinin farklı kısımlarındaki sızıntı kimyasalların görece toksisiteyi incelenmiştir. Seçilmiş farklı hücre hatlarının (HeLa ve cEND hücreleri) hassasiyeti karakterize edilmiş, cEND beyin endotel hücre hatlarının tek kullanımlık tıbbi malzeme sızıntılarının in vitro toksisite analizlerinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Dakwar ve diğ, 2012). Bu çalışmadan sonra bazı hücre hatlarında (L-929 ve bEnd.3 hücreleri) infüzyon set sızıntılarının toksisitesindeki mekanizmaların analizi in vitro yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada lateks kısımların en toksik kısım olduğu bildirilmiş, hücre ölümünün ise hücre membranının geçirgenliğinin artışına bağlı olarak onkozis ile indüklendiği gösterilmiştir

(Kozlovskaya ve Stepensky 2015). Aynı araştırmacılar benzer bir çalışmada da infüzyon set sızıntılarının in vitro toksisitesini araştırmışlar, tek bir lotta aynı veya farklı üreticilerin karşılaştırmalı toksisitesini göstermeyen örnekleri analiz etmişlerdir. Aynı zamanda infüzyon set sızıntıları tarafından indüklenen toksik etkilerin bazı hücre hatları (L-929, cEND ve bEnd.3 hücreleri) üzerindeki hassasiyetinin belirlenmesinde, tek kullanımlık tıbbi malzeme toksisitesinin in vitro değerlendirilmesi için bu hücre hatlarının uygun olduğunubelirtmişler ve en uygun deneysel yöntem (maruziyet süresi, analiz türü gibi) için önerilerde bulunmuşlardır.

Kozlovskaya ve diğ. (2015) tarafından yapılan bu diğer çalışmada İsrail’de yaygın şekilde kullanılan infüzyon setlerinin in vitro toksisitesi araştırılmıştır. Deneysel sonuçlar analiz edilen örnekler tarafından indüklenen önemli düzeyde bir toksisite olduğunu göstermekte olup, düzenleyici kuruluşlar tarafından öngörülen güvenlik gerekliliklerini (MTT testinde %30’dan daha az metabolik aktivite azalışı, hücre miktarı, proliferasyonu, koloni oluşumunda belirgin değişikliklerin olmaması vb) karşılamakta başarısız olduklarını bildirmişlerdir. Bu bulgular, daha önce yapılan in vitro toksisite çalışmalarından elde edilen bulgularla da tutarlı olmuştur (Dakwar ve diğ, 2012).

Bu tez çalışmasında farklı serum setlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin kıyaslanması amacıyla setlerin benzer bölgeleri tespit edilmiş ve tüm setlerin plastik hortum kısımlarından eşit uzunlukta parçalar alınmıştır. Bu parçalar hassas terazide tartılarak ağırlıklar açısından materyal hortum genişlik ve kalınlığına bağlı bir farklılık olup olmayacağı da teyit edilmiştir. 2,5 cm olarak alınan örneklerin ağırlıklarının da birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında serum setlerinin sadece hortum kısımları toksisite açısından incelenmiştir. Kozlovskaya ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada serum setlerinin farklı kısımlarının toksik sızıntı salımı yaptığını ve bu sızıntı kimyasalların farklı seviyede toksik etkiyi indüklediğini göstermişlerdir. Kozlovskaya ve diğ. (2015) doğal ve sentetik kauçuk materyalin, infüzyon setlerinin en toksik kısmı olduğunu, hortum (line) ve damlacık odasının daha az toksik olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle infüzyon setlerinin toksisitesi tasarımlarına bağlı olarak kabul edilmektedir. Örneğin; flashball ve enjeksiyon kısmı (kauçuk kısım içermediği için) olmayan setlerde toksisite olmayıp, düzenleyici kuruluşların önerileri ile uyumludur. Diğer taraftan kauçuk içeren kısımlar toksik sızıntılar nedeniyle hücre

ölümünü indüklemiştir. Toksikite mekanizması detaylı şekilde araştırıldığında sızıntıların hücre zarı geçirgenliğini arttırarak apoptotik intraselüler yollarla onkozisle hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Kozlovskaya ve Stepensky, 2015). Analiz edilen infüzyon setlerindeki kauçuk kısımların toksisite karşılaştırılmasında flashball ve enjeksiyon kısmından hazırlanan ham materyallerde açık bir şekilde materyalin kendisine bağlı olduğu görülmüştür. Örneğin, sentetik kauçuk flashball içeren setler aynı kısımda doğal kauçuk kullanılan setlere göre daha toksik bulunmuştur. Ancak ürünlerin depolama süresi birbirinden oldukça farklı olduğundan (2,5 yıl ve 13 yıl) saklama koşullarının ve süresinin de toksisiteyi etkilediği düşünülmektedir. Hammade bileşeni ve saklama koşulları arasındaki farklılıkların güvenlik üzerindeki etkisini belirlemek oldukça zordur. Örnek olarak, A üreticisi tarafından üretilen örneklerde tüm enjeksiyon portları aynı ebatta olmasına rağmen toksisiteyi saklama zamanı ile doğru orantılı olmamıştır. İnfüzyon setlerinin toksisitesi üzerinde depolama şartlarının etkisini göstermek için A firmasından alınan belirli bir lot üzerinde ileri derecede degradasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Beklenmedik bir şekilde, sıcaklık artışı ile örneklerin toksisitelerinde azalma gerçekleştirmiştir. Bu verinin doğrultusunda, bazı toksik bileşiklerin sızdığı veya parçalanarak toksisitesini yitirdiği düşünülmüştür. Belirli saklama koşullarında infüzyon setlerinin depolanma sürecinde daha düşük kinetiğe rağmen aynı prosesin gerçekleşmesi makul görünmektedir.

İnfüzyon setlerinin üretimi sırasında kauçuk materyallerinin bileşimindeki farklılıklar ve depolama esnasında kauçuk bileşiminde meydana gelen değişikliklerin her ikisi de bu çalışmadaki örneklerin karşılaştırmalı toksisiteyi üzerinde etkili gibi görünmektedir. Örneklerden salınan toksik sızıntıların her birinin belirlenmesi ve total örnek toksisitesine katkılarının belirlenmesi için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır. Bunun için infüzyon set sızıntıları ve fraksiyonlarının analizi çoklu kütle spektrumlu sıvı veya gaz kromatografisi gibi komplike analitik yöntemlerle ölçülmelidir (Fekete ve diğ, 2014; Jenke ve diğ, 2013; Schumacher ve diğ, 2007). Gelecekte, toksik sızıntıların başarılı şekilde tespiti infüzyon setlerindeki ve diğer tıbbi sarf malzemelerdeki toksik sızıntıların maksimum izin verilebilir düzeyleri için eşik değerlerinin belirlenmesini sağlayarak hastalarda kullanıma bağlı toksisitenin azaltılmasını sağlayacaktır.

Tez çalışmasında incelenen parçaların sızıntı kimyasalların elde edilmesi için serum setlerinden alınan örnekler hücrelerin büyütülmesi sırasında kullanılacak olan besiyeri ortamına konularak 72 saat bekletilmiştir. Sitotoksosite testleri için RPMI-1640 besiyeri içerisine sadece %1 antibiyotik eklenmiş, serum veya herhangi bir başka ilave kimyasal içermeyen ortam kullanılmıştır. Mikroçekirdek testi için hazır besiyeri ortamı (Chromosome medium-B) kullanılmıştır. Bu ortam normal besiyeri ortamına ilave olarak sadece periferik kan kültürü sırasında T-lenfositlerinin proliferasyonunu uyarıcı etki gösterecek olan fitohemaglutinin maddesini içermektedir. Çalışma planlanırken serum proteinlerinin protein korona olarak adlandırılan etkileşimlere sebep olabileceği düşünülerek katılmamıştır. Literatürde sızıntı kimyasalların elde edildiği ortam bileşenlerinin ve özellikle ortamdaki serum içeriğinin in vitro toksisite testlerinin sonuçlarını etkileyebileceği de belirtilmektedir. Özellikle, yüksek miktarda serum hidrofobik sızıntıların ekstraksiyonunu arttırarak, tek kullanımlık sarf malzeme sızıntılarının geçişini arttırmaktadır. Diğer taraftan, yüksek miktarda serum içeren ortamlarda hücrelerin inkübasyonu sızıntıların toksisitesini maskeleyerek hücre canlılığını kolaylaştırabilir. Hortum ve damla odasındaki sızıntıların %10 FBS ortamında, serum olmayan ortama göre belirgin şekilde daha toksik olduğu görülmüştür. Böylelikle, toksik sızıntıların daha fazla ekstrakte edilebilirliğinin bu deneysel yöntemde serumun maskeliyici etkisinden daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Çalışılan örneklerde ölçülen in vitro toksisite düzeyi deneyde kullanılan hücre türünden de oldukça yüksek düzeyde etkilenmektedir.

Bu tez çalışmasında sitotoksosite testleri L929 fare fibroblast hücrelerinde, mikroçekirdek testi ise insan periferik kan kültüründe lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Kozlovskaya ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada üç farklı hücre hattı kullanılmış, cEND hücrelerinin bEnd ve L-929 hücrelerine göre toksik sızıntılara karşı daha hassas oldukları görülmüştür. Toksik bileşiklerin hücreler arasındaki bu farklılıklara neyin sebep olduğu bilinmemektedir. Çalışmamızda L-929 hücreleri düzenleyici kuruluşlar tarafından önerilen sitotoksosite testlerinde ve biyouyumluluk testler protokollerinde tercih edilmelerinin yanı sıra, toksiste testleri için belirli şartlar altında (belirli hücre kültür ortamı ve yaygın doku kültür ekipmanlarını kullanarak) kolay ve hızlı şekilde büyümeleri nedeniyle seçilmiştir. L-929 hücreleri, adheran özellik gösteren fibroblast karakterde hücreler olduğundan

kullanımları esnasında deri, kan ve vücut sıvıları ile temas eden tıbbi sarf malzemelerinin toksisite testleri için uygun olabilecekleri düşünülmektedir. Ancak, infüzyon setlerinden sızan kimyasallar in vivo çalışmalarda birçok farklı hücre tipi (kapiller endotel hücreleri, kan dolaşımındaki diğer hücreler-akyuvar veya eritrosit gibi hücreler) ile etkileşimdedir. Kozlovskaya ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada etkisi araştırılan örneklerin karşılaştırmalı toksisitesinin değerlendirilmesi için cEND ve bEnd olmak üzere iki farklı kapiller endotel hücresi kullanılmıştır. Bu hücrelerden elde edilen hücre hatları kan dolaşımında mevcut olup setlerin in vitro toksisite testlerinde kullanımı için uygundur. Kauçuk kısımdan gelen sızıntılar ve hortum ve damla odasından alınan bazı örneklerde yukarıda bahsedilen hücre hatlarında indüklenen belirgin toksik etki gözlenmiştir. Bunun yanı sıra diğer sarf malzemeler veya diğer kimyasal bileşiklerin in vitro toksisitesinin değerlendirilmesinde de bu hücre hatları uygun olabileceği bildirilmiştir (Korhonen ve diğ, 1991; Mueller ve diğ, 2009; Pick ve diğ, 2004; Talja ve diğ, 1985). Kozlovskaya ve arkadaşları ilerleyen dönemki çalışmalarında çalışılan örnekler ve hücre hatlarındaki toksisitenin korelasyonu için in vivo çalışmalara geçeceklerini bildirmişleridir. Sitotoksosite ve genotoksosite çalışmalarında in vitro testler ilk basamak ve ön biyogösterge çalışmalar olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında da serum setlerinden sızan kimyasalların etkilerinin daha detaylı araştırılması için in vivo testlerin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda belirlenen toksisite düzeyinin çalışılan hücreler, hücrelerin büyütüldüğü besiyeri bileşenleri, maruziyet süresi ve toksisite değerlendirilmesi için analiz yöntemi gibi faktörlerden etkilendiği bildirilmektedir. Bahsedilen çalışmada araştırmacılar cEND veya bEnd kapiller endotel hücrelerinin kullanımını tavsiye etmektedirler. Bununla birlikte tıbbi sarf malzemelerin in vitro toksisite değerlendirmeleri için MTT testinin yeterince güvenli olmadığını, yanıltıcı sonuçlar verebileceğini ifade etmişlerdir. Bu tez çalışmasında serum setlerinin sitotoksosite analizleri için NKA ve MTT testi olmak üzere iki ayrı sitotoksosite testi yapılarak sonuçlar kıyaslanmış ve tek kullanımlık tıbbi sarf malzemelerin in vitro toksisite değerlendirmeleri için NKA testinin MTT testine kıyasla çok daha tutarlı sonuçlar verdiği görülmüştür. İn vitro toksisite analiz yöntemleri (MTT test, mikroskop bazlı analizler vb.) farklı düzenleyici kuruluşlar tarafından uyumlaştırılmış değildir.

Gelişigüzel toksik sızıntılarla set maruziyeti özellikle tıbbi sarf malzemelerin klinik kullanım sırasındaki şartları (L-929 hücreleri, 24 saatlik maruziyet periyodu, ekstraksiyon ortamının bileşimi) yansıtmamaktadır. MTT testinin de, belirtildiği gibi medikal ürünler için çok uygun olmadığı, yanıltıcı ve yanlış sonuçlar verebildiği düşünülmektedir. NKA testi ve NBİ sonuçlarına göre hücre canlılığı azalmakla birlikte MTT testinde toksik etkinin olmadığı, negatif kontrole kıyasla sızıntı kimyasallarına maruz kalan hücrelerde hücre canlılığında artış gibi sonuçlar elde edilmiştir. Mikroskop bazlı analizler ve nötral kırmızı testi daha uyumlu sonuçlar vermiş olup, tek kullanımlık tıbbi sarf malzemelerin in vitro toksisite çalışmalarında kullanımının önerilmesini destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.

Diğer yandan MTT testinde mitokondriyal aktivitenin yani metabolik aktivitenin ölçümü baz alınmaktadır. Lizozomal aktivitenin ölçümü prensibine dayanan Nötral Kırmızı Alım yönteminde ise, hücre canlılığı MTT'den farklı bir mekanizma ile gösterilmektedir. Ortamdaki kimyasal malzeme ekstraktının hücre membranı ile etkileşebileceği veya membranı geçerek hücre içerisine girebileceği ve organellerde ve sitoplazmada birikerek toksik etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında serum setlerinden sızan kimyasalların genotoksik etkileri insan lenfositlerinde mikroçekirdek testi ile de araştırılmıştır. Mikroçekirdek frekansındaki artışlar sızıntı kimyasallarının DNA'da doğrudan klastojenik hasara ya da hücre bölünmeleri sırasında anöjenik hasara neden olabileceği yönünde sonuçları da desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında farklı markalara ait tek kullanımlık serum infüzyon setlerinin hat kısımlarından alınan örneklerden hazırlanan 72 saatlik sızıntı kimyasallarının memeli hücreleri üzerinde sitotoksisite ve genotoksisite açısından olası etkilerinin vitro şartlarda araştırılması hedeflenmiştir. Sitotoksisitenin belirlenmesi amacıyla L929 fare fibroblast hücrelerinde nötral kırmızı alım testi ve MTT testi, genotoksisitenin belirlenmesi amacıyla insan periferik kan lenfosit hücrelerinde sitokinezi blok tekniği ile mikroçekirdek testi yapılmıştır. Deneylelerden elde edilen sonuçlar tüm setlerin hücre canlılığında azalmaya, mikroçekirdek frekanslarında ise genel olarak artışlara sebep olduğunugöstermiştir. Nükleer bölünme indeksleri ise bazı örneklerde artmıştır.

Tez çalışması için temin edilen, 13 farklı marka serum infüzyon setinin ambalajlarında içeriklerine ait detaylı bilgiler yer almamaktadır. Bu tez çalışmasının hedeflerinden birisi de hastanelerde kullanılan ve piyasada satışı yapılan farklı marka ürünlerin toksik etkileri açısından kıyaslanmasıdır.

Etik açıdan ticari amaçla faaliyet gösteren firmalara tarafından satışa sunulan farklı markaların adları tez içeriğinde belirtilmemiştir. Bu ürünlerin firma bilgileri listelenerek tüm setlere bir örnek numarası verilmiştir. 1-13 numara ile kodlanan bu setlerden alınan eşit uzunluktaki numuneler tamamen aynı şartlarda ve eş zamanlı olarak sitotoksisite ve genotoksisite deneylerinde kullanılmıştır. Yapılan deneylerde mikroçekirdek testinde görsel bir skorlama yapıldığı için hazırlanan preparatlarda örnek adları kapatılarak kör skorlama yapılmış, negatif ve pozitif kontroller ve setler arasındaki kıyaslamalar sonradan yapılmıştır. Bu tez çalışmasındaki deneyler yalnızca in vitro şartlarda gerçekleştirilmiştir. Daha anlamlı ve net sonuçlar için farklı genetik testlerin yanı sıra in vivo çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Tezde serum infüzyon setlerinin 72 saat süresince oluşan sızıntıları hücre kültürlerinde 24 saatlik bir maruziyette sitotoksik etkileri açısından araştırılmıştır. NKA ve MTT

testlerinin yanı sıra farklı sitotoksisite testleri ile daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte hem sızıntıların elde edilmesi aşamasındaki çalışma koşulları (sıcaklık ve basınç gibi) daha da sertleştirilerek ve farklı sürelerdeki sızıntılar elde edilerek hem de sızıntıları içeren ortam hücrelerle 48, 72, 96 saat gibi farklı sürelerde etkileşime bırakılarak daha farklı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Mikroçekerdek testinde kan hücreleri sızıntı kimyasallarını içeren ortama ekilerek test protokolünde önerildiği şekilde 3 hücre bölünmesi hedefi ile 72 saatlik kültür uygulanmıştır. Comet testi gibi farklı maruziyet sürelerinin etkilerinin araştırılabileceği genotoksisite testleri ile de bu etkilerin karşılaştırmalı olarak araştırılabileceği düşünülmektedir.

Serum setlerinin rutin uygulamalarda en fazla 72 saat vücut ile temasta kaldığı göz önüne alındığında çalışmamızda 72 saat etkileşimde meydana gelen sızıntıların test edilmesi sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi için yeterli bir süredir. Ancak toksisite akut ve kronik olarak incelenmeli, tekrarlı maruziyetlerin etkisi başka çalışma planları ile araştırılmalıdır.

Bu tez çalışmasında serum infüzyon setlerinin karşılaştırmalı olarak sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Tez kapsamında setlere ait malzeme bileşenlerinin analizi yapılmamıştır. Literatürde sızıntı kimyasalların genel olarak DEHP başta olmak üzere ftalat benzeri plastikleştirici kimyasallardan kaynaklandığı bildirilmektedir. Toksikiteye neden olan faktörün tespiti için malzeme bileşenlerinin de analiz edildiği çalışmalarla toksisite mekanizmaları ayrıntılı olarak aydınlatılabilir. Setlere ait her bir kısımdan kaynaklanan toksik sızıntıların neler olduğunun belirlenmesive klinik kullanım sırasındaki toksisite risklerinin ortaya konulması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, sağlık uygulamalarında yoğun şekilde kullanılan bir tıbbi malzeme olan serum setlerinin kısa süreli infüzyonlarda zayıf sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle kısa süreli infüzyonlar için DEHP gibi sızıntı kimyasallarının hasta açısından meydana getireceği riski bilmek adına çalışmamız bilimsel alanın yanı sıra tıp pratiğinde de önemli bir sorunun cevabına katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Ath-Şekeroğlu, Z., & Şekeroğlu, V.** (2011). Genetik toksisite testleri. *Tüfav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Barsan, W., Hedges, J., & Nishiyama, H.** (1986). Differences in drug delivery with peripheral and central venous injections: normal perfusion. *Am J Emerg Med*, 4:1-3.
- Bernard, L., Décaudin, B., Lecoeur, M., Richard, D., Bourdeaux, D., Cuff, R., Study, A.** (2014). Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices : A review. *Talanta*, 129, 39–54.
- Bernard, L., Cuff, R., Breysse, C., Décaudin, B., & Sautou, V.** (2015). Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int. J. of Pharm*, 485(1–2), 341–347.
- Boccaccio, G., & Boccaccio, G.** (2019). Chapter 22. *In L'Ameto* (pp. 285–297).
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Fenech, M.** (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625–631.
- Bonnie L. Kaplan, Shan W. Liu, ve R. D. Z.** (2007). Peripheral Intravenous Access. *Vasc Tech Vol Supp*, 21, 394-404.
- Bourdeaux D, Sautou-Miranda V, Bagel-Boithias S, Boyer A, Chopineau J.**(2004). Analysis by liquid chromatography and infra- red spectrometry of di(2-ethylhexyl) phthalate released by multilayer infusion tubing. *J. Pharm. Biomed.*; 35: 57–64
- BPSA Extractables and Leachables Subcommittee, BioProcess Int.** 2007, 5 (11), 36.
- Calò, E., Greco, A., & Maffezzoli, A.** (2011). Effects of diffusion of a naturally-derived plasticizer from soft PVC. *Polym. Degrad. Stab.*, 784-789.
- Choy, W.** (2001). *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York: CRC Press.
- Cormio, L., Turjanmaa, K., Andersson L.C., & Ruutu, M.** (1993). Toxicity and immediate allergenicity of latex gloves. *Clin. Exp. Allergy*, 23, 618-623.
- Countryman, P., & Heddle, J.** (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res*, 41(2-3), 321-332.
- Dakwar, G. R., Kaplun, V., Kojukarov, L., Gorenbein, P., Schumacher, I.,Kontorovich, D., Stepensky, D.** (2012). Toxicity assessment of extracts from infusion sets in cEND brain endothelial cells. *Int. J. Pharm*, 434(1–2), 20–27.
- Ding, W.** (2013). Determination of Extractables and Leachables from Single-Use Systems, *Chem. Ing. Tech.* (1), 186–196.
- Durmaz, E., & Özmert, E.** (2010). Fitalatlar ve Çocuk Sağlığı. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53(4): 305-17.
- European Union. (2008).** Regulation (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and

mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006.

European Union (2011), Commission Regulation (EU) N° 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Special edition in Croatian: Chapter 13 Volume 045 P. 42 - 130

Farr, A. (1980). The first human blood transfusion. *Med Hist*, 24:143-162.

Feigal, D. (2002). PVC Devices Containing the Plasticizer DEHP. US Food and Drug Administration.

Fekete, Z., Rofusz, T., Angyal, V., Szabo-Revesz, P., Aigner, Z., (2014). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis and subsequent quality improvement of plastic infusion packaging materials. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 97,

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res*, 455(1-2), 81-95.

Fimognari, C., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P. (2005). Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res*, 582(1), 1-10.

Fotakis, G., Timbrell, J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett*, 160(2), 171-177.

French, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

Gausche, M., Tadeo, R., & Zane, M. (1998). Out-of-hospital intravenous access: unnecessary procedures and excessive cost. *Acad Emerg Med*, 878-882.

Hadaway, L. (2007). Intermittent intravenous administration sets: Survey of current practices. *JAVA*, 12(3), 143–147.

Hauser, R., & Calafat, A. (2005). Phthalate and human health. *Occup. Environ. Med.*, 62(11), 806-18.

Hedges, J., Barsan, W., & Doan, L. (1984). Central versus peripheral intravenous routes in cardiopulmonary resuscitation. *Am J Emerg Med*, 385-390.

Herr, R., & Swanson, T. (1992). Pseudometabolic acidosis caused by underfill of Vacutainer tubes. *Ann Emerg Med*, 21:17-180.

Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 210, 623-634.

Himberger, J., & Himberger, L. (2001). Accuracy of drawing blood through infusing intravenous lines. *Heart Lung*, 30, 66-73.

Infusion Nursing Standards of Practice. (2006). Infusion Nurses Society

Jaakkola, J., & Knight, T. (2008). The Role of Exposure to Phthalates from Polyvinyl Chloride Products in the Development of Astma and Allergies: A Systematic Review and Meta Analysis. *Environ. Health Perspect*, 116(7), 845-53.

Jenke, D., Story, J., & Lalani, R. (2006). Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing. *Int. J. Pharm*, 315, 75–92.

Jenke, D. (2007). Evaluation of the Chemical Compatibility of Plastic Contact Materials and Pharmaceutical Products; Safety Considerations Related to Extractables and Leachables. *J. Pharm*, 96(10), 2566–2581.

Jenke, D., Castner, J., Egert, T., Feinberg, T., Hendricker, A., Houston, C., Hunt, D.G., Lynch, M., Shaw, A., Nicholas, K., Norwood, D.L., Paskiet, D., Ruberto, M., Smith, E. J., Holcomb, F.,(2013). Extractables characterization for five materials of construction representative of packaging systems used for parenteral and ophthalmic drug products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 67, 448-511.

Jones, S., Nesper, T., & Alcouloumre, E. (1989). Prehospital intravenous line placement: a prospective study. *Ann Emerg Med*, 244:246.

Kastner, J., Cooper, D., Maric, M., Dodd, P., & Yargeau, V. (2012). Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and green plasticizers from poly(vinyl chloride). *Sci. Total Environ.*, 432, 357–364.

Kimber, I., & Dearman, R. (2010). An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicol. Rev*, 73-82.

Komissarova, E., Saha, S., & Rossman, T. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol. Appl. Pharm*, 202(1), 99-107.

Korhonen, P., Talja, M., Ruutu, M., Andersson, L.C., Alfthan, O.,(1991). Comparison of two different cell culture methods in evaluation of biocompatibility of latex urinary catheters. *Urol. Res.* 19, 127–130

Kostic, I., Andjelkovic, T., Andjelkovic, D., Cvetkovic, T., & Pavlovic, D. (2016). Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in plastic medical devices. *Hemijaska Industrija.*, 70(2), 159–164.

Kozlovskaya, L., Popilski, H., Gorenbein, P., & Stepensky, D. (2015). In vitro toxicity of infusion sets depends on their composition, storage time and storage conditions. *Int J Pharm*, 489(1–2), 285–293.

Kozlovskaya, L., & Stepensky, D. (2015). Mechanisms of cell death induced by infusion sets leachables in in vitro experimental settings. *Int J Pharm.*, 478(2), 693–701

Kuzma, K., Sporer, K., & Michael, G. (2009). When are prehospital intravenous catheters used for treatment? *J Emerg Med*, 36, 357-362.

Latini, G., Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., & Ruggieri, F. (2003). In Utero Exposure to Di (2-ethylhexyl) phtalate and Duration of Human Pregnancy. *Environ Health Perspect.*, 111(14), 1783-5.

Lawrence, D., & Lauro, A. (1988). Complications from i.v. therapy: results from field started and emergency department started i.v's compared. *Ann Emerg Med.*, 17, 314:317.

Loff S, Kabs F, Subotic U, Schaible T, Reinecke F, Langbein M. (2002) Kinetics of diethylhexyl- phthalate extraction From polyvinylchloride-infusion lines. *J Parenter Enteral Nutr* ; 26, 305-9

- Lyche, J., Gutleb, A., A.Bergman, Eriksen, G., Ropstadle, A., Saunders, M., & Skaare, J.** (2009).). Reproductive and Developmental Toxicity of Phthalates. *Toxicol Environ Health*, Part B, 12:225-249.
- Maki, D., Botticelli, J., LeRoy, M., & Thielke, T.** (1987). Prospective study of replacing administration sets for intravenous therapy at 48 vs 72 hour intervals. 72 hours is safe and cost- effective. *JAMA*, 258:1777-1781.
- McGrew, R., & McGrew, M.** (1985). *Encyclopedia of medical history*. New York: McGraw-Hill.
- Meier, P., Frederickson, M., & Catney, M.** (1988). Impact of a dedicated intravenous therapy team on nosocomial bloodstream infection rates. *Am J Infect Control*, 158;473:477.
- Melo, P.S., de Medeiros Cavalcante, H.M., Barbosa-Filho, J.M., de Fátima Formiga Melo Diniz, M., de Medeiros, I.A., Haun, M.** (2003). Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicol Lett.*, 142 (1-2), 143-151.
- Mueller, R., Karle, A., Vogt, A., Kropshofer, H., Ross, A., Maeder, K., Mahler, H.C.** (2009). Evaluation of the immuno-stimulatory potential of stopper extractables and leachables by using dendritic cells as readout. *J. Pharm. Sci.* 98, 3548–3561
- O'Grady, N., Alexander, M., & Dellinger, E.** (2002). Guideline for the prevention of intravascular catheter-related infections. *MMWR*, 51(RR10):1-26.
- Paskiet, D., Jenke, D., Ball, D., Houston, C., & Norwood, D.** (2013). The Product Quality Research Institute (PQRI) leachables and extractables working group initiatives for parenteral and ophthalmic drug product (PODP). *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 430-447.
- Paulsen, A., & Ruskin, K.** (2019). Intravenous infusion devices for perioperative use. *UptoDate*: Erişim Tarihi: Ekim, 2019
- Pick, N., Cameron, S., Arad, D., Av-Gay, Y.,**(2004). Screening of compounds toxicity against human monocytic cell line-THP-1 by flow cytometry. *Biol. Proced. Online* 6, 220–225
- Putnam, K., Bombick, D., Doolittle, D.** (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in vitro, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (5), 599-607.
- Raad, I., Hanna, H., & Awad, A.** (2001). Optimal frequency of changing intravenous administration sets: is it safe to prolong use beyond 72 hours? *Infect Control Hosp Epidemiol*, 22, 136-139.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J.** (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1311.
- Sağlık Bakanlığı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği** (2011), Resmi Gazete, 27957, 07.06.2011
- Rickard, C., Lipman, J., Courtney, M., Siversen, R., & Daley, P.** (2004). Routine changing of intravenous administration sets does not reduce colonization or infection in central venous catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25, 650-655.

Rose RJ, Priston MJ, Rigby-Jones AE, J. R. JR.(2012) The effect of temperature on di(2-ethylhexyl) phthalate leaching from PVC infusion sets exposed to lipid emulsions. *Anaesthesia*; 67, 514–520.

Sastri, V. R. (2013). *Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements, and Applications: Second Edition. Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements, and Applications: Second Edition.* Elsevier

SCENIHR. (2015). Scientific Opinion on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk.

Schumacher, I., Tsiperman, E., Tarnopolsky, A., Raskin, A., Domb, A., 2007. Quality and stability evaluation of disposable medical equipment. *Polym. Adv. Technol.* 18, 207-212.

Schwarzman, P., & Rottman, S. (1987). Prehospital use of heparin locks: a cost-effective method for intravenous access. *Am J Emerg Med*, 5:475-477.

Selander, D., Dhuner, K., & Lundborg, G. (1977). Peripheral nerve injury due to injection needles used for regional anesthesia. An experimental study of the acute effects of needle point trauma. *Acta Anaesthesiol*, 21:182-188.

Sharma, K. L. (2015). Biomaterial&Biocompatibility Testing Laboratory. *World Health Organization India.*

Simon, A., Fleischhack, G., & Wiszniewsky, G. (2006). Influence of prolonged use of intravenous administration sets in paediatric cancer patients on CVAD-related bloodstream infection rates and hospital resources. *Infection*, 34, 258-263.

Soifer, N., Borzak, S., & Edlin, B. (1998). Prevention of peripheral venous catheter complications with an intravenous therapy team: a randomized. *Arch Intern Med*, 58, 473–477.

Stovroff, M., & Teague, W. (1998). Intravenous access in infants and children. *Pediatr Clin North Am*, 45, 1373-1393.

Talja, M., Andersson, L.C., Ruutu, M., Alfthan, O., (1985). Toxicity testing of urinary catheters. *Br. J. Urol.* 57, 579–584

Taner, G (2015). *Doğal Ürünlerde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Genotoksik veAntigenotoksik Etkileri*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Tercan, F. (2006). Venöz kateterizasyon için girişim yolları ve kateter tipleri. Türk Hematoloji Derneği, Hematoloji Pratiğinde Uygulamalı Kateterizasyon Kursu, 2006, 16-22.

Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 731. Springer

Van Vliet, E. D. S., Reitano, E. M., Chhabra, J. S., Bergen, G. P., & Whyatt, R. M. (2011). A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol*, 31(8), 551–560.

Weinstein, S. (2006). *Plumer's principles and practice of intravenous therapy* (8 b.). Philadelphia: Lippincott.

Welle, F., Wolz, G., & Franz, R. (2005). Migration of plasticisers from PVC-tubes into enteral feeding solutions. *Pharma Int.*, 17-21.

Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J.Pharm*, 288 (2), 369-376.

Wilkes, C., Daniels, C., & Summers, J. (2005). *PVC Handbook*. 173-193: Hanser.

Wirnitzer, U., Rickenbacher, U., Katerkamp, A., & Schachtrupp, A. (2011). Systemic toxicity of di-2- ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. *Toxicol. Lett*, 10;205(1):8-14.

Yano, C., & Marcondes, M. (2006). Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radic Biol Med*, 1378-1284.



ÖZGEÇMİŞ

TARANMIŞ
VESİKALIK
FOTOĞRAF

Ad-Soyad : Ayşegül ÖZLÜ
Doğum Tarihi ve Yeri : 1988, Artvin
E-posta : akilicel@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık
- **Yüksek Lisans** :2019, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Farmasyon Eğitim ve Danışmanlık, Danışman Eczacı, 2012-2013
- Bursa Şevket Yılmaz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Eczacı, 2013-2014
- Bursa Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği, Mali Uzman, 2015-2017
- Bursa SBÜ Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2018-Devam