
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

BİYOLOJİKLERDE VE BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERDE ALTERNATİF TEST YAKLAŞIMI OLARAK *İN VİTRO* PİROJENİTE TEST UYGULAMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Meltem DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Meltem DOĞAN

25/01/2023

BİYOLOJİKLERDE VE BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERDE ALTERNATİF TEST YAKLAŞIMI OLARAK *İN VİTRO* PİROJENİTE TEST UYGULAMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Meltem DOĞAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Vücuda alınması ile bağışıklık sistemini uyararak ateş yükselmesine sebep olan pirojenler, bakteriler (gram negatif ve gram pozitif), hücre, virüs, mantar, plastik, adjuvan, küf, hücre, protein, doku, gen kaynaklı tedavi ürünleri, hava ve üretim kaynaklı olabilmektedir. Aşı, antiserum, kan ürünleri gibi biyolojik ürünler kullanıma girmeden önce pirojenite testinden geçmek zorundadır. Son gelişmelerle, vücut içi kullanılan tıbbi cihazlarda da pirojenite testleri zorunlu hale gelmiştir. Günümüze kadar *in vivo* tavşan pirojenite testi (RPT), bütün regülasyon otoriteleri tarafından pirojen tayininde geçerli yöntem olarak kullanılmış hala da kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntem endotoksin kaynaklı pirojenleri RPT belirleyememektedir. Ayrıca, deney hayvanları ile ilgili 3R kuralı olan yerine koyma (Replacement), azaltma (Reduction) ve iyileştirme (Refinement) ile şekillenen test yaklaşımlarının kullanımı regülasyon otoriteleri için öncelikli olmuştur. Pirojen tayininde Monosit Aktivasyon Testi (MAT), deney hayvansız bir alternatif yöntem olarak valide edilmiştir. Test, Avrupa İlaç Otoritesi (EMA) ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Otoritesi (FDA) rehberlerine ve farmakopelere girmiştir. Hollanda, Almanya, İngiltere, İtalya, İsviçre gibi Avrupa Ülkelerinin bazılarında ve ABD, Rusya, Çin, Hindistan, Brezilya'da da kullanımı kabul edilmektedir. MAT ülkemizde izlenen kılavuz ve farmakopelerde de yer almaktadır. Ancak, Avrupa regülasyonlarını izleyen ülkemiz sağlık otoriteleri, biyolojik ürünlerde pirojen tayini için *in vivo* testleri kullanmaya devam etmektedir. Çalışmamıza, endotoksin kaynaklı pirojenleri de belirleyebilen MAT'ı, apirojen olarak piyasada bulunan biyolojik ürünleri temsil eden aşı, antiserum, biyobenzer örnek ve bir tıbbi cihaz olan vajinal ovül için ülkemizde ilk kez uygulanmıştır. Sonuçlarımıza göre, çalışılan piyasadaki ürünlerin MAT ile apirojen olduğu onaylanmıştır. Ancak apirojen olduğu bilgisi ile kullanımda olan vajinal ovülde endotoksin kaynaklı pirojen varlığı MAT ile saptanmıştır. Pirojen tayininde *in vivo* olarak kullanılan RPT'nin deney hayvanı kullanımına bağlı maliyeti (deney hayvanı gerekliliği, beslenme, barınma, sağlık kontrolleri, veteriner hekim zorunluluğu vb.), test hata payının yüksek olması, test tekrarlarında yeniden hayvan kullanımı gerekliliği, test için ayrılan zaman ve emeğin yoğun olması ve endotoksin kaynaklı pirojenleri belirleyememesi gibi durumlar söz konusudur. Araştırmamız, güncel bir başlıkta ilk kullanım özelliği taşımaktadır. Etkili ve seçici olduğu gösterilen MAT'nin, ülkemizde de kullanımına başlanması önerilmektedir. Araştırıcıların, MAT'yi ülkemizde de yerli olarak üretmek ile ilgili de hedefleri bulunmaktadır.

Bilim Kodu : 1021
Anahtar Kelimeler : Alternatif test, *In vitro* test, LAL, MAT, Pirojenite,
Sayfa Adedi : 74
Danışman : Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK

IN VITRO PYROGENICITY TEST APPLICATIONS AND EVALUATIONS AS ONE OF THE ALTERNATIVE TEST APPROACHES ON BIOLOGICS AND BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS

(M.Sc. Thesis)

Meltem DOĞAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

Pyrogens, which cause fever by stimulating the immune system when taken into the body, can be caused by bacteria (gram negative and gram positive), cell, virus, fungus, plastic, adjuvant, mold, protein, tissue, gene-based treatment products, air and production. Biological products such as vaccines, antiserum and blood products must pass the pyrogenicity test before they can be used. With recent developments, pyrogenicity tests have become mandatory for medical devices used inside the body. Until today, the *in vivo* rabbit pyrogenicity test (RPT) has been used by all regulatory authorities as the valid method for pyrogen determination and is still in use. However, the RPT method cannot detect endotoxin-derived pyrogens. In addition, the use of test approaches shaped by the 3R rule of replacement, reduction and refinement, which is the 3R rule for experimental animals, has been a priority for regulatory authorities. The Monocyte Activation Assay (MAT) for pyrogen determination has been validated as an alternative method without experimental animals. The test has entered European Medicines Authority (EMA) and United States Food and Drug Authority (FDA) guidelines and pharmacopoeias. Its use is accepted in some European Countries such as the Netherlands, Germany, England, Italy, Switzerland, and in the USA, Russia, China, India, Brazil. MAT is also included in the guidelines and pharmacopeias followed in our country. However, our country's health authorities that follow European regulations continue to use *in vivo* tests for pyrogen determination in biological products. In our study, MAT, which can also detect endotoxin-derived pyrogens, has been applied for the first time in our country for a vaccine, antiserum, a biosimilar sample and a medical device such as a vaginal insert, all of the mentioned representing nonpyrogenic biological products available in the market. According to our results, the products in the studied market were confirmed to be nonpyrogenic by MAT. However, MAT detected the presence of endotoxin-induced pyrogen in the vaginal insert known and used as being nonpyrogenic. The cost of RPT, used *in vivo* in pyrogen determination, related to the use of experimental animals (the need of an experimental animal, its nutrition, shelter and health controls, veterinary obligation etc.), high margin of test error, necessity of re-using animals in test repetitions, time and effort intensiveness allocated for the test and the failure to detect endotoxin-induced pyrogens are in question. Our research has the feature of being the first use in the current field. It is recommended that MAT, which has been shown to be effective and selective, should be used in our country as well. Researchers also have goals to produce MAT as a local product in in our country.

Science Code : 1021
Key words : Alternative test, *In vitro* test, LAL, MAT, Pyrogenicity
Page Number : 74
Supervisor : Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda desteğini, emeğini ve tecrübelerini esirgemeyen, bilgimin sınırlarını zorlamam için bana ilham veren, fikirlerime değer verip merakıma yön veren, güzel kalbi ile hep halimden anlayan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum saygıdeğer kıymetli hocam Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK'a teşekkürlerimi ve minnetimi sunarım.

Akademik eğitimin süresince en faydalı şekilde yetişmem için değerli katkılarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sema BURGAZ, Prof. Dr. İsmet ÇOK, Prof. Dr. Bensu KARAHALİL, Prof. Dr. Ela KADIOĞLU ve Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN'e,

Tez çalışmam ve emek verdiğim pek çok çalışmada bana yoldaşlık eden, uçtuğumda ayağımı yere bastıran, düştüğümde kaldıran, kan bağım olmasa da can bağım olan pırlanta kardeşim Esra ÜSTÜNYAĞIZ'a,

Bana inanmaktan hiç vazgeçmeyen, her zaman arkamda güçlü bir dağ gibi duran, şefkatlerini esirgemeyen canım annem Meliha DOĞAN, canım babam Bünyamin DOĞAN ve kahramanım abim Satılmış DOĞAN'a ve arkadaşlarıma tüm içtenliğimle sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimi; iyikim, yaşamımı aydınlatan ışığım, gözlerimin içini güldüren, canım kızım Ada'ya ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Pirojen Nedir? 5

2.2. Pirojenlerin Etki Mekanizması 6

2.3. Biyolojik Ürünler ve Pirojen İçerikleri 8

2.3.1. Aşılar 8

2.3.2. Biyobenzerler 9

2.3.3. Antiserumlar 9

2.3.4. Kan ve kan ürünleri 10

2.3.5. Vücut içi tıbbi cihazlar 10

2.4. Biyolojik Ürünlerin Yasal Düzenlemeleri 11

2.4.1. Alternatif yöntemler 12

2.4.2. Alternatif yöntemleri valide eden kuruluşlar ve biyolojiklerle ilgili gelişmeler 13

2.5. Biyolojik Ürünlerin Yasal Düzenlemesinde Kullanılan Pirojenite Testleri 14

2.5.1. *In vivo* pirojenite testleri 16

2.5.2. *In vitro* testler 19

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM 25

3.1. *In Vitro* Pirojenite Testi olan Monosit Aktivasyon Testinin Gerçekleştirilecek Örneklerin Toplanması 25

3.1.1. Deneysel yöntem için kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler 25

3.1.2. Kullanılan cihazlar 26

3.2. Monosit Aktivasyon Testi İçin Kullanılan Kit 27

3.3. ELIZA Yöntemi ile Numunelerde Pirojen Tayininin İlkesi 27

3.3.1. Monosit aktivasyon test kiti için hücrelerin ve çözeltilerinin hazırlanması 29

3.4. Monosit Aktivasyon Testinin Biyolojik Örneklere ve Tip II Tıbbi Cihaza Uygulanışı 31

3.4.1. Hücrelerin örneklerle inkübasyonu ve ELIZA protokolü 31

3.5. ELIZA Metod Validasyonu 43

3.6. Validasyon Parametreleri 43

3.6.1. Özgünlük (specifity) 43

3.6.2. Doğrusallık (linearity) ve ölçüm aralığı (measurement range) 44

3.6.3. Doğruluk (accuracy) 44

3.6.4. Kesinlik (precision)-tekrarlanabilirlik 45

3.7. İstatistiksel Analiz 45

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 47

4.1. Hücre Çoğaltma ve Pasajlama Sonuçları 47

4.2. Numunelerde Projenite Tayini 47

4.2.1. Monosit Aktivasyon Test sonuçları 47

4.3. Monosit Aktivasyon Testi Validasyon Sonuçları 50

4.3.1. Özgünlük kabul kriteri 50

4.3.2. Doğrusallık (linearity) ve ölçüm aralığı (measurement range) kabul kriteri 51

4.3.3. Doğruluk (accuracy) kabul kriteri 51

Sayfa

4.3.4. Kesinlik (precision)-tekrarlanabilirlik kabul kriterleri 52

5. TARTIŞMA 53

6. SONUÇLAR 61

KAYNAKLAR 63

ÖZGEÇMİŞ 73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Endotoksin olmayan ve ekzojen pirojen kaynakları 6

Çizelge 2.2. Pirojen testlerine genel bakış 16

Çizelge 2.3. Avrupa Farmakopesi Monograf 2.6.8 Tavşan Pirojenite Testi deney hayvan sayıları ve sonuçların değerlendirme kriterleri 17

Çizelge 2.4. Monosit Aktivasyon Testinin ECVAM ve ICVAM'da geçerlenme bilgileri 22

Çizelge 2.5. Pirojen testlerinin uluslararası regülasyonlardaki tarihçesi ve Monosit Aktivasyon Testine yaklaşımları 23

Çizelge 3.1. PeliKine Compact® System/ Sanquin ticari kit içeriği 29

Çizelge 3.2. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri ve referans standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki uygulama 33

Çizelge 3.3. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri ve referans standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki uygulama 34

Çizelge 3.4. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri için konsantrasyon hesaplamaları 40

Çizelge 3.5. Biyolojik örnekler ve tıbbi cihaz örneği ve standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki absorbans ölçümleri 41

Çizelge 3.6. Biyolojik örnekler ve tıbbi cihaz örneği ve standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki absorbans ölçümleri 42

Çizelge 4.1. Biyolojik ürün numunesi, tıbbi cihaz ürün numunesi, standart numunelerin pirojen konsantrasyonu 49

Çizelge 4.2. Numuneler ve % geri kazanılan miktarları 52

Çizelge 5.1. Monosit Aktivasyon Testinin kullanıldığı biyolojik ürünler ve tıbbi cihazlar 58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Pirojenlerin etki mekanizması. 7

Şekil 2.2. Pirojenlerin etki mekanizmasında TLR sinyal yolağı 8

Şekil 2.3. Tıbbi cihaz etiketlerinde pirojen içermediği imleği 11

Şekil 2.4. Pirojenite test yöntemlerinin tarihsel akışı 12

Şekil 2.5. Pirojenite Test yöntemleri 15

Şekil 2.6. Limulus Amebozit Lizat Testi etki mekanizması (A), Limulus Amebozit Lizat Testi değerlendirmesi 19

Şekil 2.7. Rekombinant Faktör-C mekanizması (Rekombinant Faktör-C tek bileşenli, tek basamaklı, hassas ve spesifik bir endotoksin miktar tayini yöntemidir ... 20

Şekil 2.8. Monosit Aktivasyon Testi mekanizması 21

Şekil 4.1. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen IL-6 Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi 48

Şekil 4.2. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen Pirojen Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi 48

Şekil 4.3. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen Pirojen Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi 49

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. ELIZA Okuyucu 28

Resim 3.2. ELIZA Okuyucuda 450 nm dalga boyu ayarlanması 28

Resim 3.3. Monosit aktivasyon test malzemeleri 29

Resim 4.1. Örnek PMBC hücreleri A.(10. gün), B. (30. gün) 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
″	Saniye
%	Yüzde
°C	Santigrat
Da	Dalton
IU	İnternational ünite
µl	Mikrolitre
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
Pg	Pikogram

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGAATI	İmmünobiyolojiklerdeki Hayvan Testlerine Alternatifler Danışma Grubu
BET	Bakteriyel Endotoksin Testi
CP	Çin Farmakopesi
DAMP	Tehlike İlişkili Moleküler Modeller
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECHA	Avrupa Kimyasallar Ajansı
ECVAM	Avrupa Alternatif Yöntemler için Validasyon Merkezi
EDQM	Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELIZA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı

Kısaltmalar	Açıklama
EP	Avrupa Farmakopesi
ESAC	Avrupa Bilimsel Danışma Kurulu
EURL ECVAM	Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatifler Referans Laboratuvarı
F(ab')	Fragman Antikor
GMP	İyi üretim Uygulamaları
HRP	Horse Radish Peroksidaz
ICATM	Uluslararası Alternatif Test Yöntemleri İşbirliği
ICCVAM	Amerika Birleşik Devletleri Alternatif Yöntemleri Validasyon için Otoriteler Arası Koordinasyon Komitesi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
IFN-1β	Interferon 1 Beta
IFN-g	Interferon
IL-1	Interlökin-1
IL-6	Interlökin-6
IL-8	Interlökin-8
IP	Hindistan Farmakopesi
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
IVIG	İntravenöz İmmünglobulin
JACVAM	Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması için Japon Merkezi
JP	Japon Farmakopesi
JRC	Ortak Araştırma Merkezi
KOCVAM	Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması için Kore Merkezi
LAL	Limulus Amebosit Lizat
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik asit
MAT	Monosit Aktivasyon Testi
MyD88	Miyeloid Farklılaşma Birincil Yanıtı 88
NEP	Endotoksin Olmayan Pirojenler
NIBSC	Ulusal Biyolojik Standartlar Kontrolü Enstitüsü
NICEATM	Ulusal Toksikoloji Programı Kurumlar Arası Alternatif Toksikolojik Yöntemlerin Değerlendirilmesi Merkezi
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü

Kısaltmalar	Açıklama
PAMP	Patojen İlişkili Mikrobiyal Modeller
PEI	Paul Ehrlich Enstitüsü
PMBC	İnsan Periferal Mononüklear Kan Hücresi
POCT	Hasta Başı Cihazları
PRR	Örgü Tanıma Reseptörleri
rFC	Rekombinant Faktör C
RIVM	Ulusal Sağlık ve Çevre Kamu Enstitüsü
RPT	Tavşan Pirojen Testi
TEYDEB	Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı
TFA	Türk Farmakopesi
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör
TSAR	Düzenleyici Kabule Yönelik Alternatif Yöntemler İçin İzleme Sistemi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
USP	Amerika Farmakopesi

1. GİRİŞ

Pirojenler, ‘ateş yapan’ anlamına gelmekte olup endojen (endotoksin pirojenler, endotoksin olmayan pirojenler) ve ekzojen pirojenler olarak gruplandırılmaktadır. Endojen pirojenler ekzojen pirojenlerle temas ettiğinde, ekzojen pirojenler ise Toll Benzeri Reseptörler (Toll Like Receptor; TLR) tarafından tanındıktan sonra Interlökin-6 (IL-6) salınımına yol açarlar (Sandle, 2016). Pirojenler biyolojik kökenli maddelerdir. Pirojenler, hayatı tehdit eden sistemik inflamasyonu tetikleyebilmekte ve bu durum septik şok ile sonuçlanabilmektedir.

Biyolojik ürünler (FDA, 2015) yani tıbbi biyolojikler (EMA, 2012) hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır ve aşılar, anti-serumlar, kan ve kan ürünleri gibi biyolojiklerden elde edilen ürünlerdir. Parenteral uygulanan tıbbi biyolojikler ve vücutta kalan tıbbi cihazlar piyasaya sunulmadan önce biyolojikten ya da üretim basamaklarından gelebilecek pirojenlerin yokluğunun belirlenmesi ve pirojenik reaksiyon oluşturmadığının kanıtlanması için akut toksisite (EDQM, 2019) kategorisinde yer alan pirojenite testi ile test edilmeleri zorunludur (Gupta, R. K., Gupta, C. K., Mallet, L., 2015; S., Spreitzer, I., Löschner, B., Hoffmann, S., Hennes, K., Halder, M., Montag, T., 2006). Pirojenite testi, iyi üretim uygulamaları (cGMP) (PIC/S, 2019) kritik kalite niteliklerinden de (ICH Q6B’ Spesifications: Test Proceduresand Acceptance Criteria for Biotechnolohical/Biologic Products’) biridir.

Pirojenite testi olarak kullanılan *in vivo* Tavşan Pirojen Testi (RPT), 1912 yılında geliştirilmeye başlanmış ve 1942 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Farmakopesinde (USP<151> Pyrogen Test) yayımlanmıştır. *In vivo* RPT, 2000’li yılların başına kadar Avrupa Birliği ve ABD farmakopeleri monograflarında (EP 2.6.8 pyrogenicity testing ve USP <151> pyrogen test) yer almıştır. Günümüzde, deney hayvanı kullanımı ile ilgili etik kaygıları gidermek üzere geliştirilmiş ‘alternatif yöntem’ yaklaşımında ‘’3R Kuralı’’ olarak adlandırılan; yerine koyma (Replacement), azaltma (Reduction) ve iyileştirme (Refinement) ilkesi benimsenmiştir (Russell ve Burch, 1959) ve bu ilkelere “sorumluluk” (Responsibility) ilkesi de eklenerek 4R kavramı oluşmuştur. Sorumluluk ilkesi, deney hayvanı kullanımı yerine geçebilecek bir *in vitro* yöntem söz konusuysa göz önünde bulundurulup konuya dikkat çekilmesi ve ilgili otoritelerin farkındalığının artırılması ile ilgilidir (2010/63/EU, 2021).

Regülasyon otoriteleri, ilaç da dahil olmak üzere pek çok etkenin yasal düzenlemelerinde, doğru, tekrarlanabilir sonuç elde edilen, alternatifi olduğu *in vivo* testin yerini tutabileceği kanıtlanmış testleri, deney hayvanı kullanılan testler yerine kılavuzlarına almakta ve tercih etmektedir.

In vivo RPT için de alternatif yöntem olarak *in vitro* MAT, Avrupa Alternatif Yöntemler için Validasyon Merkezi (European Centre for the Validation of Alternative Methods; ECVAM) ve ABD Alternatif Yöntemleri Validasyon için Otoriteler Arası Koordinasyon Komitesi (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; ICCVAM) tarafından valide edilmek üzere 2000'li yıllarda ele alınmıştır. Şu anda MAT, Avrupa Farmakopesinde (EP 2.6.30 Monocyt Activation Test) ve ABD Farmakopesinde (USP <151> pyrogen test) yer almaktadır. Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü (European Directorate fort the Quality of Medicines and Healthcare; EDQM), tamamen Monosit Aktivasyon Testine geçiş için 2021 yılının Haziran ayından itibaren 5 yıl süre tanıdığını tüm paydaşlarına bildirmiştir (https://www.edqm.eu/en/-/european-pharmacopoeia-to-put-an-end-to-the-rabbit-pyrogen-test). Başta Amerika, Hollanda, Almanya, Brezilya, İngiltere, İtalya, İsviçre, Japonya, Çin, Hindistan, Rusya olmak üzere pek çok ülke MAT'yi uygulamaya almışlardır. Amerika, Japonya ve Çin tam validasyon yaparak MAT için rutin test tanımlaması yapmışlardır. Avrupa ülkeleri, Hindistan ve Rusya ise ürüne spesifik validasyon yaparak rutin test olarak kullanıma almışlardır (https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/products/industrial-microbiology/pyrogen-testing,2022).

Benzer biçimde vücut içine uygulanan tıbbi cihazlar (Sınıf II ve Sınıf III) için de cihazın biyouyumluluğu açısından olası pirojenite varlığının saptanması ilk olarak 2017 yılında zorunlu tutulmuş ve MAT önerilmiştir (ISO 10993-11, 2017).

Alternatif test olan MAT'nin çalışma ilkesi (E.P. 2.6.10), *in vivo* RPT ile karşılaştırıldığında daha hızlı sonuç vermesi, acil durum kullanımı gerektiren başta aşı ve antiserum ürünleri olmak üzere hayati öneme sahip ürünlerde kullanıma sunum öncesi kalite kontrol analiz süresini kısaltması ve daha az emek, para harcanması gibi avantajlara sahiptir (https://www.sanquin.org/products-and-services/monocyte-activation-test/regulations). En önemlisi de pirojenite testi için deney hayvanlarının kullanımını ortadan kaldırma avantajı vardır.

Ülkemizdeki sağlık otoriteleri kalite kontrol analizleri, ürünlerin ruhsatlandırılması kapsamında Avrupa Birliği regülasyonlarını takip etmektedir. Dolayısıyla, pirojenite testi ile ilgili Avrupa Farmakopesindeki güncellemeler, Türk Farmakopesine uyarlanmıştır (Türk Farmakopesi 2017;T.C. Sağlık Bakanlığı), ancak henüz uygulanmamaktadır.

Çalışmamız, MAT'nin, apirojen olduğu RPT ile kanıtlanmış, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından ruhsatlanmış ve acil kullanım onayıyla ticari olarak piyasaya çokmış biyolojik ürünlerde (intravenöz immunglobulin, Covid-19 aşısı, akrep antiserumu, iki adet biyobenzer ilaç) ve ayrıca Tip II vücut içi tıbbi cihazda pirojenite tayini için kullanılması ve doğrulanmasıdır. Amacımız, elde edilen sonuçlara göre çeşitli biyolojik ürünlerde ülkemizde de bu testin sağlık otoritelerince kullanımı ve uygulamaya geçmesinin önerilebilirliğinin değerlendirilmesidir. Yaklaşımımız, bu alternatif yöntemin ülkemizde ilk kullanımında ilk olacaktır. Elde edeceğimiz verilerden ulaşacağımız sonuçların, Ulusal yasal düzenlemelerin, Uluslararası düzenlemelerle paralel ilerlemesine önemli katkı sağlamasını hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pirojen Nedir?

Pirojen, vücut ısısında artış meydana getiren maddeler demektir. Monositler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonunda ateş yükselmesini tetikleyen beyaz kan hücreleridir. Sitokinler gibi endojen pirojenlerin üretimi yoluyla bir bağışıklık tepkisini aktive eden Örgü Tanıma Reseptörleri (PRR) adı verilen hücre yüzeyi reseptörleri sayesinde antijenleri tanırlar. Sitokinlerin hipotalamusta sıcaklık regülasyonu üzerinde doğrudan etkisi vardır. Toll Benzeri Reseptörler: pirojenleri tanıyan monosit PRR'ler, mikrobiyal patojenler tarafından ifade edilen Patojen İlişkili Mikrobiyal Modeller (PAMP) tarafından nekrotik ya da ölmekte olan hücrelerden salınan endojen moleküller olan Tehlike İlişkili Moleküler Modeller (DAMP) olarak bilinen yüksek düzeyde korunmuş yapısal motifleri tanırlar. Mikrobiyal patojenlerin PRR'ler tarafından tanınması, inflamasyon gibi doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin başlatılması için gerekli bir adımdır. Pirojenler, monositler tarafından eksprese edilen TLR'ler adı verilen spesifik bir PRR tipi tarafından tanınır. TLR'ler tanımlanan ilk PRR'lerdir. İnsanlara pirojen içeriği taşıyan biyolojik ürünlerin patenteral olarak uygulanışından 15 dakika ile 8 saate kadar zaman diliminde sıcaklık, nabızda artış, üşüme, titreme, baş ağrısı, kusma ve damar içi pıhtılaşma görülebilmektedir (Stang, K., Fennrich, S., Krajewski, S., Stoppelkamp, S., Burgener, I. A., Wendel, H. P., Post, M., 2014). Pirojenler, mikroorganizmaların metabolik ürünleridir. Kimyasal olarak bunlar, genellikle bir polisakkarit olan taşıyıcı molekül ile ilişkili lipid yapısındadırlar. Pirojenler; Lipopolisakkaritler (LPS), lipoteikoik asit (LTA), ekzotoksinler, muramildipeptitler, peptidoglikanlar, stabilitelerinden kaynaklı olarak insan sağlığına tehdit olabilen mikroorganizmalardan türeyen, insan ve hayvanlarda vücut ateşini arttırıcı etki yapan maddeler olarak sıralanabilir (Altex, 1999; Utescher, C. L. D. A., Buosi, K. L., Botosso, V. F., Quintilio, W., 2018). En güçlü pirojenler, gram negatif bakterilerin hücre duvarlarından üretilen LPS yapıdaki endotoksinler olarak bilinir. Genel olarak pirojenler, yüksek moleküler ağırlığa sahiptir, genellikle molekül ağırlıkları 1.000.000 Dalton'dan fazladır (Sandle, 2016).

Pirojenler; ekzojen pirojenler ve endojen pirojenler olarak iki grupta incelenir (Dinarello, 2004; Sandle, 2016). Endojen pirojenler endotoksinler (gram negatif bakterilerden kaynaklanan) ve endotoksin olmayan pirojenler (NEP) olarak gruplandırılır (Dinarello,

1978; Rockel ve Hartung, 2012). Doku hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkan endojen pirojenler, direkt olarak hipotalamusa etki ederek ateş yükselmesine sebep olurlar (Ankem, 2014). Ekzojen pirojenler ise vücuda dışarıdan alınan pirojen kaynaklarıdır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Endotoksin olmayan ve ekzojen pirojen kaynakları (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005)

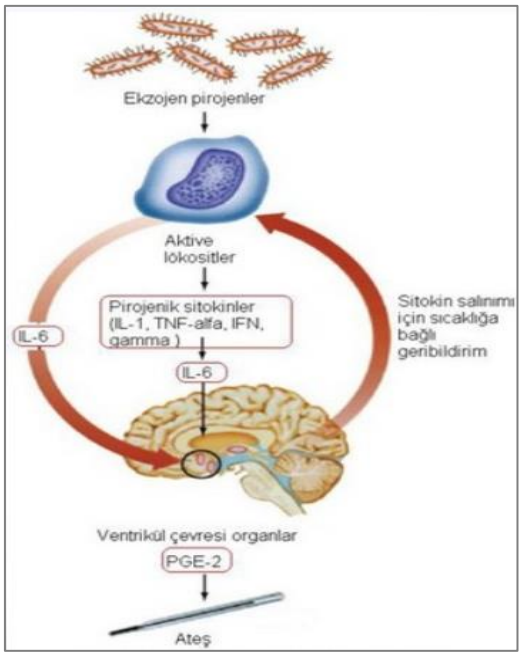
Endotoksin Olmayan Pirojen Kaynakları	Ekzojen Pirojen Kaynakları
Peptidoglikanlar (Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı)	Lipoarabinomannas (Mikobakteri)
DNA (Bakteriyel)	Mannanlar, Glukanlar, , Mannoproteinler (Mantar bileşenleri)
Porinler (Bakteri hücre duvarındaki proteinler)	Fosfoinositol (Parazit bileşeni)
Muramilpeptidler (MDP ve diğer petidoglikan alt birimleri endotoksinlerle sinerji oluşturur)	Virüsler – Havadaki tozlar
Lipoteikoik asit (Gram pozitif bakteri hücre duvarı bileşenleri)	Mikrobiyolojik Olmayanlar (Besiyeri, hücre, sitokinler, ara ürünler)
Süper antijenler (T lenfositlerini uyaran endojen protein ve mikroorganizma toksinleri)	Katı malzemeler (Plastik, tıbbi cihaz)
Bakteri yüzey proteinleri	İlaç kökenli (steroidler, tuzlar, dapsonlar,)

2.2. Pirojenlerin Etki Mekanizması

Pirojenik bir madde kan dolaşımına girdiğinde, doğuştan gelen bağışıklığı uyarır ve bu da ateşi indükleyen sitokinlerin salgılanmasına yol açar. Salgılanan başlıca stokinler, organizmanın termoregülatör merkezinde görev yapan IL-6, Interlökin-1β (IL-1β), Interlökin-8 (IL-8), Interlökin-12 (IL-12), Tümör Nekrozis Faktörü- α (TNF-α) ve Interferon (IFN-g)'dur (Schindler ve diğerleri 2006; Utescher ve diğerleri, 2018).

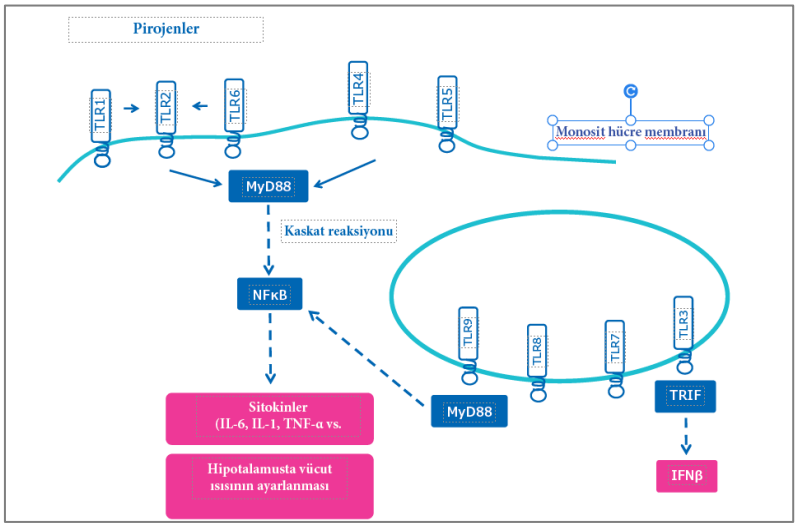
Ekzojen pirojenler, TLR tarafından tanınarak sinyal iletimi ile sitokin salınımına yol açarlar (Şekil 2.1). Endojen pirojenlerin mekanizması ise; vücuda alınan ekzojen pirojenlerle temas ettiği zaman üretilen IL-6 ile ateş yükselmesi tepkisine yol açmalarıdır (Casanova ve diğerleri, 2011).

Pirojenler yaşamı tehdit eden sistemik enflamasyonu tetikleyebilmekte ve septik şok ile sonuçlanabilmektedir (Schindler ve diğerleri, 2007). Dolayısıyla, biyolojik ürünler ve kullanımına göre vücutta kalan tıbbi cihazlar dahil olmak üzere insan vücuduna alınan herhangi bir biyolojik ürün ve vücut içi tıbbi cihazın, piyasaya sunulmadan önce bu tür pirojenlerden arındırılmış olduğunun belirlenmesi için pirojenite testi yapılmak zorundadır.



Şekil 2.1. Pirojenlerin etki mekanizması (http://www.drinh.com/e-ders-ates-nba.html).

Pirojenler, bağışıklık sistemini uyararak, bakteri zarına bağlanan lipidik kısım, MyD88 proteini ile bir kompleks verir ve LPS'nin antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki Toll Benzeri Reseptör-4 (TLR4)'e bağlanmasına izin verir (Şekil 2.2). Bu sabitleme, adaptif (sonradan kazanılmış) bağışıklık tepkisi oluşturmak için gerekli olan sitokinlerin salgılanmasıyla doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarır (Sanders, 2013). Otoimmün hastalıklarda ateş çoğunlukla sitokin aracılıdır, enfeksiyon sırasında ise hem sitokin hem de TLR ateş yükselmesinden sorumludur (Dinarello, 2004; Netea, M. G., Kullberg, B. J., Van der Meer, J. W., 2000).



Şekil 2.2. Pirojenlerin etki mekanizmasında TLR sinyal yolağı (Millipore, 2017)

2.3. Biyolojik Ürünler ve Pirojen İçerikleri

Biyolojik ürünler; bir hastalığın önlenmesi ya da tedavi edilmesi amacıyla uygulanabilen toksin, virüs, aşı, kan ve kan bileşenleri, alerjik ürünler, rekombinant DNA teknolojisi (rekombinant DNA molekülü oluşturabilmek için bir gen parçasının klonlanması ve klonlanan genden proteinin ekspresyonu işlemi) ile üretilenler, gen tedavisi gibi ileri tedavi grubu ürünlerdir. Bunlar; hücre, bitki, mikroorganizma ve immünoglobülin kaynaklı büyük yapılı protein ürünleridir. Avrupa İlaç Otoritesi olan EMA, biyolojik tıbbi ürünler için 'biyolojik ürün' genel adını kullanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri FDA ise 'biyolojik tıbbi ürün' adını kullanmaktadır (EMA, 2015). Biyolojik ürünlerin çoğunluğu parenteral uygulama yoluna sahiptir. Ülkemizde ise, biyolojik ürün, etkin madde ya da maddeleri biyolojik bir kaynakta üretilen ya da biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan, kalitesi, üretim süreci ve kontrolleri fizikokimyasal ve biyolojik testler ile birlikte gösterilen beşeri tıbbi ürün olarak tanımlanmakta olup (Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği, 2005), isimlendirme olarak da biyolojik tıbbi ürün ifadesi kullanılmaktadır. Tezde, biyolojik ürün ifadesi kullanılacaktır. Aşağıda, tez çalışmamızda da kullandığımız pirojen içerebilecek ürünlere yer verilmiştir.

2.3.1. Aşılar

Aşı, insan ve hayvanlarda hastalık yapma yeteneğinde olan virüs, bakteri vb. mikroorganizmaların hastalık yapma özelliklerinden arındırılarak ya da salgıladıkları toksinlerin etkileri ortadan kaldırılarak geliştirilen biyolojik ürünlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre aşı: belirli bir hastalığa karşı bağışıklığı arttıran biyolojik ürünlerdir (WHO, 2023). Aşılar, enfekte edici ajana ya da toksine ya da bunlarla ilişkili antijene karşı insanlarda spesifik ve aktif immünite indükleme özelliğine sahip antijenik maddeler içeren ürünlerdir (Avrupa Farmakopesi,2017).

Hazırlanma yöntemlerine göre ve içeriklerine göre aşılar; klasik aşılar ve biyoteknolojik aşılar olmak üzere 2 kısımda incelenir. Klasik aşılar; canlı aşılar (enfeksiyon oluşturma ve çoğalma yeteneğine sahip canlı organizmalardan hazırlanır), atenüe aşılar (canlı olup da, ısı, kimyasal ya da diğer yöntemlerle virulansları ve çoğalma yetenekleri azaltılmış

organizmalardan oluşan aşılardır), ölü aşılar (inaktif aşılar, fiziksel ya da kimyasal işleme tabi tutulan ölü organizmaları içerir), toksin aşıları (toksoidler, bazı bakterilerin salgıladığı ve enfeksiyona neden olan kimyasal ya da ısı işlemi ile inaktive edilmesi sonucunda elde edilen ölü mikroorganizma ya da mikroorganizma bileşenleridir), subunit aşılar (tüm organizmayı içermeyen fakat parçalanmış ya da eriyen mikroorganizmalardan oluşan aşılardır) olarak sınıflandırılmaktadır. Biyoteknolojik aşılar ise; rekombinant aşılar (belli genlerin ortadan kaldırılması ile virülans ve/veya üremeleri bozulmuş organizmaların yaratılmasına olanak veren moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak hazırlanan aşılardır), DNA aşıları (çeşitli mikroorganizmaların antijenik özellikteki proteinlerini kodlayan genlerin, plazmit DNA vektörlerine klonlanması ile elde edilir) olarak sınıflandırılmıştır (Kallarup ve Foged, 2015; https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/41/asi-turleri.html, 2023)

Aşılardaki pirojen kaynakları, bileşiminde yer alan adjuvanlar, koruyucular, sentetik lipopeptitler gibi ürüne özgü olan pirojenler ile üretim basamaklarında kullanılan malzeme, ekipmanlardan ve üretim alanından kaynaklı pirojenlerdir (ECVAM, 2002). (ECVAM 2006)

2.3.2. Biyobenzerler

Biyobenzerler, biyolojik referans ürün (dünyada pazara ilk defa sunulmak üzere ruhsatlandırılmıs/izin verilmiş, etkin madde/maddeler açısından bilimsel olarak kabul edilebilir etkinlik, kalite ve güvenliğe sahip olduğu kanıtlanmış) ile aynı hastalığın tedavisi için kullanılan, referans ürünle aynı etkin madde, aynı kullanım yolu ve aynı dozu içeren ürünlerdir (EMA,2011,2012; Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği,2005). Ülkemizde biyobenzer tıbbi ürün tanımı olarak; ruhsatlı bir biyolojik referans tıbbi ürüne yüksek düzeyde benzerlik gösteren ürün olarak kullanılmaktadır (Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği, 2005).

2.3.3. Antiserumlar

Antiserum, küçük miktarda toksinin bir hayvana enjekte edilmesi ile üretilen toksine karşı hayvanın bağışıklık sistemi tarafından oluşturulan antikorlardır ve hayvanın kanı alınarak üretilirler (Hendriksen, 2002). Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliğinde antiserum; hayvanların (tavşan, at, sığır ve benzeri) kanından elde edilen ve insan immün sistemi üzerinde etki gösteren immünglobulin yapısındaki ürünler olarak tanımlanmaktadır

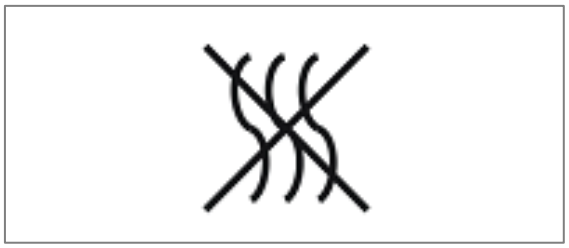
ve antitoksin olarak ifade edilmektedir. (Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği, 2015). Antiserumlar, aşılanmış hayvanlarda (at ve sığır gibi) üretilen saflaştırılmış spesifik fragman antikor (F(ab')2) parçalarından oluşan önemli bir biyolojik ürün sınıfıdır. Antiserumların pirojen kaynakları arasında; üretim sürecinde protein çökelmeleri ile kontaminasyon ve bu yüksek protein konsantrasyonundan dolayı mikrobiyal moleküller yer almaktadır (Schindler ve diğerleri, 2006).

2.3.4. Kan ve kan ürünleri

Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliğinde kan ürünleri; insan kanından ya da plazmasından ticari yöntemlerle kamu ya da özel kurumlar tarafından sağlanan ve özellikle immünoglobulin, koagülasyon faktörleri ve albumin gibi ürünleri içeren kan bileşenlerinden oluşan tıbbi ürünlerdir (Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği, 2015). Biyolojik ürünler grubunda yer alan kan ve kan ürünlerinin doğal yoldan bulaşıcı ajan riski taşıması olasılıdır ve bu riskin minimize edilmesi için kalite kontrol testleri hem üretici firma tarafından hem de sağlık otoriteleri tarafından daha sıklıkla yapılmaktadır (FDA, 2015).

2.3.5. Vücut içi tıbbi cihazlar

İnsan üzerinde endikasyon belirterek kullanılan, bir teşhis ya da tedavinin parçası olarak kullanıldıkları bölgelerde etkilerini mekanik ya da fiziksel olarak gösteren ürünler tıbbi cihaz olarak değerlendirilmektedir. Cihazların yapısı ve kullanım amacı gereği içerdiği riskler göz önünde bulundurulduğunda; vücuda yerleştirilebilir aktif cihazlar; Sınıf I Diğer (düşük riskli cihazlar), Sınıf I Steril/Ölçme (düşük riskli ölçme fonksiyonu olan steril cihazlar), Sınıf IIa – Sınıf IIb (orta riskli cihazlar) ve Sınıf III (vücuda yerleştirilebilir yüksek riskli ilaçlar) şeklinde sınıflandırılır. Vücut dışında kullanılan tıbbi tanı cihazları kapsamında; A Listesi, B Listesi, Hasta başı cihazları (Point of Care Test (POCT) ve Diğerleri olarak gruplandırılmaktadır (Tıbbi Cihaz Yönetmeliği, 2021). Tıbbi cihazların yüzeyindeki pirojenik kontaminantlar genellikle çözünmezler. Vücut içi kullanım için Sınıf III sınıfında üretilen tıbbi cihazlar apirojen özellikte olmalıdır (EDQM, 2014). Pirojen içermeyen tıbbi cihaz ambalajlarında Şekil 2.3’teki imlek yer almalıdır (Türk Farmakope Dergisi, 2018).



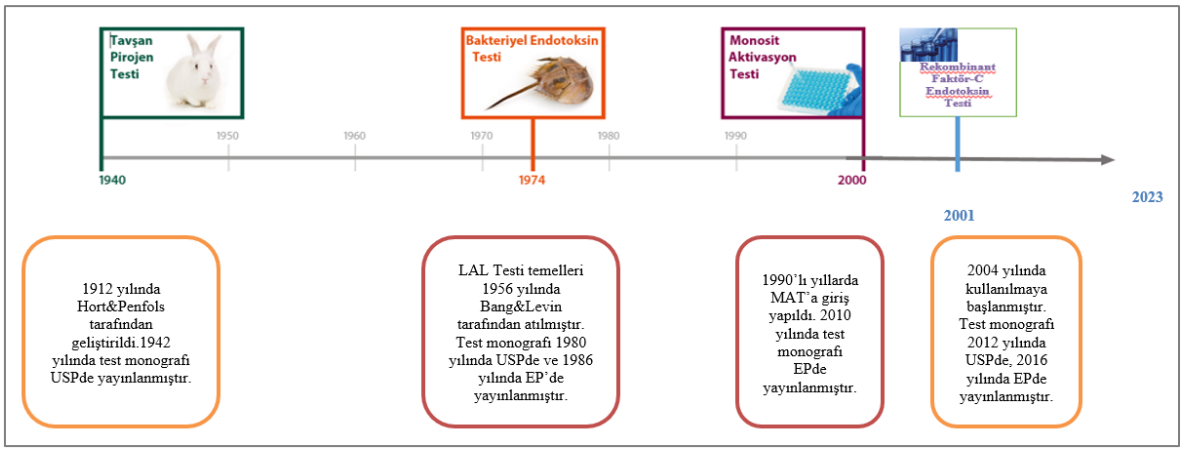
Şekil 2.3. Tıbbi cihaz etiketlerinde pirojen içermediği imleği (Türk Farmakope Dergisi, 2018)

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'na bağlı olarak yer olan Analiz ve Kontrol Laboratuvarları; ilaç, bitkisel ilaç, biyolojik ürünler, biyoteknolojik ürünler, kozmetik ürünler, tıbbi cihaz, tıbbi enteral beslenme ürünleri, hemodiyaliz suları ve kaçak/sahte şüphesi ile piyasan incelenmesi gereken tüm sağlık ürünlerinin ulusal ve uluslararası standartlar doğrultusunda bilimsel temelli testlerinin gerçekleştirildiği akredite (https://www.titck.gov.tr/haber/titck-laboratuvarlari-uluslararasi-arenada-7122018173225,) Uluslararası Tanınırlığa sahip Ulusal Referans Laboratuvarlarıdır (https://www.titck.gov.tr/faaliyetalanlari/laboratuvar/laboratuvar-hakkinda). Ülkemizde kullanıma sunulmadan önce ilgili biyolojik ürünlerin, tıbbi cihazlar da dahil tüm sağlık ürünlerinin kalite kontrol testlerinden onay alma zorunluluğu bulunmaktadır.

2.4. Biyolojik Ürünlerin Yasal Düzenlemeleri

Pirojenlerin biyolojik ürünlerde belirlenmesi için kullanılan testlerin amacı, üründe canlılarda kullanım öncesi ateşe ve ciddi sağlık sorunlarına neden olabilecek maddelerin olup olmadığını belirlemek için üreticiler tarafından ürettikleri biyolojik ürünlerde kritik kalite kontrolü gerçekleştirmeleri, böylece güvenli ürünü piyasaya çıkarabilmeleridir. Steril parenteral ürünlerin ve tıbbi cihazların pirojen içeriğinin test edilmesini bir kalite kontrol önlemi olarak zorunlu kılan Uluslararası otorite kaynakları arasında Avrupa Farmakopesi, Avrupa GMP Rehberi (Steril Ürünlerin İmalatı-Annex 1), USP, Endüstri için FDA Rehberi bulunmaktadır. Ayrıca, düzenleyici otoriteler, tıbbi cihazların ISO 10993-11:2020 rehberi uyarınca malzeme kaynaklı pirojenite için test edilmesini istemektedir (https://www.ndresearch.net/in-vivo-testler). Kullanılan yöntemler *in vivo* ve *in vitro* olarak iki şekilde uygulanmaktadır. En yaygın ve en eski pirojen testi, 1940'lardan beri kullanılan *in vivo* RPT'dir. Bunun dışında, yalnızca endotoksin pirojenleri tespit eden Bakteriyel Endotoksin Testler (BET); *in vivo* Limulus Amebosit Lizat (LAL), *in vitro* Rekombinant Faktör-C (rFC) Testidir. Hem endotoksin hem de endotoksin olmayan pirojenleri belirleyen

in vivo RPT ve *in vitro* MAT bulunmaktadır (E.P.2.6.14; USP <85>; E.P.2.6.8; E.P.2.6.30). *In vivo* ve *in vitro* olarak pirojenite testlerinin uygulama ilkeleri aşağıda anlatılmıştır. Ülkemizde de TİTCK Analiz ve Kontrol Laboratuvarları ürün türüne göre farklı testler de (sterilite, potens, osmalilete, nem miktarı, termal stabilite testi, bakteriyel endotoksin vb.) talep etmektedir (Türk Farmakopesi, 2017). Pirojen Testlerinin kullanımı ile ilgili tarihçe Şekil 2.4'te yer almaktadır.



Şekil 2.4. Pirojenite test yöntemlerinin tarihsel akışı (solvias.com) kaynağından modifiye edilmiştir.

2.4.1. Alternatif yöntemler

Günümüzde, regülasyonlarda kullanılan *in vivo* testlerin sonuçlarını doğrulayan, tekrarlanabilir olan ve birçok noktada çalışılarak valide eden *in vitro* yöntemler otoriteler tarafından da kabul edilerek regülasyonlarda kullanıma girmektedir. Bu yöntemler alternatif yöntemler olarak adlandırılmaktadır (https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/alternative-method).

Alternatif yöntemlerin gündeme gelmesi ve kullanımlarının yaygınlaşması, Russell ve Burch tarafından 1959'da "İnsani Deney Tekniğinin İlkeleri" (The Principles of Humane Experimental Technique)'nin yayımlanmasından sonra olmuştur. Adı geçen ilkeler; Replacement (yerine koyma; deney hayvanı kullanmadan deneysel yöntemi uygulama), Reduction (azaltma; deney hayvanı kullanılmak zorunda ise olabildiğince ön *in vitro* ya da in siliko yöntemlerle ya da deneysel düzenlemelerle kullanılması gereken deney hayvanı sayısını azaltma), Refinement (iyileştirme; mevzuata uygun olarak deney hayvanlarının deneylerdeki kullanım süreç, koşul ve uygulamalarını iyileştirmek) terimlerinin baş

harfleridir. Yayımladıkları eserle hayvan deneylerinin sorgulanması, deney hayvansız yöntemlerin geliştirilmesi ve kabulü konularında çığır açmışlardır (Russell ve Burch, 1959). Ayrıca, sorumluluk tanımı günümüzde 4. "R" (Responsibility: sorumluluk; deneylerde kullanılan hayvanların değerinin farkındalığında olmak ve hayvansız deneyler yapılabilme hususunda bilinçli olmak) kuralı olarak kabul görmüştür (Franco ve Olsson, 2014).

Ülkemizde, Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik içerisinde 3R ilkesi, "Mümkün olan her koşulda, canlı deney hayvanı kullanımı yerine alternatif olarak bilimsel düzeyde geçerli başka bir deneme stratejisinin uygulaması ya da başka yöntem kullanılması ya da proje hedeflerinden ödün vermeden hayvan sayısının kullanılabilirliğinin mümkün olduğunca azaltılması, hayvanlara eziyet, acı, ıstırap çektirecek ve onlar üzerinde kalıcı hasara sebebiyet verecek prosedürlerin iyileştirilerek hayvan refahının artırılması." olarak tanımlanmıştır (Resmi gazete, 2014).

2.4.2. Alternatif yöntemleri valide eden kuruluşlar ve biyolojiklerle ilgili gelişmeler

Avrupa alternatif yöntemler için validasyon merkezi

Avrupa Alternatif Yöntemler için Validasyon Merkezinin temel amacı, hayvan kullanımını iyileştirebilen ya da azaltabilen biyolojik yaklaşımlar ile hayvanlarının kullanımını azaltmak ve yerine hayvan kullanılmayan yöntemlerin valide edilmesini ve kabulünü teşvik etmektir. Avrupa Birliği, 'bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunması'na ilişkin 2010/63/EU yönetmeliğinde 3R ilkesini benimsemiştir. Yönerge tarafından zorunlu kılındığı üzere bu ilkelerin uygulanmasını; Ortak Araştırma Merkezi (JRC), ve Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatifler Referans Laboratuvarı (EURL ECVAM) ile beraber yürütmektedir. Avrupa Alternatif Yöntemler için Validasyon Merkezinin görevleri; Avrupa Birliği düzeyinde alternatif yaklaşımların onaylanmasının koordinasyonu, alternatif yaklaşımların geliştirilmesi konusunda bilgi alışverişi için bir odak noktası olarak hareket etmek, alternatif yaklaşımların validasyonu ve bunların gelişim durumları hakkında kamuya açık veri tabanlarını ve bilgi sistemlerini sürdürülebilir olarak yönetmek, alternatif yaklaşımların onaylanması ile uluslararası tanınırlığı ve tüm ilgili paydaşlarla (özellikle endüstri çalışanları, bilim insanları) bilgi paylaşımına teşvik etmek görev ve sorumlulukları arasındadır (ECVAM,2022).

Biyolojiklerin üretiminde ve kalite kontrol basamaklarında hayvanların kullanımının azaltılmasına, iyileştirilmesine ve alternatif *in vitro* yöntemler ile değiştirilmesine ilk olarak 1993 yılında Avrupa Bilimsel Danışma Kurulu (ESAC)'nda karar verilmiştir. Nisan 1993 ve Aralık 2001 tarihleri aralığında özellikle alternatif yöntemlerin validasyonu; başta immünobiyolojikler olarak tanımlanan (aşılar, immünserumlar, immünoglobulinler… gibi) ürünler, hormonlar, monoklonal ve poliklonal antikorlarda uygulanmıştır. ECVAM; biyolojiklerdeki alternatif yöntem yaklaşımları için esas olarak Ulusal Sağlık ve Çevre Kamu Enstitüsü ile (National Institute of Public Health and the Environment (RIVM); Bilthoven, Hollanda), Paul Ehrlich Enstitüsü (Paul Ehrlich Institute (PEI); Langen, Almanya), İmmünobiyolojiklerdeki Hayvan Testlerine Alternatifler Danışma Grubu (Advisory Group on Alternatives to Animal Testing in Immunobiologicals (AGAATI); Utrecht, Hollanda), Ulusal Biyolojik Standartlar Kontrolü Enstitüsü (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC); Potters Bar, Herts., BK),ve EDQM (Avrupa Konseyi, Strazburg, Fransa) ile işbirliği yapmıştır (ECVAM,2002).

Alternatif yöntemlerin validasyonuna ilişkin kurumlar arası koordinasyon komitesi

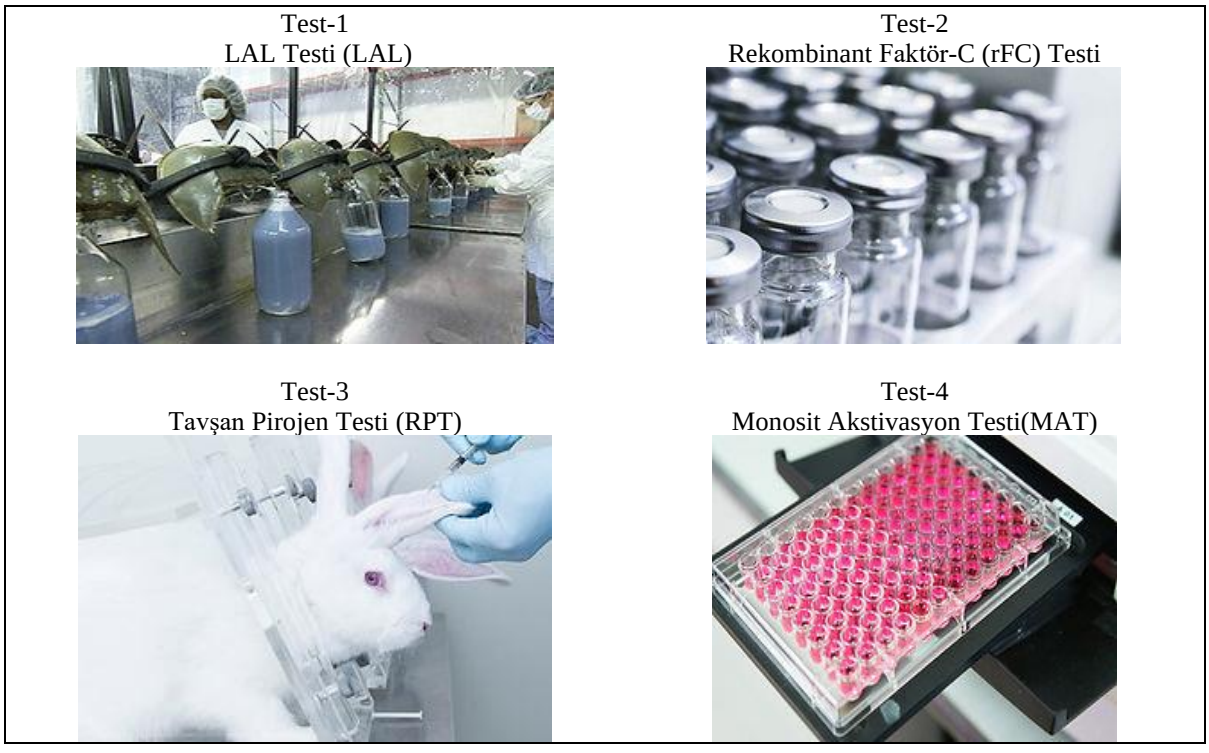
Alternatif Yöntemlerin Validasyonuna İlişkin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi (ICCVAM), ABD Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü (National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS)'nün daimi bir üyesidir. Resmi olarak 2000 yılında kurulan ICCVAM, 17 federal düzenleyici ve araştırma kurumunun temsilcilerinden oluşmaktadır. ICCVAM, Ulusal Toksikoloji Programı Kurumlar Arası Alternatif Toksikolojik Yöntemlerin Değerlendirilmesi Merkezi (NICEATM)'ne bağlıdır. Görevleri arasında; hayvan test yöntemlerinin azaltılmasını, iyileştirilmesini ya da değiştirilmesini teşvik eden alternatif testlerin geliştirilmesini, düzenleyici otoriteler tarafından kabulünü ve kullanımını teşvik eden kurumlar arası ve uluslararası iş birliklerini kolaylaştırmak yer almaktadır. ICCVAM, Uluslararası Alternatif Test Yöntemleri İşbirliği (ICATM) ve Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) Test Yönergeleri Programı ile işbirliği ile çalışmaktadır (https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/iccvam/index.html).

2.5. Biyolojik Ürünlerin Yasal Düzenlemesinde Kullanılan Pirojenite Testleri

Pirojenlerin biyolojik ürünlerde belirlenmesi için kullanılan testlerin amacı, canlılarda kullanım öncesi ateşe ve ciddi sağlık sorunlarına neden olabilecek maddelerin olup

olmadığını belirlemek için üreticiler tarafından ürettikleri biyolojik ürünlerde kritik kalite kontrolü gerçekleştirmeleri, böylece güvenli ürünü piyasaya çıkarabilmeleridir. Steril parenteral ürünlerin pirojenitesini test edilmesini zorunlu kılan uluslararası otoritelerin (EP 2.6.14, USP <85>, EP 2.6.8, EP 2.6.30, EP 2.6.32) yanı sıra, tıbbi cihazların malzeme kaynaklı pirojenitesini belirlemeye yönelik de ISO 10993-11:2020 rehberi bulunmaktadır (https://www.ndresearch.net/in-vivo-testler).

Kullanılan yöntemler (Şekil 2.5.) *in vivo* ve *in vitro* olarak iki şekilde uygulanmaktadır. En yaygın ve en eski pirojen testi, 1940'lardan beri kullanılan *in vivo* RPT'dir. Yalnızca endotoksin pirojenleri tespit eden *in vivo* LAL ve *in vitro* rFC testleridir. Hem endotoksin hem de endotoksin olmayan pirojenleri belirleyen *in vivo* RPT ve *in vitro* MAT bulunmaktadır (EP 2.6.14, USP <85>, EP 2.6.8, EP 2.6.30, EP 2.6.32).



Şekil 2.5. Pirojenite Test yöntemleri (https://www.mat-biotech.com/pyrogen-testing, 2022) kaynağından modifiye edilmiştir

Adı geçen Pirojenite Testlerinin deney hayvanı kullanım özelliklerine ve pirojen saptanan ürün özelliklerine göre karşılaştırma tablosu aşağıda yer almaktadır (Çizelge 2.2.). *In vivo* ve *in vitro* olarak pirojenite testleri ayrıntılı olarak aşağıda anlatılmıştır.

Çizelge 2.2. Pirojen testlerine genel bakış

Özellikler	Bakteriyel Endotoksin Testi		Tavşan Pirojen Testi	Monosit Aktivasyon Testi
	Limulus Amebosit Lizat Testi	Rekombinant Faktör-C Testi		
İnsana Özgü	-	-	-	+
Hayvan Kullanımı	+	-	+	-
Endotoksin Saptanması	+	+	+	+
Endotoksin Olmayan Pirojenlerin Tespiti	-	-	+	+
Ölçülebilir Sonuçlar Sunması	+	+	-	+
Kan Ürünleri	-	-	-	+
Hava Kalitesi	-	-	-	+
Biyolojiklerin Testi	-	-	- (+)	+

2.5.1. *In vivo* pirojenite testleri

In vivo, bir canlı kullanımı ile yapılan tüm deneysel yaklaşımları ifade eder. İlacın geliştirme basamaklarından olan klinik öncesi kısımda, farmakolojik etkilerin tanımlanmasında (örneğin, antihipertansif etki, antipiretik etki, antidepresan etki, antinosiseptif etki ya da antipsikotik benzeri etki,.. vb.), ilaç etkisini gen düzeyinde saptamada *in vivo* deneyler kullanılmaktadır. Ancak, *in vivo* yöntemler uygulanırken karşılaşılan deneysel sorunlar ve etik konular, yaygın kullanımlarını etkileyen faktörler olarak öne çıkmaktadır (ECVAM, 2002).

Tavşan Pirojen Testi

In vivo RPT'nin ilkesi, ateş gelişip gelişmediğini görmek için test maddesinin tavşan kulak damarlarına enjekte edilmesidir. Enjeksiyon sonrası test hayvanlarının rektal sıcaklıkları takip edilir. Hayvanlardaki ateş yükselmesi ortalaması, belirlenen sınırlar içindeyse, test maddesinin pirojen içermediği sonucuna varılır. Bu test yönteminde tavşanlarda ateş, solunum problemleri, dolaşım ve organ yetmezliği ve hatta ölümcül şok gelişebilir (Seibert, 1923). RPT, ilk kullanımı sırasında "endüstri standardı" olarak kabul edilmiştir ve günümüzde dünya çapında yılda yüzbinlerce tavşan RPT için kullanılmaktadır (Hartung, 2015). Yöntemin, regülasyonlarda zorunlu olarak kullanımı 80 yılı aşkın süredir devam etmektedir. *In vivo* RPT, Avrupa Farmakopesinde "Progens" (E.P. 2.6.8), Amerika Farmakopesinde "Pyrogen Test" (USP <151>) ve Türk Farmakopesinde "Pirojenler" (TFA, 2017) tanımlı başlıklar ile yer almaktadır.

Tavşan Pirojen Testinin uygulaması otorite monograflarında detaylı anlatılmıştır. Üç tavşan ile teste başlanmakta, en fazla 12 tavşan kullanılmaktadır (Çizelge 2.3.). Tavşanın rektumundan sıcaklık ölçülecek prob, araştırılacak ürünün enjeksiyonundan 90 dakika önce rektuma yerleştirilmelidir. Sıcaklığı $\pm 1^{o}C$ kesinlikle ölçebilecek hassasiyete sahip klinik ve kalibre edilmiş termometre ya da aynı duyarlıkta sıcaklık tespit edebilen yazıcı aletler proba bağlanarak sıcaklığın saptanması ve maksimum sıcaklığa yükseldiği sınırını saptamak için kullanılmaktadır (E.P. 2.6.8 Pyrogens).

Tavşan Pirojen Testinde kullanılmış olan hayvanlar, ilaç enjekte edildiğinden itibaren iki hafta geçmeden farklı bir pirojen testinde kullanılmamalıdır. Testte kullanılan tavşan, daha önceki testin sonucunda pirojen reaksiyonu göstermemiş ise diğer testte kullanılması için 48 saat sürenin tamamlanması beklenmelidir. Pirojen testinde kullanılacak tavşana çalışmanın planlandığı günün önceki üç gün içinde yapılan pirojen testinde uygun olmayan bir sonuç göstermişse ya da üç hafta içinde pirojen özellik gösteren bir madde çözeltisi ile testte kullanılmış ise, bir sonraki testte bu tavşanlar yeniden kullanılmamalıdır. Pirojen testi için kullanılmış tavşanların yer aldığı grubunun sıcaklık artış ortalaması (Çizelge 2.3.) 1.2°C'yi geçmiş ise, yeniden bu tavşanlar çalışmada kullanılmamalıdırlar (E.P. 2.6.8 Pyrogens).

Çizelge 2.3. Avrupa Farmakopesi Monograf 2.6.8 Tavşan Pirojenite Testi deney hayvan sayıları ve sonuçların değerlendirme kriterleri (EP 2.6.8 Pyrogens)

Tavşan Sayısı	Toplam Isı Artışı Geçerli Sonuçlar (°C)	Toplam Isı Artışı Geçersiz Sonuçlar (°C)
3	1.15	2.65
6	2.80	4.30
9	4.45	5.95
12	6.60	6.60

Sonuçların Değerlendirilmesinde:
3 tavşan kullanıldığında ortalama ısı artışı 1.15°C – 2.65 °C aralığında olması durumunda test geçerlidir, >2.65 °C olduğunda test tekrarı 6 tavşan ile devam eder,
6 tavşan kullanıldığında ortalama ısı artışı 2.80°C – 4.30 °C aralığında olması durumunda test geçerlidir, >4.30 °C olduğunda test tekrarı 12 tavşan ile devam eder,
12 tavşan kullanıldığında ortalama ısı artışı >6.60°C olduğunda test pirojen olarak raporlandırılır.

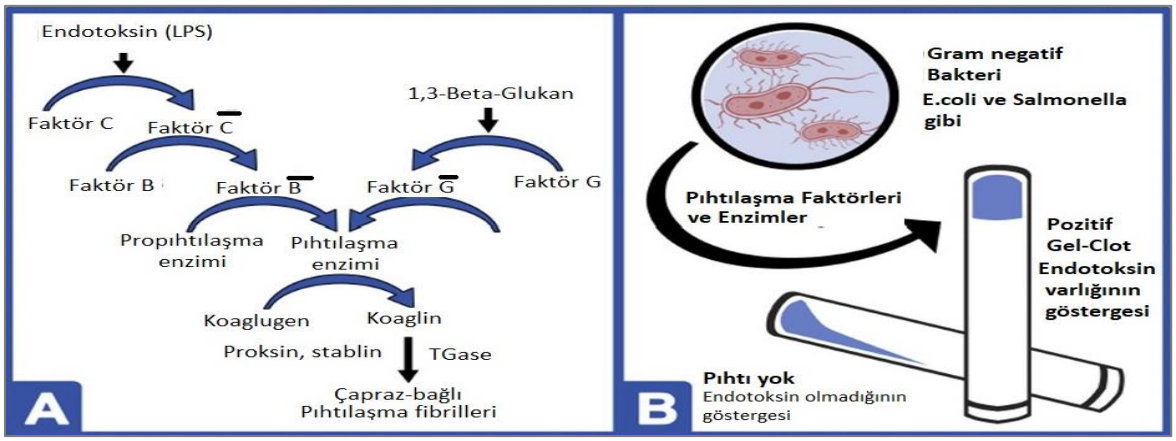
Limulus Amebosit Lizat Testi

Endotoksinler, gram negatif bakterilerin hücre duvarında yer alan lipopolisakkarit yapıdaki bileşenlerdir. Potansiyel olarak toksik etkilidirler. Endotoksinlerin açığa çıkması ancak bakterinin parçalanmaya uğradığı sırada ortama salınması ile mümkündür. Endotoksinler insanlarda pirojeniktir ve bir eşiğin üzerinde ciddi fizyolojik reaksiyonlara

neden olabilir. Araştırmacılar at nalı yengecinin kanının gram negatif bakterilere maruz kaldığında pıhtı oluşumunu gözlemlediler (Levin ve Bang, 1964). Bu keşfe dayanarak *in vivo* tavşan kullanımını azaltmak için RPT'ye alternatif bir test olan LAL Testini geliştirdiler. LAL Testinin endotoksin saptanmasında çok duyarlı olduğu kanıtlanmış olsa da endotoksin olmayan pirojenleri saptayamamasından dolayı RPT'nin yerini alamamıştır. Limulus Amebosit Lizat Testi Amerika Farmakopesinin (USP) 20. Baskısına 1980 yılında dahil edilmiştir. LAL Testi 1977 yılında ilk olarak Amerikan Farmakopesinde (USP <85> Bacterial Endotoxins Test; Pearson, 1985) ve diğer farmakopelerde (E.P. 2.6.14 Bacterial Endotoxins; Weisser ve Hechler, 1997) yayımlanmıştır ve hala kullanımdadır. Bakteriyel Endotoksin Testi tüm farmakolerde kullanılan 3 farklı tekniğe göre 6 yöntem olarak yer almaktadır. Aksi belirtilmedikçe tüm yöntemler uygulanabilmektedir. Bu yöntemler;

Jel-Clot (Metot-A: Jel-Clot Limit Test, Metot-B: Jel-Clot Yarı Nicel Test), Türbidimetrik (Metot-C: Türbidimetrik Kinetik, Metot-F: Türbidimetrik Son Nokta), Kromojenik (Metot-D: Kromojenik Kinetik, Metot E: Kromojenik Son Nokta)'tir.

Bakteriyel Endotoksin Testi olan LAL, gram negatif bakteri orijinli endotoksin varlığını saptar ve nicel analiz için 1970'lerden bu yana kullanılan duyarlı bir testtir. Atnalı yengecinin kanından (Limulus polyphemus / Tachples tridentatus) elde edilen amebosit lizat kullanılarak yapılmasından dolayı LAL Testi olarak anılmaktadır. Atnalı yengeçlerinin hemolenflerinin endotoksinleri saptama yeteneği ilk olarak Jack Levin ve arkadaşı tarafından keşfedilmiştir ve 1964 yılında yayınlanmıştır (Levin ve Bang 1964). Endotoksin, atnalı yengeçlerinde kanın pıhtılaşmasından sorumlu protein olan zimojen Faktör C'yi spesifik olarak aktive eder (Nakamura, 1986). Test maddesinde bulunan çok az sayıda lipopolisakkarit limulus amebosit lizatının pıhtılaşmasına neden olmaktadır. Hayvan temelli bir test prosedürü olan LAL Testinde atnalı yengeçleri yakalanır, doğal ortamlarından ayırılır ve acı veren bir proses ile kanamaları sağlanır. BET pirojen test yöntemi, RPT'den 100 kat daha hassas olduğu kabul edilmektedir (Schindler ve diğerleri 2009). Ancak bu testin en önemli dezavantajı sadece gram negatif bakterilerden gelen endotoksinleri belirleyebilmesi, endotoksin olmayan pirojenik materyalleri belirleyememesidir (Şekil 2.6-A ve Şekil 2.6-B).



A. Amebosit lizatının LPS ve 1,3-β-D glukan pıhtılaşma kaskadı. (LPS, Faktör C'yi aktive eder, ardından Faktör B'yi aktive eder. Aktive olan Faktör B propıhtılaşma enzimini pıhtılaşma enzimine dönüştürür ve iki koagulugen peptidini çözünmez koagulin jelini oluşturmak üzere böler. Benzer bir yolak, pek çok invazif fungal patojenin hücre duvarının içerdiği 1,3-β-D glukan için de örnektir.
B.Tipik LPS-aracılı LAL jel clot miktar tayininin şeması (Deney tüpü 180°C çevrildiğinde pıhtılaşma gözlemlenir ise test pozitif, eğer jel kıvamında ve akışkan ise test negatiftir)

Şekil 2.6. Limulus Amebozit Lizat Testi etki mekanizması (A), Limulus Amebozit Lizat Testi değerlendirmesi (Kulberg ve diğerleri, 2020)

Yöntem, bazı nedenlerle kısıtlayıcı durumlar içermektedir. Biyolojik ürünlerin üretimi aşamalarında endotoksin olmayan pirojenlerin saptanamaması bunlardan biridir (Fennric-Altex, 2009; https://www.ndresearch.net/in-vivo-testler). Ayrıca, testte kullanılan lizat üretimi için gerekli olan at nalı yengeç türü nesilleri risk altındadır. Atnalı yengeçlerinin yumurtaları ile beslenen kıyı kuşlarının popülasyonlarında ciddi bir azalma kaydedilmiştir. Tüm bu sebeplerle lizat üretiminin rekombinant teknoloji ile yapılmasının lizat gereksinimini karşılanabileceği görüşünü doğurmuştur ve sentetik bir rFC'nin karşılaştırma çalışmalarında kullanılmasına başlanmıştır (Bolden ve Smith, 2017; Maloney, T., Phelan, R., Simmons, N., 2018).

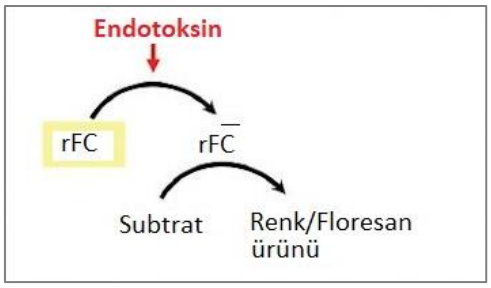
2.5.2. *In vitro* testler

İn vitro test yaklaşımları, *in vivo* testlerdeki zorluklar, kısıtlılıklar, mekanistik çalışmalarda kontrollü sistem gereksinimleri ve etik kaygılar nedeniyle yaygın kullanıma sahiptir.

Rekombinant Faktör C Testi

Endotoksin pirojenleri tespit etmek için *in vitro* bir yöntem olan rFC Testi, LAL Testinin hayvan kullanılmadan floresan tekniği ile ölçülerek, endotoksinler tarafından aktive edilen genetik olarak tasarlanmış bir proteinin tespit edilmesinde kullanılan yöntemdir (Bolden ve

diğerleri, 2014). rFC Testi, 2004 yılından bu yana kullanılmaktadır. Özellikle LAL Testi ile rFC Testinin biyolojik tıbbi ürünlerde yapılan karşılaştırma çalışmalarında; biyolojik kaynaklı ham maddelerden ve filtrasyon basamağı bulunan üretimdeki selüloz filtrelerden bulaşan β-glukan kaynaklı endotoksinlerin saptanmasında LAL Testinin yanlış pozitif sonuç verdiği saptanmıştır (Brendon ve diğerleri, 2021). Avrupa Farmakopesi özellikle, rFC reaktifinde Faktör G bulunmadığından, glukanlara karşı reaktivitenin meydana gelmeyeceğine işaret eder. LAL ve rFC'nin reaksiyon yollarındaki farklılıklar (Şekil 2.6. ve Şekil 2.7.) testler arasındaki yüksek düzey farkını göstermektedir. Endotoksine özgü yolun yanı sıra, LAL kademesinde bir beta-glukan reaksiyon yolu verilir. Klasik LAL Testi ortamının basitleştirilmesi, rFC Testi tabanlı yöntemlerle endotoksin testi için birinci düzeyde özgüllük sağlamaktadır (Williams, 2018). rFC önce Amerikan Farmakopesinde (USP<1085> rFC Rekombinant Factor C, 2012) ve ilerleyen süreçte Avrupa Farmakopesi (E.P. 2.6.32 rFC Rekombinant Factor C, 2016), Çin Farmakopesi (Chinese Pharmacopoeia rFC Testing, 2020) ve Japon Farmakopesinde (4.01) LAL Testi yerine kullanımı önerilmektedir.

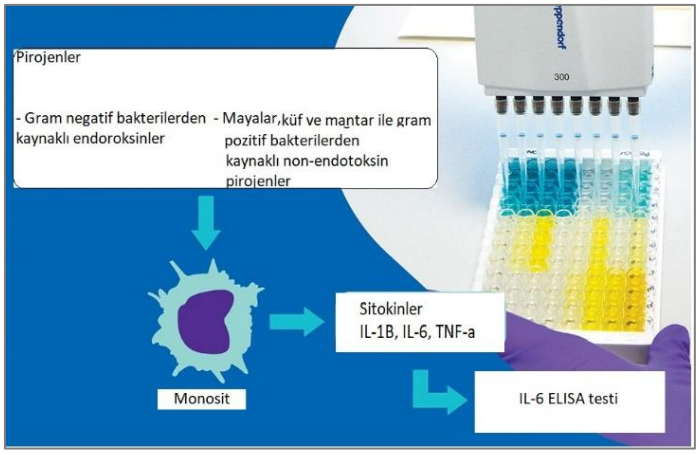


Şekil 2.7. Rekombinant Faktör-C mekanizması (Rekombinant Faktör-C tek bileşenli, tek basamaklı, hassas ve spesifik bir endotoksin miktar tayini yöntemidir (Ding ve Ho, 2010)

Monosit Aktivasyon Testi

Monosit Aktivasyon Testinin pirojenik ve proinflamatuar kirletici maddelerin saptanması için ilk kullanımı 1988 yılında olmuştur (Poole S, Thorpe R, Meager A, Gearing AJ., 1988). Hem endotoksin hem de endotoksin olmayan pirojenleri saptayabilen ve miktar tayinlerini yapabilen MAT önemli bir alternatif test olarak kabul edilmektedir. MAT prensibi, insanlarda doğuştan gelen bağışıklık (innat immünite) sisteminin bir tepkisi olarak, bağışıklığın anahtar hücreleri olan monositlerin vücuda giren pirojenlere karşı ürettikleri bir dizi sitokinin konsantrasyonunun enzime bağlı bir immünosorbent deney testi (ELIZA) ile

ölçümüne dayanır (Hartung, 2015). *In vitro* olarak insan kanının kültüründe olası pirojen içeren bir örneğe karşı monosit kaynaklı indüklenen sitokinlerin saptanması (Şekil 2.8) için MAT geliştirilmiş ve uygulanmaktadır. Regülasyonlarda MAT için 3 yöntem bulunmaktadır. Bunlar; Metot-A: Nicel Test, Metot-B:Yarı Nicel Test ve Metot-C: Referans Karşılatırmalı Test'dir (EP 2.6.30).



Şekil 2.8. Monosit Aktivasyon Testi mekanizması (https://www.a3p.org/en/detection-endotoxins-pyrogens)

Pirojen varlığında salgılanan sitokinlerin miktarını ölçmek için (örneğin, IL-1β, IL-6, ve TNF-α), ELIZA yöntemi kullanılır. MAT'de, tavşan yerine insan kan hücresi kullanılır ve bu insan hücrelerinin test maddesine karşı geliştirdiği immün cevap ölçülür. Bu yöntemde direkt olarak insan hücreleri kullanıldığı için insan pirojenleri hayvan testlerine göre daha etkili bir şekilde belirlenir.

Testin sinerjik pirojen etkilerini saptamak için uygun olup olmadığı çalışılmıştır. *Staphylococcus aureus* gibi NEP'i de güvenilir bir şekilde saptadığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda da MAT'ın hem endotoksin kaynaklı pirojenleri hem de NEP'lerin saptanması için güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir (Solanti, 2022).

<u>Monosit Aktivasyon Testinin yasal düzenleme otoritelerindeki tarihsel gelişimi</u>

Monosit Aktivasyon Testi, ECVAM ve ICCVAM tarafından sırasıyla 2006 ve 2008'de valide edildikten sonra, yasal düzenleyici otoritelerin kılavuzlarına, rehberlerine ve mevzuatına girmeye başlamıştır. ICCVAM'da 5 *in vitro* MAT'ın, RPT ve Bakteriyel Endotoksin testleriyle paralel olarak ürüne özgü en az 3 üretim serisinde çalışılması ile

uygulanması önerilmiştir (Çizelge 2.4.). Ayrıca ICCVAM, endotoksin ve NEP'lerin saptanmasında alternatif *in vitro* yöntemlerin kullanılmasını "altın standart" olarak değerlendirmiştir (ICCVAM, 2008). FDA'da *in vitro* pirojenite testi yöntemlerini 2009 yılında kabul etmiştir ve Amerikan Farmakopesinde 2012 yılında yayınlanmıştır (Çizelge 2.5).

Pirojenite testinde kullanılan *in vivo* RPT 1912 yılında geliştirilmeye başlanmış ve 1942 yılında USP'de yayınlanmıştır. Pirojen testine alternatif yöntemi olarak *in vitro* MAT ise 1990 yılında geliştirilmeye başlanmış olup tarihsel gelişimine bakılacak olursa; 2010 yılında Avrupa Farmamopesinde yayınlanmıştır. Başta Amerika, Hollanda, Almanya, Brezilya, İngiltere, İtalya, İsviçre olmak üzere pek çok ülke MAT testini uygulamaya almışlardır (Potu, 2011). Alternatif yöntem olarak OECD rehberlerinde Yaşam Boyu Öğrenmeyi Finanse Etmek İçin Alternatif Yaklaşımlar (Coufalik ve Goulliova 1999) adıyla 1999 yılında yerini almıştır. EDQM; ürüne özel doğrulamadan sonra (EP 2.6.8, 2016) mümkün olan her yerde Tavşan Pirojen Testinin, MAT (EP 2.6.30) ile değiştirilmesini önermektedir (https://www.edqm.eu/en/-/european-pharmacopoeia-to-put-an-end-to-the-rabbit-pyrogen-test,2023). Ayrıca EP, BET için test kullanma kılavuzunda "MAT (EP 2.6.30) için; örneklerde NEP'lerin varlığını saptamak için kullanılmaya uygun bir yöntemdir" olarak yer almaktadır (EP 2.6.30). Tıbbi cihazlar için en güncel ISO rehberi (ISO 10993-11:2020), en az eşdeğer bilgi sağladığı zaman (benzer sonuçları sağlaması) *in vivo* yöntemler yerine *in vitro* yöntemlerin tercih edilmesi gerekliliğini belirtmiştir (ISO/DTR 21852, 2016).

Alternatif pirojenite testinde *in vitro* yöntem olarak ECVAM ve ICCVAM tarafından doğrulanmış test yöntemlerinden MAT çeşitleri tarihi Çizelge 2.4.'de yer almaktadır (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/)

Çizelge 2.4. Monosit Aktivasyon Testinin ECVAM ve ICVAM'da geçerlenme bilgileri

Yöntemin Adı	ECVAM Validasyon Onay Tarihi	Uluslararası Regülasyona Kabul Tarihi	FDA'nın Kabul Tarihi	USP'de YayınlanmaTarihi
İnsan Tam Kanı/IL-1β	Mart 2006	Mart 2009	2009	2012
MonoMac 6 hücreleri/IL-6	Ocak 2006	Mart 2009	2009	2012
İnsan Tam Kanı/IL-6	Mart 2006	Mart 2009	2009	2012
İnsan Dondurulmuş Tam Kabı/ IL-1β	Mart 2006	Mart 2009	2009	2012
Periferal Kan Mononüklear Hücreleri/ IL-6	Mart 2006	Mart 2009	2009	2012

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu resmi internet sitesinde, ruhsatlandırılmış beşeri tıbbi ürünlerin belirtilen standartları sağlaması durumunda, Kullanma Talimatı (KT) metinlerine ve ambalaj bilgilerine ‘ apirojen kaydının konulması gerektiğini ve bunun için Avrupa Farmakopesi “2.6.30. Monosit Aktivasyon Testi”nin, ürün spesifik validasyon sağlanması durumunda tavşanda pirojenite testi yerine kullanılabileceği’ni duyurmuştur (https://www.titck.gov.tr/duyuru/parenteral-preparatlarda-apirojen-ifadesi-7122018173955, 2017). Kuzey Amerika, küresel MAT pazarında en büyük paya sahip olurken, onu Asya Pasifik, Avrupa, ülkeleri, Çin, Rusya ve Hindistan ülkeleri izlemektedir (Çizelge 2.5.). Kuzey Amerikanın küresel pazardaki büyük payı, büyük ölçüde gelişmiş sağlık altyapısına, pirojen testi için katı düzenlemelere, büyük ilaç ve biyoteknoloji şirketlerinin varlığına, hayvanlar üzerinde test yasağı için uygun politikalara ve nüfusa bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2.5. Pirojen testlerinin uluslararası regülasyonlardaki tarihçesi ve Monosit Aktivasyon Testine yaklaşımları

Uluslararası Farmakopeler	Piroten Testi Monografı / Revizyon Tarihi	Bakteriyel Endotoksin Testi Monografı / Revizyon Tarihi	Monosit Aktivasyon Testi Monografı / Revizyon Tarihi
Avrupa Farmakopesi	EP 2.6.8, Revizyon:2016	EP 2.6.14, Revizyon:2016	Farmakope Yöntemi EP 2.6.30, Revizyon:2017
Amerika Farmakopesi	USP <151>, Revizyon:2014	USP<85>, Revizyon:2014	Alternatif Yöntem
Japon Farmakopesi	JP 4.04	JP 4.01	Uygulanmadı
Hindistan Farmakopesi	IP 2.28	IP 2.23	Alternatif Yöntem
Çin Farmakopesi	Vol-1 Genel Prensipler 1142, Revizyon:2015	Vol-1 Genel Prensipler Çeviri Aşamasında, Revizyon:2015	Uygulanmadı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *In Vitro* Pirojenite Testi olan Monosit Aktivasyon Testinin Gerçekleştirilecek Örneklerin Toplanması

Yöntemimizi uygulamak üzere; birer adet Covid-19 aşısı, akrep antiserumu, insan immunglobulin-G, iki adet rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş biyobenzer ürünler ve vajinal ovül olmak üzere 6 biyolojik ürün analize alınmıştır. Örneklerden birer adet insan immunglobülin-G ve iki adet rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş biyobenzer ürünler tedarikçi firmalarından satın alınmıştır. Covid-19 aşısı ise aşı üretim tesisinin TİTCK GMP denetimi kapsamında yer alınan proje gereği karşılaştırma çalışmasını yapan firma tarafından çalışmamız için hibe edilmiştir (Ek 1). Tip-II tıbbi cihaz kapsamında onaylanmış vajinal ovül yurtdışındaki bir fuardan örnek olarak alınmıştır. Biyolojik örnekler, TİTCK Analiz Laboratuvarları tarafından BET ve RPT'den apirojen olarak sonuçlandırılmıştır. Örnekler buradan sonra; Covid-19 aşısı için X, akrep antiserumu için Y-AS, insan immunoglobülin-G için Z-Ig, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş biyobenzer ürünlere için RK-A ve RK-B ve vajinal ovül için ise V-O kısaltmaları ile kullanılacaktır. Örnekler, Eylül 2022 – Kasım 2022 tarihleri arasında temin edilmiş olup biyolojik ürünler, 2°C-8°C'de buzdolabında (Beko) (Ek-2), vajinal ovül ise 22°C-25°C'de oda koşullarında yöntem uygulanacağı zamana kadar Biogenuslab Biyoteknolojik Çözümler Laboratuvarında saklanmıştır.

3.1.1. Deneysel yöntem için kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

- 50 ml Reaktif rezervuarı (Corning Costar)
- Aseton (Sigma)
- Hidrojen peroksit (Sigma)
- IL-6 Antikor standartı (Lonza)
- İnsan Periferal Kan Mononüklear Hücresi (Lonza Biologics)
- L-Glutamin (200 mM çözeltisi),
- Mikropipet seti ve pipet uçları (Eppendorf®)
- Moleküler biyolojik steril su (Nzytech®)
- Monosit aktivasyon test kiti (PeliKine Compact IL-6 ELISA) (Sanquin)
- PBS 10x (Fosfat salin tamponu) (ClearBand)

- Penisilin-Streptomisin 100 x çözelti (Merck)
- Peroksidaz (Yaban turpu liyofilize toz) ~150U/mg (Sigma Aldrich)
- Pirojenik olmayan 12 kuyucuklu hücre kültür kabı (TPP)
- Pirojenik olmayan 24 kuyucuklu hücre kültür kabı (TPP)
- Pirojenik olmayan 6 kuyucuklu hücre kültür kabı (TPP)
- Pirojenik olmayan 96 kuyucuklu hücre kültür kabı, (TPP)
- Pirojenik olmayan cryo tüp, steril (Capp®)
- Pirojenik olmayan falkon tüpü, steril (Capp®)
- Pirojenik olmayan Pastör pipeti (Biologix®)
- Pirojenik olmayan steril santrüfüj tüpü (Ependorf ®)
- Pirojenik olmayan T-25 hücre kültür flask (Corning Costar)
- RPMI 1640 ile L-glutamin (L-glutamin içeren besi yeri) (Lonza Biologics)
- Sığır Serum Albumin (Merck)
- SMGS Besi yeri zenginleştirici (Lonza Biologis)
- Soğuk zincir için buz aküsü ya da kuru buz
- TMB substrat (Thermo Fisher)
- Tripsin EDTA (Biochem)
- Tripsin nötralizan çözeltisi (Biochem)
- Tris(hidroksimetil)aminometan (Sigma Aldrich)
- Tween-20 (Sigma Aldrich)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- -20ºC Derin dondurucu (Beko®)
- 2-8ºC Buzdolabı (Beko ®)
- -80ºC Derin dondurucu (Nuve®)
- Biyogüvenlik kabini (Braulab®)
- CO_2 İnkübatör (RS Biotech Mini Galaxy A®)
- ELIZA okuyucu /spektrofotometre (Allsheng®)
- Etüv (Nuve FN 300)
- Hassas terazi (Jadever®)
- Hot block (Velp Scientifica)
- Invert Mikroskop (Olympus INIT-2)

- Manyetik karıştırıcı (Witeg®)
- Mini santrifüj cihazı (Vibro®)
- pH metre (Mettler Toledo®)
- Saf su sistemi (Sartorius®)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin Sonorex)
- Vortex (Lab companien®)

3.2. Monosit Aktivasyon Testi İçin Kullanılan Kit

In vitro kit çalışması, Uzman Biyolog Meltem DOĞAN'ın yürütücüsü olduğu "İlaç, Kozmetik, Vücut İçi Tıbbi Cihazlara Uygulanmak Üzere *In Vitro* Pirojenite Test Metodu Geliştirme Çalışması'' adlı ve 7210280 numaralı TÜBİTAK TEYDEB Projesinin bir parçası olarak yapılmıştır. Projenin hedefi, *in vitro* pirojenite testi olan Monosit Aktivasyon Testi için kit geliştirerek geliştirilen kiti valide etmektir. Kit geliştirme çalışmaları ticari bir kit olan PeliKine Compact® System/Sanquin kiti ile karşılaştırarak yürütülecektir. Araştırmamızda çalışılan MAT kitleri ve sarf malzemeler bu projeden sağlanmıştır. Proje ortağı Biogenuslab Biyoteknolojik Çözümler Lab. Ltd. Şti.'nin de laboratuvar olanaklarından yararlanılmıştır.

3.3. ELIZA Yöntemi ile Numunelerde Pirojen Tayininin İlkesi

Araştırmamızda sandviç ELIZA ilkesi ile çalışan ticari kit (PeliKine Compact ® System/Sanquin) kullanılarak farklı farmasötik numuneler ile vücut içi tıbbi cihazda pirojenite tayini gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ticari kit ile bilinmeyen örneklerin içindeki antijen miktarının belirlenmesi sağlanmıştır. Kit prosedürüne göre, kit içerisinden çıkan 96 kuyucuklu kültür kabı yakalama antikoru ile kaplanmıştır. Kaplama sonrasında antijeni içeren örnekler (araştırmamızda IL-6 içereğini araştırdığımız örneklerin hücre kültürü üst sıvısı) eklenmiştir. Bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile uzaklaştırılmıştır. Enzim işaretli ikinci antikor (dedeksiyon antikoru), yakalama antikoruna bağlanmıştır. Bağlanmayan dedeksiyon antikorunun yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra, ortama enzime ait substrat eklenmiştir. Substrat, dedeksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek pozitif örneklerde renk değişimi gerçekleşmiştir. Bu renk değişimi de spektrofotometrik olarak ELIZA'da ölçülmüştür (Şekil 3.1, 3.2.). Ticari test kiti kullanıma

hazır biçimde piyasada bulunmaktadır. Ticari kit içeriği aşağıdaki tabloda verilmektedir (Şekil 3.3.) (Çizelge 3.1).



Resim 3.1. ELIZA Okuyucu

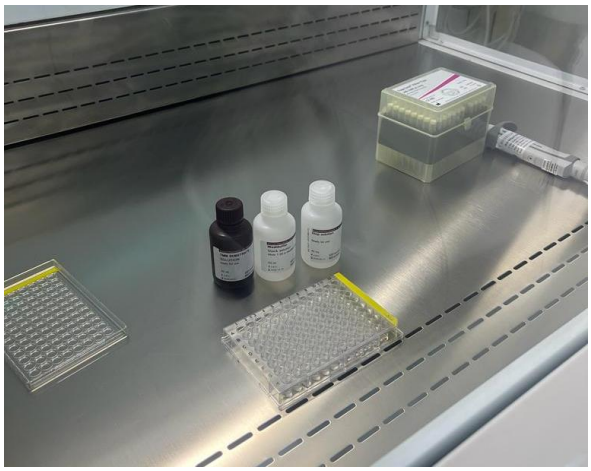


Resim 3.2. ELIZA Okuyucuda 450 nm dalga boyu ayarlanması

Çizelge 3.1. PeliKine Compact® System/ Sanquin ticari kit içeriği

Ürün Bileşimi	Ürün Tanımı	Saklama Koşulu	Ürün Katalog Numarası
PeliKine Compact® kiti	Kit, hücreler ve interlökin IL-6 ELISA ile inkübasyon için reaktifler içerir.	2-8ºC	PeliKine Compact
PeliKine kompakt hücreleri	PMBC hücreleri (2 x 1 ml)	-80ºC	PeliKine Compact
Referans standart	Uluslararası standart TLR agonisti	Liyofilize toz -20°C, reconstitutie çözelti -40 °C	1.44161.0001
IL-6 kontrolü standartı	İnsan IL-6 standardı	-20 °C	PeliKine Compact
Kaplama tamponu	100 kat seyreltme	2-8ºC	PeliKine Compact
Bloklama Reaktifi	100 kat seyreltme	2-8ºC	PeliKine Compact
Biotinlenmiş antikor	100 kat seyreltme	2-8ºC	PeliKine Compact
Streptavidin-HRP konjugat	10000 kat seyreltme	2-8ºC	PeliKine Compact
Seyreltme Tamponu	5 kat seyreltme	2-8ºC	PeliKine Compact

-Besi yeri (RPMI (Lonza Biologics)), Besi yeri zenginleştirici (SMGS)
-Hücre (İnsan Periferal Mononüklear Kan Hücresi (PMBC), 4 sağlıklı donörden alınan kanlardan izole edilmiş, tam karakterizasyonu yapılmış hücrelerdir)
-Tripsin –EDTA, Tripsin nötralizan çözeltisi, pasajlama sırasında primer hücre stabilizatörü (Yüzeye yapışan hücreleri pasajlama öncesi süspansiyon haline getirme işlemi).



Resim 3.3. Monosit aktivasyon test malzemeleri

3.3.1. Monosit aktivasyon test kiti için hücrelerin ve çözeltilerinin hazırlanması

Bütün test aşamaları, kit prosedürüne göre yapılmıştır. Besi yerinin zenginleştirilmesi; -20°C'de saklanan SMGS oda sıcaklığında çözdürülmüş ve 25ml'si, +4°C'de saklanan 500ml RPMI ile üretici protokolüne uygun olarak karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta +4ºC'de 1 ay süreyle saklanabilmektedir ancak örneklerimiz için hemen kullanılmış olup, saklanmamıştır.

Hücrelerin pasajlanması; cryo tüp içinde gelen primer hücreler, 1dk süreyle 37°C'de, su banyosunda çözülmüştür. Zenginleştirilmiş besi yeri (15 ml, 37°C) ile karıştırılan hücreler, T-25 cm^2 hücre kültürü kabında 37°C sıcaklıkta % 98 nem içeren %5 CO_2 altındaki koşulları sağlayan inkübatöre yerleştirilmiş ve kültür kabının tamamını kaplayana kadar izlenmiştir. Bu aşama 30 gün sürmüştür. Bu süre içinde hücreler üzerine eksilen miktarda zenginleştirilmiş besi yeri eklenerek hücrenin canlılığını koruması sağlanmıştır. Hücreler Olympus INIT-2 marka invert mikroskop ile her gün kontrol edilmiştir. Hücreler kültür kabının tüm yüzeyini kapladıklarında (30. gün) pasajlama işlemine geçilmiştir. İçerisinde primer hücre bulunan T-25 cm^2 hücre kültürü kabı içerisindeki hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmıştır. Üzerine 2 ml steril PBS (pH 7.4) tamponu eklenmiştir. T-25 cm^2 hücre kültürü kabı PBS ile bu şekilde yıkanmıştır. Daha sonra PBS tekrar atılmıştır. Hücrelerin üzerine 700 µl tripsin EDTA (%0.05:% 0.05) çözeltisi konmuş ve hücrenin yüzeyden ayrılması için 37°C'deki inkübatörde 2-3 dakika kadar bekletilmiştir. İnvert ışık mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldükten sonra pipetleme yapılarak hücre kümelerinin ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpünde 5000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve üzerine 2ml PBS konarak, hücreler pipetle PBS içerisinde tam yıkama için dağıtılmıştır. Ardından tekrar 5000 g'de 5 dk santrüfüj edilmiştir. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Son yıkama sonrası santrifüj tüpündeki PBS atılmış ve tüpe 8ml önceden ısıtılmış (37°C) zenginleştirilmiş besi yeri eklenmiştir. Hücreler pipet yardımı ile besi yeri içerisinde dağıtılmıştır. Santrüfüj tüpündeki 8ml hücre süspansiyonu 2 adet T-25cm^2 hücre kültürü kabına eşit hacimle dağıtılmıştır. Üzerilerine 15ml'ye tamamlamak üzere 11ml zenginleştirilmiş besi yeri konmuştur ve 37°C'de % 98 nem içeren %5 CO_2 altındaki koşulları sağlayan inkübatöre yerleştirilmiştir. Her günün sonrası yapılan kontrollerde 3. günde hücrelerin hücre kültürü kabı yüzeyini kapladığı görülmüştür. Hücre canlılığı %90'ın üstünde saptanmıştır. Devamında 1 adet T-25 cm^2 hücre kültürü kabından 4 adet T-25cm^2 hücre kültürü kabına yukarıdaki gibi pasajlanmıştır. Elde edilen pasajların 3 gün sonra konfluense ulaştıkları, hücre kültürü kap yüzeyinin tamamını kapladıkları görülmüştür. Çalışmamızın bu kısmında 4 adet hücre kültürü kabından 2 adeti içerisinde hücreler herhangi aksilik durumunda kullanılmak üzere stok kaldırılmıştır, diğer 2 adet kaptaki hücreler tripsin ve yıkama aşamalarından sonra hücreler üzerine 2,4ml önceden oda sıcaklığına getirilmiş zenginleştirilmiş besi yeri ilave edilip hücre süspansiyonu eşit hacimlerle 6 kuyucuklu hücre kültürü kabına alınmıştır. 6 kuyucuklu hücre kabı içerisine her bir kuyucuğa 2 x 10^4 hücre gelecek biçimde eklenmiştir. Toplamda pozitif (tripan mavisi ekli besi yeri) ve negatif (içerisinde hücre bulunmayan sadece besi yeri) kontrollerle beraber 2

adet ayrı ayrı 6 kuyucuğa ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra hücrelerin tabanı kapladığı gözlenmiştir. Yukarıda anlatılan pasajlama prosedürü tekrarlanarak pasajlanan hücreler, pasajlama sonrası 2 adet 12 kuyucuklu hücre kabına alınmıştır. 3 gün sonra yine aynı işlem uygulanarak hücreler, $1x10^4$ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına alınmışlardır.

3.4. Monosit Aktivasyon Testinin Biyolojik Örneklere ve Tip II Tıbbi Cihaza Uygulanışı

3.4.1. Hücrelerin örneklerle inkübasyonu ve ELIZA protokolü

Hücreler, 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı 12 saat süreyle inkübe (37^oC, %5 CO_2) edilmiştir. Ardından hücrelerin mikroskop altında yüzeye yapışma durumları ile konfluens durumları incelenmiştir. Hücrelerin 12 saatte tam yüzeye yapıştıkları görüldüğünde her bir kuyucuğa konsantrasyonları Şekil 3.1.'e göre hazırlanmış biyolojik örnekler (X aşısı, RK-A ve RK-B biyobenzer ürünleri, Y-AS antiserumu, Z-IG kan ürünü) ve tıbbi cihaz örneği (V-O vajinal ovülü) numunelerinden ve endotoksin referans standart ve IL-6 referans standart çözeltilerinden 100µL numune, kuyucuk kodlamasına göre 96 kuyucuklu kültür kabına eklenmiştir. 500pg/ml numune konsantrasyon çalışması Çizelge 3.2'de, 2000pg/ml numune konsantrasyon çalışması Çizelge 3.3'de sunulmaktadır. 500pg/ml numune konsantrasyon çalışmasında 96 kuyucuklu kültür kabında G-H satırlarında yer alan numunelere validasyon kriterlerinden biri olan geri kazanım parametresinin incelenebilmesi için ilave olarak 1000 pg/ml referans standart eklenmiştir. 500 pg/ml numune çalışmasında V-O numunesinde limit dışı sonuç verdiği için, 2000 pg/ml numune çalışmasında V-O numunesine referans standart eklenmemiştir. Kit içerisinde 10000pg/ml IL-6 standardı ve referans pirojen standardı konsantrasyonu temelinde numune konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). İlgili kodlamada test kitinin ICH kılavuzu Q2(R2)'ye göre (Validation of analytical procedures) validasyonunun sağlanabilmesi adına numuneler ve standartlar 6 tekrarlı (x3) çalışılmıştır. Ekleme sırasında, hücre kabının ve numunelerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı oda sıcaklığında biyogüvenlik kabini içerisine alınmıştır. Kuyucuklardaki her bir üst faz, tek tek kodlanmış biçimde cryoflakonlara alınmıştır. Kit içerisinde yer alan 96 kuyucuklu kültür kabına oda sıcaklığındaki kaplama antikoru kaplama tamponu içinde (0.1 M Karbonat/bikarbonat tamponu pH 9.6) 1:100 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 100µL eklenmiştir ve ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 24 saat süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda

kaplama tamponu boşaltılmıştır. Her bir kuyucuk 5 kez 100µL yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından her bir kuyucuğa buzdolabında bekletilen 100µL numune ve standartlar eklenmiştir. Numunelerin konsantrasyonları uygulama dozuna ve IL-6 standart eğrisi içerisinde yer alacak biçimde hesaplanmıştır. Numunelerin konsantrasyon hesaplamaları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Kültür kabının ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Oda sıcaklığındaki biyotinle bloklama tamponu örneklerin üzerine eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Streptavidin-HRP konjugatı 1:10.000 oranında dilüsyon tamponu (kit içerisinde çıkan dilüsyon tamponu distile su ile 5 kat seyreltilir) ile seyreltilerek her bir kuyucuğa 100µL eklenmiştir. Ağzı tekrar kapatılan kültür kabı 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kültür kabının içindeki çözeltiler boşaltılmış ve yıkama çözeltisi (yıkama tamponu 1X PBS çözeltisi içerisinde %0,005 Tween 20 çözeltisidir) ile her bir kuyucuk 5 kez yıkanmıştır. Ardından taze hazırlanmış subtrat çözeltisinden (0.11 M, asetat tamponundan (pH 5,5) hazırlanır) her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiştir. Ağzı tekrar kapatılan kültür kabı 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Son olarak her bir kuyucuğa 100 µL durdurma çözeltisi eklenmiş ve 450nm'de otomatik ELIZA okuyucuda absorbans okumaları yapılmıştır. Tüm numunelerin içerisindeki pirojen konsantrasyonu PeliKine Compact® pirojenite tayin kiti yardımıyla tayin edilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar 500 pg/ml ve 2000 pg/ml'dir ve biyolojik örneklerden dilüsyon hesaplamaları aşağıda sunulmaktadır. Seyreltik ürün numunelerinden kültür kabına eklenecek konsantrasyon hesaplamaları Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri ve referans standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki uygulama (500pg/ml numune konsantrasyonları uygulanan hücre kültürü kabı tasarımı).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-Ovajinal ovül	RS (50pg/ml)	RS (50pg/ml)	IL-6 (50pg/ml)	IL-6 (50pg/ml)
B	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-Ovajinal ovül	RS (100pg/ml)	RS (100pg/ml)	IL-6 (100pg/ml	IL-6 (100pg/ml
C	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-Ovajinal ovül	RS (200pg/m)	RS (200pg/m)	IL-6 (200pg/ml	IL-6 (200pg/ml
D	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (400pg/ml)	RS (400pg/ml)	IL-6 (400pg/ml	IL-6 (400pg/ml
E	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-Ovajinal ovül	RS (800pg/ml)	RS (800pg/ml)	IL-6 (800pg/ml	IL-6 (800pg/ml
F	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Igkan ürünü	RK-B biyobenzer	V-Ovajinal ovül	RS 1000pg/ml)	RS (1000pg/ml)	IL-6 (1000pg/ml	IL-6 (1000pg/ml
G	Kör	Hücre	RK-A+1000 pg/ml RS	X + 1000 pg/ml RS	Y-AS +1000 pg/ml RS	Z-Ig+1000 pg/ml RS	RK-B-+ 1000 pg/ml RS	V-O+ 1000 pg/ml RS	RS (1500pg/ml)	RS (1500pg/ml)	IL-6 (1500pg/ml	IL-6 (1500pg/ml
H	Kör	Hücre	RK-A +1000 pg/ml RS	X + 1000 pg/ml RS	Y-AS +1000 ppm RS	Z-Ig +1000 ppm RS	RK-B-+ 1000 pg/ml RS	V-O+ 1000 pg/ml RS	RS (2000pg/ml)	RS (2000pg/ml)	IL-6 (2000pg/ml)	IL-6 (2000pg/ml)

Çizelge 3.3. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri ve referans standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki uygulama (2000pg/ml numune konsantrasyonları uygulanan hücre kültürü kabı tasarımı).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (50pg/ml)	RS (50pg/ml)	IL-6 (50pg/ml)	IL-6 (50pg/ml)
B	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (100pg/ml)	RS (100pg/ml)	IL-6 (100pg/ml	IL-6 (100pg/ml
C	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (200pg/m)	RS (200pg/m)	IL-6 (200pg/ml	IL-6 (200pg/ml
D	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (400pg/ml)	RS (400pg/ml)	IL-6 (400pg/ml	IL-6 (400pg/ml
E	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS (800pg/ml)	RS (800pg/ml)	IL-6 (800pg/ml	IL-6 (800pg/ml
F	Kör	Hücre	RK-A biyobenzer	X Aşısı	Y-AS antiserum	Z-Ig kan ürünü	RK-B biyobenzer	V-O vajinal ovül	RS 1000pg/ml)	RS (1000pg/ml)	IL-6 (1000pg/ml	IL-6 (1000pg/ml
G	Kör	Hücre	RK-A + 1000 pg/ml RS	X + 1000 pg/ml RS	Y-AS + 1000 pg/ml RS	Z-Ig+1000 pg/ml RS	RK-B-+ 1000 pg/ml RS	V-O vajinal ovül	RS (1500pg/ml)	RS (1500pg/ml)	IL-6 (1500pg/ml	IL-6 (1500pg/ml
H	Kör	Hücre	RK-A + 1000 pg/ml RS	X + 11000 pg/ml RS	Y-AS + 1000 pg/ml RS	Z-Ig + 1000 pg/ml RS	RK-B-+1000 pg/ml RS	V-O vajinal ovül	RS (2000pg/ml)	RS (2000pg/ml)	IL-6 (2000pg/ml)	IL-6 (2000pg/ml)

Uygulamalardan sonra ELIZA absorbans ölçümleri 500pg/ml için Çizelge 3.5 ve 2000 pg/ml için de Çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Numune Adı: Biyobenzer ilaç numunesi (RK-A ve RK-B)
Numune konsantrasyonu: 10mg/ml (1:2 (h/h)) oranından apirojen su ile seyreltme ile 5mg/ml çözeti kullanılmıştır.
MAT testi için hedef konsantrasyon: 2000 pg/ml

Örnek Hesaplama:

1. Stok çözelti konsantrasyonu: 5µg/ml
C1V1=C2V2, V1 = C2V2/C1, V1= 5µg/ml x 10ml / 5mg/ml
V1= 10µl,
5mg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

2. Stok çözelti konsantrasyonu: 5000pg/ml
C1V1=C2V2, V1 = C2V2/C1, V1= 5000pg/ml x 10ml / 5µg/ml
V1= 10µl,
5µg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 2000pg/ml
V1= C2V2/C1
V2=2000pg/ml x10 ml/5000 pg/ml
V2=4ml
5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 500pg/ml
V1= C2V2/C1
V2=500pg/ml x10 ml/5000 pg/ml
V2=1ml
5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Numune Adı: IVIG Kan ürünleri (Z-Ig) numunesi
Numune konsantrasyonu: 5g/100ml (50mg/ml)
MAT testi için hedef konsantrasyon: 2000 pg/ml

Örnek Hesaplama:

1. Stok çözelti konsantrasyonu: 5µg/ml
C1V1=C2V2
V1 = C2V2/C1
V1= 5µg/ml x 100ml / 50mg/ml
V1= 10µl,
50mg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 100ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

2. Stok çözelti konsantrasyonu: 5000pg/ml
C1V1=C2V2
V1 = C2V2/C1
V1= 5000pg/ml x 10ml / 5µg/ml
V1= 10µl,
5µg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 2000pg/ml
V1= C2V2/C1
V2=2000pg/ml x10 ml/5000 pg/ml
V2=4ml
5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 500pg/ml
V1= C2V2/C1
V2=500pg/ml x10 ml/5000 pg/ml
V2=1ml
5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Numune Adı: Antiserum (Y-AS)
Numune konsantrasyonu: 10mg/ml (1:2 (h/h)) oranından apirojen su ile seyreltme ile 5mg/ml çözeti kullanılmıştır.
MAT testi için hedef konsantrasyon: 2000 pg/ml

Örnek Hesaplama:

1. Stok çözelti konsantrasyonu: 5µg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 5µg/ml x 10ml / 5mg/ml

V1= 10µl,

5mg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

2. Stok çözelti konsantrasyonu: 5000pg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 5000pg/ml x 10ml / 5µg/ml

V1= 10µl,

5µg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 2000pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=2000pg/ml x10 ml/5000 pg/ml

V2=4ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 500pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=500pg/ml x10 ml/5000 pg/ml

V2=1ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Numune Adı: Covid-19 aşı numunesi (X)

Numune konsantrasyonu: 60mg/ml

MAT testi için hedef konsantrasyon: 2000 pg/ml

Örnek Hesaplama:

1. Stok çözelti konsantrasyonu: 60µg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 60µg/ml x 100ml / 60mg/ml

V1= 100µl,

60mg/ml'lik numune çözeltisinden 100µl alınıp, 100ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

2. Stok çözelti konsantrasyonu: 30000pg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 30000pg/ml x 10ml / 60µg/ml

V1= 5µl,

60µg/ml'lik numune çözeltisinden 5µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 2000pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=2000pg/ml x10 ml/30000 pg/ml

V2=4ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 500pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=500pg/ml x10 ml/5000 pg/ml

V2=1ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Numune Adı: Vajinal ovul (V-O)

Numune konsantrasyonu: 10mg/ml (1:2 (h/h)) oranından apirojen su ile seyreltme ile 5mg/ml çözeti kullanılmıştır.

MAT testi için hedef konsantrasyon: 2000 pg/ml

Örnek Hesaplama:

1. Stok çözelti konsantrasyonu: 5µg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 5µg/ml x 10ml / 5mg/ml

V1= 10µl,

5mg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

2. Stok çözelti konsantrasyonu: 5000pg/ml

C1V1=C2V2

V1 = C2V2/C1

V1= 5000pg/ml x 10ml / 5µg/ml

V1= 10µl,

5µg/ml'lik numune çözeltisinden 10µl alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 2000pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=2000pg/ml x10 ml/5000 pg/ml

V2=4ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Hedef konsantrasyon için: 500pg/ml

V1= C2V2/C1

V2=500pg/ml x10 ml/5000 pg/ml

V2=1ml

5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.

Çizelge 3.4. Biyolojik örnekler, tıbbi cihaz örneği numuneleri için konsantrasyon hesaplamaları

Numune Adı	**Numune kullanım dozu**	**MAT testi için Hedef Doz-1**	**MAT testi için Hedef Doz-2**	**500pg/ml için Örnek Hesaplama**	**2000pg/ml için Örnek Hesaplama-**	**500pg/ml Hesaplanan hacim**	**2000pg/ml Hesaplanan hacim**
Biyobenzer İlaç numuneleri (x3) (RK-A ve RK-B)	5mg/ml	500pg/ml	2000pg/ml	V1=C2V2/C1 V2=500pg/ml x10ml/5000pg/ml V2=1ml	V1=C2V2/C1 V2=2000pg/ml x10ml/5000pg/ml V2=4ml	5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 1ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.	5000 pg/ml'lik numune çözeltisinden 4ml alınıp, 10ml'ye apirojen su ile seyreltilir.
Kan ürünleri numunesi (x3) (Z-Ig)	5mg/ml						
Antiserum numunesi (x3) (Y-AS)	5mg/ml						
Aşı numunesi (x3) (X)	60mg/ml						
Vaijinal Ovül numunesi (x3) (V-O)	5mg/ml						

Çizelge 3.5. Biyolojik örnekler ve tıbbi cihaz örneği ve standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki absorbans ölçümleri (450nm; 500pg/ml)

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,229±0,120	1,118±0,006	1,126±0,006	0,062±0,004	0,068±0,004
B	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,436±0,120	1,384±0,002	1,412±0,002	0,098±0,003	0,102±0,003
C	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,136±0,120	1,692±0,042	1,632±0,042	0,108±0,011	0,124±0,011
D	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,342±0,120	2,012±0,007	2,002±0,007	0,182±0,018	0,156±0,018
E	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,216±0,120	2,112±0,004	2,118±0,004	0,356±0,013	0,337±0,013
F	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,412±0,120	2,308±0,004	2,364±0,004	0,512±0,004	0,518±0,004
G	0,001	0,001	2,056 ±0,020	2,284±0,045	2,412±0,209	2,392±0,075	2,158±0,021	*OL	2,778±0,051	2,850±0,051	0,622±0,007	0,612±0,007
H	0,001	0,001	2,084±0,020	2,348±0,045	2,117±0,209	2,286±0,075	2,129±0,021	*OL	2,994±0,001	3,008±0,001	0,888±0,031	0,932±0,031

OL: Limit üstü (Over limit)

Çizelge 3.6. Biyolojik örnekler ve tıbbi cihaz örneği ve standartlar için 96 kuyucuklu kültür kabındaki absorbans ölçümleri (450nm; 2000pg/ml)

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,176±0,089	1,122±0,001	1,124±0,001	0,050±0,001	0,052±0,001
B	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,262±0,089	1,354±0,013	1,372±0,013	0,072±0,006	0,08±0,006
C	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,136±0,089	1,674±0,023	1,642±0,023	0,122±0,001	0,124±0,001
D	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,312±0,089	2,212±0,008	2,224±0,008	0,218±0,003	0,222±0,003
E	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,349±0,089	2,302±0,033	2,348±0,033	0,342±0,003	0,338±0,003
F	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,116±0,089	2,388±0,017	2,412±0,017	0,516±0,006	0,508±0,006
G	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,324±0,089	2,724±0,024	2,758±0,024	0,602±0,011	0,617±0,011
H	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,222±0,089	2,802±0,718	3,818±0,718	0,898±0,018	0,872±0,018

3.5. ELIZA Metod Validasyonu

Çalışmada daha önce apirojen oldukları tavşan pirojenite testi ile kanıtlanmış olan ticari olarak piyasada bulunan biyolojik ürün numuneleri ile vücut içi tıbbi cihazda MAT testi ile pirojenite tayini gerçekleştirilmiştir. Kantitatif bir test olan MAT'ın son basamağı olan IL-6 ELIZA miktar tayini analizinin geçerliliği (validasyonu) "ICH Q2 (R1) (ICH Q2 (R1) Topic Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" ile "EDQM (EDQM PA/PH/OMCL (13) 82 R5 Validation/Verification of Analytical Procedures)" başlıklı uluslararası kılavuzlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Buna göre Analitik Metod Validasyon Protokolü aşağıda sunulmaktadır.

3.6. Validasyon Parametreleri

Uygulanan metodun performans karakteristikleri için öncelikle aşağıdaki temel validasyon parametreleri belirlendi. Bu parametreler,

- Özgünlük (Specifity)
- Doğrusallık (standard curve, linearity) ve Ölçüm aralığı (measurement range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)-Tekrarlanabilirlik
- Sağlamlık (Robustness)

3.6.1. Özgünlük (specifity)

Temelde çalışmanın spesifikliği belirlenirken beklenen fiziksel/kimyasal girişimler/engelleyiciler (interferences) varlığında analitik yöntemin sadece amaçlanan bileşen ya da bileşenleri doğru şekilde ölçülebilme yeteneğine bakılır. Çalışmamızda, IL-6 ELIZA analizinde girişime neden olabilecek ve matrikste bulunan maddeler standart üzerine eklenerek girişime neden olup olmadığı kontrol edildi.

Özgünlük kabul kriterleri:

Testte, blank ve numunesiz hücre kuyucuklarında ölçülen absorbans değeri, sıfıra yakın ve/ya da minimum konsantrasyona sahip referans standardı ile ölçülen absorbans değerinden küçük olmalıdır.

3.6.2. Doğrusallık (linearity) ve ölçüm aralığı (measurement range)

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Metot validasyon çalışmalarında analitin konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır. Eurachem rehberinde en az 6 noktada, birde kör eklenerek ve her bir noktada tekrar sayısı 3 olarak, ISO 11095'de en az 3 farklı seviyede referans örnek ve tekrar sayısı ise en az 2 olarak belirtilmiştir. Her bir nokta ana çözeltiden seyreltmeler yapılması yerine bağımsız olarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktası uygulanan analiz metodunun tayin limitidir.

Doğrusallık kabul kriterleri:

- Korelasyon kat sayısı (R) 0.99'den az olmamalıdır.
- Eğim (m), residual sum of squares (RSS)(artıkların kareleri toplamı) raporlandırılmalıdır.
- Numuneler 6 tekrarlı çalışılmalıdır.
- $\frac{Ykesimnoktasi}{\%100\ seviyedekialan} \times 100 \leq \%\ 2.0$

3.6.3. Doğruluk (accuracy)

Analitik metot validasyonunda doğruluk ölçülen değerin doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir ifadedir. Mutlak hata ya da bağıl hata ile verilir. Uluslararası bağımsız laboratuvarlar tarafından tayin edilmiş değerleri doğru değer olarak kabul edilen Referans Satndardın tayininden elde edilen sonuç ile aynı maddenin kullanılan yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılır. Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden üçer ölçüm alınır, hesaplanan konsantrasyon değerlerinden % geri kazanım değerleri bulunarak bu değerlerin ortalamaları alınır.

$$\%\ \text{Geri Kazanılan Miktar} = \frac{\text{Deneysel (tespit edilen) miktar}}{\text{Teorik (ilave edilen) miktar}} \times 100 \qquad (3.1)$$

Doğruluk kabul kriterleri

- Her bir geri kazanım % 80.0 - % 120.0 arasında olmalıdır.
- Her bir konsantrasyon için RSD % 2.0’ den fazla olmamalıdır.

3.6.4. Kesinlik (precision)-tekrarlanabilirlik

Ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığını (tekrarlanabilirliği) gösterir. Standart sapma, Bağıl standart sapma, Varyans ya da varyasyon katsayısı ile verilir.

Kesinlik (Precision)-Tekrarlanabilirlik Kabul kriterleri:

- Ardışık çalışılan 6 numuneden elde edilen sonuçların rölatif standart sapması % 2.0’dan fazla olmamalıdır.
- % 95 güven aralığı hesaplandı.

$$\text{Güven aralığı} = \chi \pm t_{n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \qquad (3.2)$$

χ : ortalama değer

n : hesaplanacak data sayısı

s : standart sapma

t_{n-1} : coefficient of confidence % 95 n= 6 $t_{n-1} = 2.57$

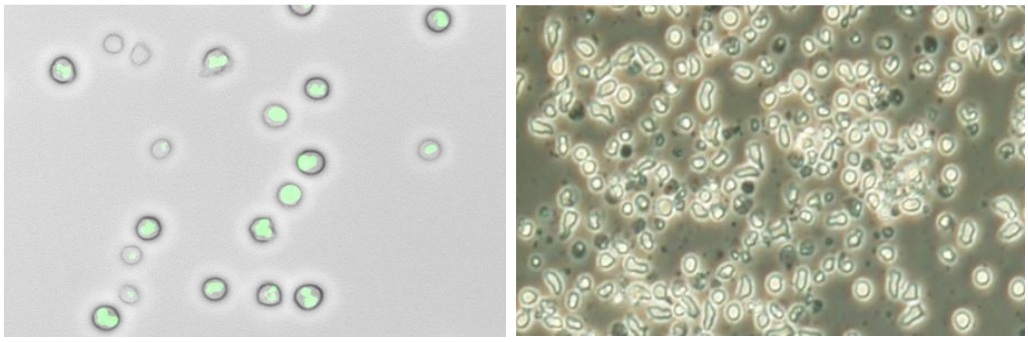
3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada istatistiksel analiz yapılmamıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Çoğaltma ve Pasajlama Sonuçları

Biyolojik ürün örnekleri ve tıbbi cihaza ait numunelerin pirojenite tayinini yapabilmek için ilk basamak kit ile gelen hücrelerin başarılı şekilde çoğaltılmasıdır. Primer hücreler sağlıklı donörlerden elde edildiği için deneyler için hazırlanması, çoğaltılması kritik aşamalardan biridir. Çalışmada, kitten çıkan hücrelerin T 25cm^2 kültür kabında ilk çoğalmaları sırasında 10. gün ve 30. gün sonrasında konfluens hücreler sırasıyla Şekil 4.1'de yer almaktadır.



A. B.

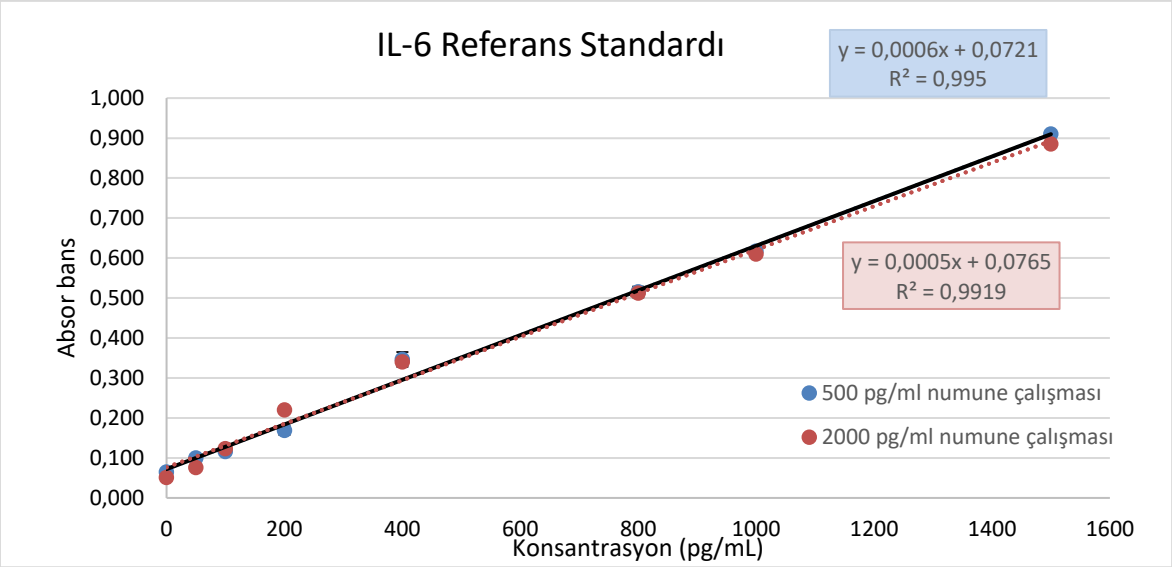
Resim 4.1. Örnek PMBC hücreleri A.(10. gün), B. (30. gün)

4.2. Numunelerde Projenite Tayini

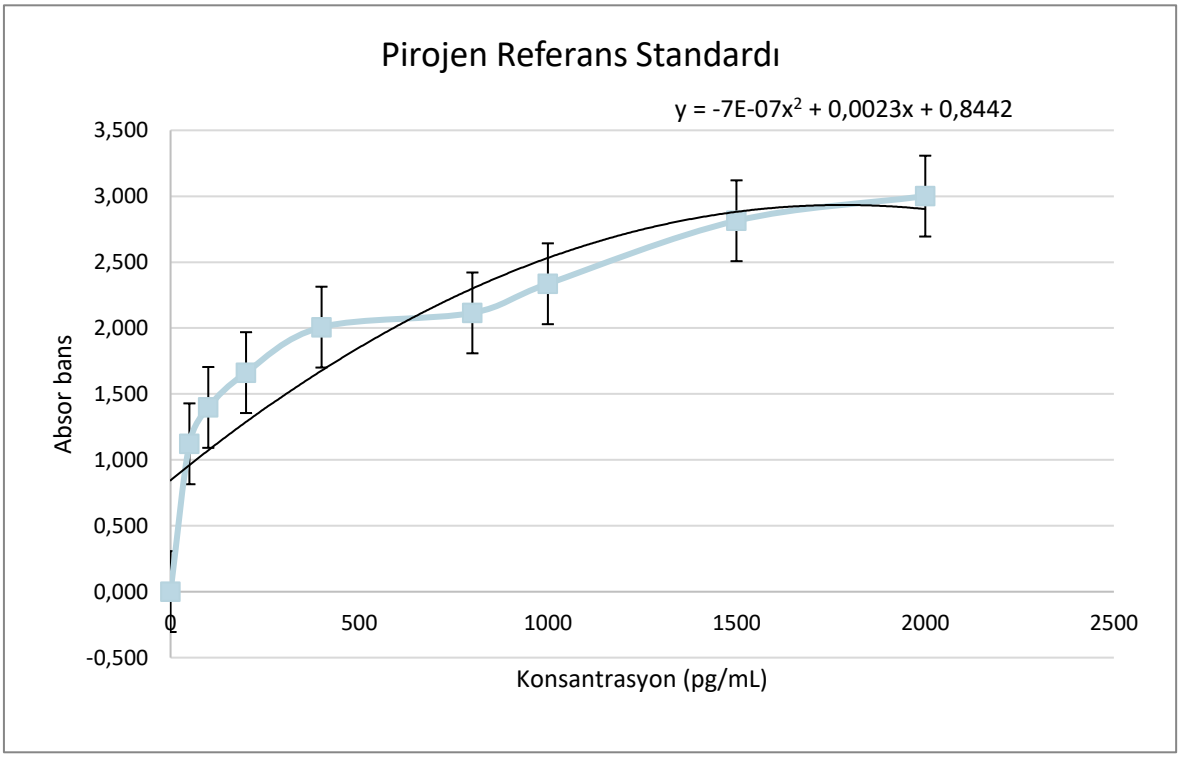
4.2.1. Monosit Aktivasyon Test sonuçları

Monosit Aktivasyon Test kiti ile hücreler hazır hale geldikten sonra, biyolojik ürünler olan X, Y-AS, RK-A, RK-B, Z-Ig ve tıbbi cihaz olan V-O ürünleri 500 pg/ml ve 2000pg/ml konsantrasyonda pirojeniteleri için değerlendirilmiştir. Kullanılan kit protokolü ve limitleri kapsamında IL-6 üst limiti 2000pg/ml konsantrasyondan daha altında ürünler apirojen olarak değerlendirilmektedir.

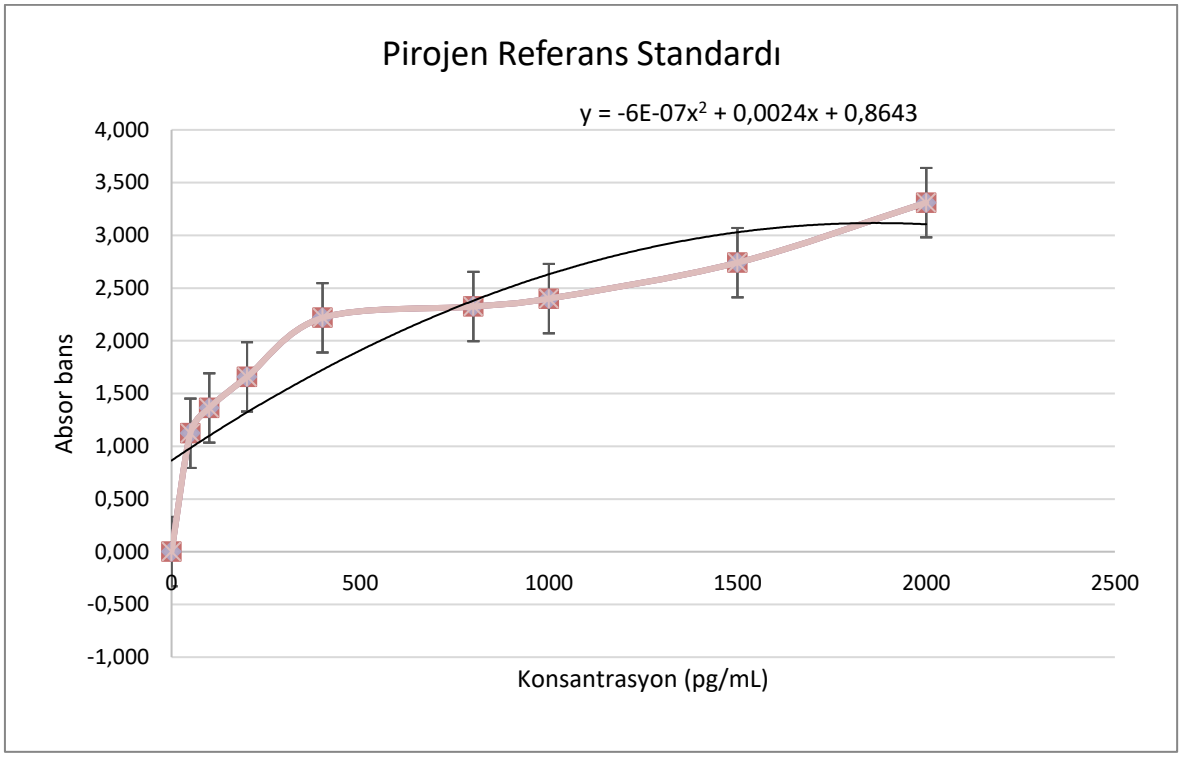
Sonuçları değerlendirebilmek için 500 pg/ml ve 2000pg/ml konsantrasyonda IL6 kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.2.) ve endotoksin referans standart polinomal eğrisi (Şekil 4.3) yer almaktadır.



Şekil 4.1. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen IL-6 Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi



Şekil 4.2. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen Pirojen Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi (500 pg/ml numune çalışması)



Şekil 4.3. PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen Pirojen Referans Standardının konsantrasyona karşı absorbans eğrisi (2000 pg/ml numune çalışması)

Projenite doğası gereği PeliKine Compact® kiti içerisinde verilen Pirojen Referans Standart eğrisi polinomal olup lineer değerlendirme yapılmamaktadır.

Her bir biyolojik ürün numunesi, tıbbi cihaz ürün numunesi, standart numuneler için elde edilen absorbans ve karşılık gelen pirojen konsantrasyonu Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Biyolojik ürün numunesi, tıbbi cihaz ürün numunesi, standart numunelerin pirojen konsantrasyonu

Numune Adı	500pg/ml ort absorbans*	2000pg/ml ort absorbans *	Kör ort abs*	500pg/ml ort konsantrasyon**	2000pg/ml ort konsantrasyon**
Kör	0,001	0,001	0,001	0	0
RK-A ve RK-B	0,001	0,001		0	0
Z-Ig	0,001	0,001			
Y-AS	0,001	0,001			
X-A	0,001	0,001			
V-O	2,295	2,237		3703,44±0,120	4625,25±0,089

*6 örnek için Ortalama Absorbans Değeri; **IL-6 doğru denklemine göre (y=0,0006x-0,0721) 500ppm için elde edilen pirojen konsantrasyonu(pg/ml); ***IL-6 doğru denklemine göre (y=0,0005x-0,0765) 2000ppm için elde edilen pirojen konsantrasyonu(pg/ml); IL-6 Standart, IL-6; RK-A ve RK-B,rekombinant biyobenzer ürün numunesi; Z-Ig, immunglobulin biyolojik ürün numunesi; Y-AS, antiserum biyolojik örnek numunesi; X-A, aşı biyolojik örnek numunesi; V-O, Vaijinal ovül tıbbi cihaz örneği numunesi

Bir ürünün pirojen kabul edilmesi için MAT'ye yönelik kullanılan kitteki en yüksek IL 6 kalibrasyon konsantrasyonunun üstünde bir konsantrasyon gözlenmesi gerekmektedir. Tek başına uygulanan biyolojik ürün numunelerinde elde edilen absorbans ve karşılık gelen konsantrasyonlar incelendiğinde, kör ile elde edilen absorbansa karşılık gelen konsantrasyonlar ile aynıdır ve en düşük IL 6 konsantrasyonundan da düşüktür. Bu da çalışmamızda kullanılan biyolojik ürünlerin pirojen olmadığını göstermektedir. Biyolojik ürünler, endotoksin referans madde ile birarada kullanıldığında da pirojen yanıt göstermediği için yani endotoksin referans maddenin tek başına verdiği yanıtı artırmadığı için hem gram negatif hem de gram pozitif endotoksin içermedikleri gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

Tıbbi cihaz örneği olan vajinal ovül numunesinde ise diğerlerinden farklı olarak uygulanan iki konsantrasyonda da IL 6'nın en yüksek konsantrsyonu olan 2000 pg/ml üzerinde; 3945.44 pg/ml ve 4627.25pg/ml (Çizelge 4.1) pirojen konsantrasyonu elde edilmiştir ve pirojen olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, vajinal ovül numunesinin endotoksin referans madde ile bir arada uygulandığında absorbans okunamayacak kadar yükselmiştir (Çizelge 4.1). Çalışmamızdaki bu veri, pirojen içerikli vajinal ovülün pirojen kaynağının endotoksin kaynaklı olduğunun göstergesidir.

4.3. Monosit Aktivasyon Testi Validasyon Sonuçları

4.3.1. Özgünlük kabul kriteri

- Kabul kriteri: 96 kuyucuklu kültür kabında kör ve numunesiz hücre kuyucuklarında ölçülen absorbans değeri, sıfıra yakın ve/ya da minimum konsantrasyona sahip IL-6 referans standardı ile ölçülen absorbans değerinden küçük olmalıdır.
- Elde Edilen Bulgu: Elde edilen sonuçlarda kör çözeltileri ve numunesiz kuyucuklarda ölçülen absorbans değeri cihazın minimum ölçüm limiti olan 0,001 olarak ölçülmüştür.

Validasyon çalışmasının özgünlük kriterini sağladığı hesaplanmıştır.

4.3.2. Doğrusallık (linearity) ve ölçüm aralığı (measurement range) kabul kriteri

- Korelasyon kat sayısı (R) 0.99'den az olmamalıdır.

Konsantrasyonu bilinen IL-6 standart çözeltilerinde gerçekleştirilen absorbans ölçümleri için elde edilen eğri grafiğinin denklemi:

Absorbans = (0,0005 x konsantrasyon) -0,0721 (4.1)

Hesaplanan R^2 değeri > 0,99 'dur.

Validasyon çalışmasının doğrusallık kriterini sağladığı hesaplanmıştır.

Numunelerin içerisindeki olası pirojen varlığını ölçmek üzere kullanılan kit içerisinde bulunan pirojen referans standardı ile çizilen konsantrasyona karşı absorbans eğrisinin pirojen varlığında olası pirojen konsantrasyonunun hesaplanması için kullanılmaktadır. O nedenle pirojen referans standardında polinomal eğri elde edilmiştir.

4.3.3. Doğruluk (accuracy) kabul kriteri

Biyolojik ürün numuneleri ve tıbbi cihaz ürün numunesine 1000 pg/ml referans pirojen standardı ilave edilerek (Çizelge 4.2) %geri kazanım hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{Geri Kazanılan Miktar (GM)} = \frac{\text{Deneysel (tespit edilen) miktar}}{\text{Teorik (ilave edilen) miktar}} \times 100 \quad (4.2)$$

Biyobenzer (RK-A ve RK-B) ilaç Numunesi: (2,056+2,084)/2= 2,070

1000pg/ml referans standart çözeltisinin ölçülen absorbans değer ortalaması (2,308+2,364)/2= 2,336

$$\%\ GM_{\text{RK-A ve RK-B}} = 2{,}070/2{,}336 \times 100\% = \%88{,}6 \quad (4.3)$$

Validasyon parametrelerinden doğruluk parametresi için sonuçlar aşağıdaki tabloda sunulmaktadır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Numuneler ve % geri kazanılan miktarları

Numune	% Geri Kazanılan Miktar
Biyobenzer ilaç Numunesi:(RK-A ve RK-B)	88,6
Aşı Numunesi (X aşısı)	99,1
Antiserum Numunesi (Y-AS antiserumu)	96,9
Kan Ürünü Numunesi (Z-Ig kan ürünü)	100,1
Vajinal ovül (V-O vajinal ovülü)	*

* Limit dışı durum söz konusu olduğu için sonuç hesaplanamamıştır.

Sunulan validasyon çalışması doğruluk kabul kriterini sağlamaktadır.

4.3.4. Kesinlik (precision)-tekrarlanabilirlik kabul kriterleri

- Ardışık çalışılan 6 numuneden elde edilen sonuçların rölatif standart sapması % 2.0' dan fazla olmamalıdır.
- % 95 güven aralığı hesaplanmalıdır.

Çalışmamızda kullanılan tüm farmasötik numunelerle 6 örnekten okunan absorbans sonuçları, 0,0001 olarak elde edilmiştir. Kör çözeltisi ile de aynı absorbans ölçülmüş olup, % 95 güven aralığında rölatif standart sapması % 2.0'den küçük olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan vajinal ovul numunesinde ise 6 örnekten okunan absorbans sonuçları okuma limitinin üzerinde çıkmıştır. Bu nedenle hesaplama yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

Günümüzde, deney hayvansız yöntemlere eğilim oldukça artmıştır. Dayanağı ve asıl başlangıcı Russel ve Burch'un etik kaygılar nedeniyle ortaya koyduğu 3R kuralına dayanmaktadır (Russell ve Burch, 1959). Kuralda yer alan 3R; yerine koyma (Replacement), azaltma (Reduction) ve iyileştirme (Refinement) anlamındadır. Avrupa Konseyinin Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılan Omurgalı Hayvanların Korunmasına İlişkin Avrupa Sözleşmesi de hayvan refahı açısından önemli bir adımdır (ETS 123-Protection of Vertebrate Animals, 1986). Geçerlenmesi (validasyonu) yapılmış yani *in vivo* eş değer testin sonuçları ile benzer, tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arası uyumlu sonuçlar veren *in vitro* testler (ICCVAM, 2006; https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC44990) ve yaklaşımlar gıdadan ilaca pek çok etkenin yasal düzenlemelerinde yani regülasyonlarında kullanılmaya ve tercih edilmeye başlanmıştır. Bu tür yöntemler, alternatif yöntemler ya da testler olarak dile getirilmektedir. Alternatif yöntem denilen bu *in vitro* testlerin validasyonunda izlenecek yol ve testlerin validasyonu Avrupa Birliğinde ECVAM, ABD'nde ise ICCVAM'ın gözetiminde yapılmaktadır (ECVAM, 1991; ICCVAM, 2002). Ek olarak, bazı gelişmiş Japonya ve Kore gibi ülkelerin de 'Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması için Japon Merkezi (JACVAM)' ve 'Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması için Kore Merkezi (KOCVAM)' gibi enstitülerin laboratuvarlarında ve gözetiminde yapılmaktadır. Çoğunlukla bu tür oluşumlar birbirleri ile iletişim halinde olup zaman zaman da birlikte çalışmaktadır (JACVAM, 2008; KOCVAM, 2012). Adı geçen valide edilmiş *in vitro* testler regülasyonlardan sorumlu otoritelerin kılavuzlarında da etkenlerin yasal düzenlemelerinde kullanılmak üzere yer bulmaktadır ve kullanılmaktadır. *In vivo* yöntemlerin *in vitro* alternatiflerini kılavuzlarında bulunduran otoriteler arasında; OECD, Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (ICH), FDA, EMA, Avrupa Kimyasallar Ajansı (ECHA), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve farmakopeler sayılabilir (Avrupa Farmakopesi, Amerikan Farmakopesi, Hindistan Farmakopesi, Çin Farmakopesi, Türk Farmakopesi gibi, EP 2.6.8, USP <85>, JP 4.04, IP 2.2.28, CP 1142). Alternatif yöntemler incelendiğinde, ECVAM'da 200, ICVAM'da 139, JACVAM'da 73 ve KOCVAM'da ise 19 kadar test görülmektedir (https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/search/?filter=SCIENCE_AREA:S009); https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html; https://www.jacvam.jp/en/list.html;http://www.nifds.go.kr/kocvamen/content/content_4_3.jsp).

Biyolojik ürünler son dönemde alternatif yöntemlerin konusu olmaya başlamıştır. Etkin madde ya da maddeleri biyolojik bir kaynaktan gelen ya da biyolojik bir kaynaktan saflaştırılmış, imalat süreci, kalitesi ve kontrolleri biyolojik ve fizikokimyasal testlerle beraber gösterilen tedavi amaçlı kullanılan ürünler olarak tanımlanmaktadır ve aralarında aşılar, antiserumlar, allerjenler, kan ürünleri, ileri tedavi tıbbi ürünleri, hibridoma ve monoklonal antikor yöntemlerle elde edilen ürünler bulunmaktadır (Biyobenzer Tıbbi Ürünler Hakkında Kılavuzu, 2021); FDA, 2015; EMA, 2012). Biyolojik ürünlerin kullanılmaya başlanması ile bazı hastalıkların tedavisi kökten değişmeye başlamıştır. Yeni biyolojik ürünlerin keşfedilme potansiyeli, çeşitli tedavi ihtiyaçlarına yönelik umut vericidir. Biyoteknolojik yöntemlerle üretilen biyolojik ürünler, epidemiyolojik ve klinik yönden çoğu ciddi hastalıkların tedavilerinin geliştirilmesini mümkün hale getirmekte ve giderek artan nüfusun sağlık ihtiyacına çözümler üretilebilmektedirler (EMA, 2011; WHO, 2009). Dolayısıyla, gerekli güvenlik testlerinden geçip piyasaya çıkmaları gerekmektedir.

Biyolojik ürünlerin, test edilmelerinde pirojenitenin önemli yeri bulunmaktadır. Biyolojik ürünlerde pirojen kaynaklarının en ciddilerinden biri olan endotoksinlerin; yüksek sıcaklık, yüksek pH seviyesine ve otoklavlama işlemlerine dayanıklı kararlı yapıları bulunmaktadır. Ayrıca son zamanlarda özellikle gram negatif bakteriler (*E.coli* vs) kullanılarak ve özellikle kanser tedavisi ile hastaya özgü biyolojik ilaç gelişiminde nanoteknoloji kullanılarak üretilen ilaçlar tedavide yerlerini almaktadır. Bu yöntemle üretimlerde amaç; sistematik toksisiteyi azaltmak, farmakokinetik profilleri iyileştirmek ve terapötik etkinliği artırmak için küçük moleküllü kemoterapötik ilaçları formüle etmektir (Chauan, 2013; Duncan, 2006). Bu nedenle özellikle biyolojik ürünlerde giderek daha fazla nanomalzeme kullanımı ile karşılaşılmaktadır. Kullanılan nanomalzemelerin şekilsel boyutları, malzeme üzerinde yer alan mikroorganizma yükleri ve hedefleme ligandı gibi hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri sebebi ile LPS ile etkileşime girmektedir. LPS ile etkileşime girmesinden dolayı nanomalzemelerin uygulanışından önceki nanogüvenlik seviyelerinin değerlendirilmesi giderek önemli hale gelmektedir. Ancak ilaç ile yüklü nanopartiküllerde endotoksin saptanmasının LAL testi ile yanlış pozitif sonuçlar verdiği de gözlemlenmiştir. Nanoformülasyonun karmaşıklığı sebebi ile nanoteknoloji ile üretilen biyolojik ürünlerde ve tıbbi cihazlarda pirojen saptanmasında LAL Testi ve RPT'nin yerine yeni teknolojilerin geliştirilmesi gerekliliği önerilmiştir (Darkow, 1999; Vetten, 2014).

Üretilen biyolojik ürünlerin giderek yaygınlaşan kullanımı göz önünde bulundurulduğunda endotoksinlerin belirlenmesi, biyolojik ürünlerin hem üretiminde hem de kalite kontrol testlerinde kritik bir parametredir (Das, A. P., Kumar, P. S., Swain, S., 2014). Yüksek riskli hastalarda, gram negatif bakterilerden kaynaklı toksinler yani endotoksinler ile ilgili araştırmalarda mortalite %30- %40 olarak saptanmıştır. Yoğun bakım ünitelerindeki hastaların ölüm nedenlerinin arasında gram negatif bakterilerden kaynaklı toksinler en önemli nedenler arasındadır ve yıllık insidansı 18 milyon olarak saptanmıştır (Daniels, 2009). Ayrıca dünyada ölüm nedenlerinin yılda 750.000'i sepsis olarak belirlenmiştir ve ABD'de yılda sepsis nedeni ile yaklaşık 250.000 ölüm kaydedilmiştir (Blanco, 2008; Karlsson, 2007). Dolayısıyla kullanıma girecek bir biyolojik ürünün yasal düzenlemesinde, pirojen yokluğunun saptanması zorunludur. Pirojenite testlerinin ilk kullanımı RPT ile olmuş, onu Bakteriyel Endotoksin Testlerinden LAL ve rFC testleri avantajları ile takip etmiştir. *In vivo* RPT'nin ilk kez farmakopelerde yer alması 1942 yılına dayanmaktadır. Test, günümüzde de BET ile birlikte EP ve USP'de yer almaktadır. Mevcut pirojenlerin çeşitliliği göz önüne alındığında, BET yalnızca potansiyel kirleticiler endotoksin olduğunda RPT'nin yerini almak için kullanılmalıdır. Çoğu zaman içerdikleri adjuvanlar ve koruyucular nedeniyle RPT ve LAL ile aşılarda da yanlış pozitif ya da negatif sonuçlar alındığı durumlarla karşılaşılmaktadır (Park, C. Y., Jung, S. H., Bak, J. P., Lee, S. S., Rhee, D. K, 2005; Rosenqvist, 1998; Vipond 2016). Ayrıca, RPT'nin, radyoterapötikler ya da kemoterapötikler, analjezikler, steroidler, sitokinler, dopamin ve immünosupresif ajanlar gibi belirli farmasötik ürünler için uygun olmadığı bildirilmiştir (Daneshian, M., Von Aulock, S., Hartung, T., 2006; Greenhough, 2016). Özellikle plazma kaynaklı intravenöz immünglobulinlerde (IVIG); BET ile RPT karşılaştırıldığında, RPT'de yanlış pozitif sonuç gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin de immünglobülinler (Ig) tavşan kanına çok güçlü bağlanırken insan kanındaki beyaz kan hücrelerine bağlanmadığı tespit edilmiştir (Rosenqvist, 1998; Vipond, 2016). Dolayısıyla, pirojenlerin saptanmasında adı geçen yöntemlerden hiçbiri hem endotoksin hem de endotoksin olmayan pirojen kaynaklarını güvenli tespit edememektedir.

Ancak, bu olumsuzluğa çözüm olabilecek MAT *in vitro* bir yöntem olarak 2006 ve 2008'de ECVAM ve ICCVAM tarafından valide edilmiş ve düzenleyici otoritelerin kılavuzlarında yayımlanmıştır. Test, tüm pirojen kaynaklarını belirleyebilecek özelliktedir. Özellikle, endotoksin olmayan pirojenleri de maskeleme yapmadan saptamaktadır (Ochiai, M., Yamamoto, A., Naito, S., Maeyama, J. I., Masumi, A., Hamaguchi, I., Yamaguchi, K.,

2010), Yöntem nicel değerlendirmeye de olanak vermektedir. Ayrıca, kullanılan hücreler insan kaynaklı olduğu için insan cevabını taklit eden bir yöntemdir**.** Test; Avrupa, Amerika, Hindistan, Japon ve Çin Farmakopelerine de girmiştir. Test; ABD, Hollanda, Almanya, Brezilya, İngiltere, İtalya, İsviçre, Hindistan, Rusya ve Çin ülkelerinde kabul görmektedir. Ancak bunun yanı sıra temkinli davranan ve MAT'ın tamamen diğer pirojen testlerinin yerini almasının henüz değerlendirmesini onaylamayan Japonya (https://www.jacvam.jp/en/international-acceptance-test) gibi ülkelerde bulunmaktadır. Pirojenlerin güvenli, sağlıklı, ucuz, deney hayvansız, az emekle ve hızlı saptanabilir olmasını MAT'nin sağlaması, özellikle küresel salgın gibi durumlarda aşılar da dahil parenteral biyolojiklerin ülkelere ve bireylere hızlı ulaştırılması için tercih edilmelidir.

Yöntemin ucuz olması noktasında ülkemizden örnek verebiliriz. Ülkemizdeki *in vivo* RPT için yıllık ihale ve bedel bilgileri incelendiğinde MAT avantajı daha açık görülmektedir. 2023 TİTCK Analiz ve Laboratuvar Birimi Fiyat Listesinde her RPT yapılması ve sonlandırılması için 12.122,93 TL ödemesi yapılmakta olup test tekrarı durumlarında aynı bedelin ödemesi gerçekleştirilmektedir. RPT hazırlığı için tavşanların barınması, beslenmesi, kontrolleri için veteriner hekim bulundurma zorunluluğu göz önünde bulundurulduğunda yaklaşık olarak bir test bedeli 40.000 TL'ye ulaşmaktadır. Oysa bir MAT Kiti şu anki bedeliyle 10.000TL'dir. Ayrıca, aynı kit ile sadece bir ürün değil en fazla 8 ürün değerlendirilebilmektedir.

Araştırmamız, ülkemizde bugüne kadar hiçbir çalışmada ele alınmamış MAT'yi biyolojik ürünlerde ve vücut içi tıbbi cihazlarda ilk kez kullanmaya yöneliktir. Çalışma, bir TÜBİTAK Projesi (İlaç, Kozmetik, Vücut İçi Tıbbi Cihazlara Uygulanmak Üzere *In Vitro* Pirojenite Test Metodu Geliştirme Çalışması'' adlı ve TEYDEB 7210280 numaralı) kapsamında yöntemin validasyonunun yapılmasını da içermektedir. Apirojen olduğu *in vivo* RPT ile kanıtlanmış, TİTCK tarafından ruhsatlanmış ya da acil kullanım onayı almış ticari olarak piyasada bulunan ürünlerde (intravenöz immunglobulin, Covid-19 aşısı, akrep antiserumu ve iki adet biyobenzer ürün) MAT'yi kullandığımızda bu ürünlerin RPT'ye paralel olarak pirojenik etki göstermediği saptanmıştır. Aynı şekilde, tıbbi cihazlar için de özellikle son ISO rehberinde de pirojenite tayini zorunlu hale getirlip, MAT kullanılabileceği ilk kez belirtildiği için çalışmamızda yer verdiğimiz vajinal ovül tıbbi cihazı örneğinde de MAT uygulanmıştır. Ancak, bu tıbbi cihaz umulmadık şekilde pirojen olarak saptanmıştr. Kontaminasyon riski göz önünde bulundurularak test tekrarlanmış ve sonuçlar yine

pirojeniteyi göstermiştir. İki farklı 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılarak (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3) çalışılan iki farklı hedef dozdan (500pg/ml ve 2000 pg/ml) 500 pg/ml hedef doz ile yapılan çalışma tasarımında vajinal ovül numunesi üzerine referans standart ilave edilen kuyucuklarda (G-8 ve H-8) çok yüksek endotoksin miktarı sebebi ile ELIZA okuyucu cihazında pirojen konsantrasyonu "OL" limit üstü olarak değerlendirilmiştir. Vajinal ovül numunesindeki endotoksin konsantrasyon miktarını nicel olarak saptayabilmek için ikinci hedef doz olan 2000 pg/ml numune konsantrasyon çalışmamızda referans standart eklemeden (Çizelge 3.3, G-8 ve H-8) çalışma yapılarak nicel değer elde edilmiştir. Bu veriler ışığında pirojen olduğu saptanan vajinal ovül numunesinin endotoksin kaynaklı pirojen olduğu sonucu ile içerdiği endotoksin miktarı belirlenebilmiştir.

Çalışmamızı, bilimsel literatürdeki çalışmalar arasına koyacak olursak, ulaştığımız sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

Kullandığımız MAT, 2009-2020 yılları arasında, 16 bilimsel araştırma makalesinde yer almıştır (Çizelge 5.1.). 16 adet bilimsel çalışmadan 14 tanesi tek bir örneğe yönelik yapılmıştır. Bunlar, antiserum (Da Silva, C. C., Presgrave, O. A. F., Hartung, T., de Moraes, A. M. L., Delgado, I. F., 2016; G. Solano, A. Gomez and G. Leon., 2015; Utescher ve diğerleri, 2018), hepatit-B aşısı (He, Q., Gao, H., Xu, L. M., Lu, Y., Wang, C., Rui, J., Wang, J. Z., 2018), meningokok aşısı (Vipond, C., Sutherland, J., Nordgren, K., Kemp, G., Heath, A., Care, R., Studholme, L., 2019), kuduz aşısı (He ve diğerleri, 2018), *Shigella sonnai* aşısı (Gerke, C., Colucci, A. M., Giannelli, C., Sanzone, S., Vitali, C. G., Sollai, L., Saul, A., 2015), *Neisseria meningitidis* aşısı (Stoddard, M. B., Pinto, V., Keiser, P. B., Zollinger, W., 2010), albümin (He ve diğerleri, 2018; Solati S, Zhang T, Timman S., 2022), immünoglobulin (Ochiai ve diğerleri, 2010), sarıhumma aşısı (De Mattos, K. A., Navega, E. C. A., Silva, V. F., Almeida, A. S., da Silva, C. C., Presgrave, O. A. F., Delgado, I. F., 2018), kene kaynaklı Ensefalit virüsü (Etna, M. P., Giacomini, E., Rizzo, F., Severa, M., Ricci, D., Shaid, S., Coccia, E. M., 2020) ve (kaynakları) biyolojik örnekleri ile hava örneğidir (Daneshian ve diğerleri, 2009). He ve diğerleri tarafından ayrıca pegIFN-α2β ürünlerine de uygulanmıştır (He ve diğerleri, 2018). Yanı sıra, piyasadan temin edilen implant, greft ve stent tıbbi cihazlarına yönelik 2014 yılında Stang ve arkadaşlarının MAT kullanımı çalışması vardır ve stent örneğinde pozitif sonuç bulunmuştur (Stang ve diğerleri, 2014). Adı geçen araştırmalarda, tıbbi cihaz olan stend dışında piyasadaki ürünlerin hiçbiri pirojenik aktivite göstermemiştir. Günümüze kadar Türkiye'de MAT kullanan bir araştırmaya

rastlanmamıştır. Çalışmamızda ele alınan biyolojik ürün ve tıbbi cihazdan oluşan ürün skalası da bir ilktir. Çizelge 5.1'den de anlaşılacağı üzere birden fazla biyolojik ürünü konu eden tek bir çalışma(He ve diğerleri, 2018) bulunmaktadır. Hem biyolojik ürün hem de tıbbi cihaz çalışan araştırmamız dışında bir çalışma ile de karşılaşılmamıştır. Ayrıca, validasyon basamaklarını da gösterdiğimiz çalışmamıza benzer, sadece iki araştırmada validasyon basamakları da kullanılmıştır (Etna ve diğerleri, 2020; Vipond ve diğerleri, 2019).

Çizelge 5.1. Monosit Aktivasyon Testinin kullanıldığı biyolojik ürünler ve tıbbi cihazlar

MAT kullanılan ürün	**Sonuç (-/+)**	**Validasyon basamağı (var /yok)**	**Yayımlanma yılı**	**Kaynak**
Hava örneği	-	Yok	2009	Daneshian ve diğerleri, 2009
Neisseria meningitidis aşısı	-	Yok	2010	Stoddard ve diğerleri, 2010
İmmunoglobulin	-	Yok	2010	Ochiai ve diğerleri, 2010
Daunorubisin	-	Yok	2013	Hasiwa ve diğerleri, 2013
Stent İmplant Greft	+ - -	Yok	2014	Stang ve diğerleri, 2014
Hiper immünsera	-	Yok	2015	Solano, Gomez ve diğerleri, 2015
Shigella sonnei aşısı	-	Yok	2015	Gerke ve diğerleri, 2015
Hiper immünsera	-	Yok	2016	Da Silva ve diğerleri, 2016
Kuduz aşısı Hepatit-B aşısı Albümin İmmunoglobülin pegIFN-α2β	- - - - -	Yok	2018	He ve diğerleri, 2018
Hiper immünsera	-	Yok	2018	Utescher ve diğerleri, 2018
Sarı humma aşısı	-	Yok	2018	Demattos ve diğerleri, 2018
Meningokok aşıları	-	Yok	2018	Studholme ve diğerleri, 2018
Meningokok aşıları	-	Var	2019	Vipond ve diğerleri, 2019
Kene kaynaklı ensefalit virüsü aşısı	-	Var	2020	Etna ve diğerleri, 2020
Albümin	-	Yok	2022	Solati ve diğerleri, 2022
Covid-19 aşısı (X) Akrep antiserumu (Y-AS) Rekombinant biyobenzer ürün-1 (RK-A) Rekombinant biyobenzer ürün-2 (RK-B) İmmuboglobülin Z-Ig Vajinal ovül (V-O)	- - - - - +	Var	2023	ÇALIŞMAMIZ

Avrupa Farmakopesi 2021 yılında yapmış olduğu duyuru ile yaklaşık 5 yıl içinde RPT'nin tamamen değiştirilmesine yönelik bir yola girme kararı aldığını açıklamıştır (https://www.edqm.eu/en/-/european-pharmacopoeia-to-put-an-end-to-the-rabbit-pyrogen-test). Ülkemizdeki sağlık otoritesi olan TİTCK; kalite kontrol analizleri ve ürünlerin ruhsatlandırılması kapsamında Avrupa Birliği regülasyonlarını birebir takip etmektedir. Pirojenite testi ile ilgili Avrupa Farmakopesindeki güncellemeler, Türk Farmakopesine 2017 yılında uyarlanmıştır (Türk Farmakopesi, 2017). TİTCK resmi internet sitesinde, belirtilen standartları sağlaması durumunda ruhsatlandırılmış beşeri tıbbi ürünlerin, ambalaj bilgileri ve Kullanma Talimatı (KT) nda 'apirojen ifadesinin yer alması gerektiğini ve ürüne spesifik validasyonu sağlanması durumunda tavşanda pirojenite testi yerine EP "2.6.30. Monosit Aktivasyon Testi"nin kullanılabileceği'ni duyurmuştur (https://www.titck.gov.tr/duyuru/parenteral-preparatlarda-apirojen-ifadesi-122018173955). Buna rağmen, MAT ülkemizde henüz uygulanmamaktadır. Çalışmamızın bu anlamda diğer bir sonucu da yöntemin valide bir yöntem olarak alternatif testler arasında kullanılabilirliğini göstermiş olmaktır. Böylece, Ülkemizde ilk kez kullanılan MAT alternatif yönteminin uygulamaya da geçmesi için bir adım atılmıştır.

Çalışmada yer alan araştırıcının yürütücü olduğu projenin bir sonraki basamağı olarak da kitin ülkemizde de yerli olarak üretimi hedeflemektedir. Böylece MAT'nin kullanımı ile dışa bağımlı olmadan kolay ve ucuz erişim sağlanabilecektir.

6. SONUÇLAR

Ülkemiz biyolojik ürünlerin kullanıcıya ulaşması aşamasındaki kalite kontrol analizleri ve ruhsatlandırma prosedüründe öncelik sırasına göre EMA ve FDA regülasyonlarını izlemektedir.

Alternatif testlerin kullanımı tüm dünyada hızla yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda pirojen testi olarak kullandığımız MAT'nin sağladığı sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Pirojen testinde kullanılan LAL ile sadece endotoksin kaynaklı pirojenlerin saptaması yapılırken, MAT kiti ile endotoksin saptamasının yanı sıra endotoksin olmayan pirojenler de saptanmaktadır.
- Pirojen testinde geleneksel kullanılan RPT'de tavşan kullanımı kaynaklı yüksek emek, zaman, bedele karşın MAT her açıdan avantajlıdır.
- Test, insan hücreleri ile nicel değerlendirmeye olanak vermektedir.
- Kapsamlı bir biyolojik örnek skalasında çalışılmıştır.
- Ülkemiz için MAT ile ilk bilgileri üretmiştir.
- Tıbbi cihazlarda pirojenite testleri henüz zorunlu hale getirilmişken MAT uygulaması ile güncel gelişmeler takip edilmiştir.
- Ülkemiz sağlık otoritesinin, uluslararası regülasyonlara uyum konusunda validasyon basamağı ile dikkat çekici sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

Abate, W., Sattar, A. A., Liu, J., Conway, M. E., Jackson, S. K. (2017). Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. *Journal of Medical Microbiology*, *66*(7), 888-897.

Alwis, K. U., Milton, D. K. (2006). Recombinant factor C assay for measuring endotoxin in house dust: Comparison with LAL, and (1→ 3)-β-D-glucans. *American Journal of Industrial Medicine*, *49*(4), 296-300.

Bolden, J. S., Claerbout, M. E., Miner, M. K., Murphy, M. A., Smith, K. R., Warburton, R. E. (2014). Evidence against a bacterial endotoxin masking effect in biologic drug products by limulus amebocyte lysate detection. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *68*(5), 472-477.

Bolden, J., Smith, K. (2017). Application of recombinant factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *71*(5), 405-412.

Borton, L. K., Coleman, K. P. (2018). Material-mediated pyrogens in medical devices: Applicability of the *in vitro* monocyte activation test. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, *35*(4), 453-463.

Bowie, A. G., Haga, I. R. (2005). The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular immunology*, *42*(8), 859-867.

Brown, J., Clippinger, A. J., Briglia, C. F., Casey, W., Coleman, K., Fritsch, A., Allen, D. (2021). Using the monocyte activation test as a stand-alone release test for medical devices. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, *38*(1), 151-156.

Carson, D., Myhill, S., Palmieri, E., Necchi, F., Rijpkema, S., Micoli, F., Vipond, C. (2021). Development of a Monocyte Activation Test as an Alternative to the Rabbit Pyrogen Test for Mono-and Multi-Component Shigella GMMA-Based Vaccines. *Microorganisms*, *9*(7), 1375.

Carson, D., Myhill, S., Palmieri, E., Necchi, F., Rijpkema, S., Micoli, F., Vipond, C. (2021). Development of a Monocyte Activation Test as an Alternative to the Rabbit Pyrogen Test for Mono-and Multi-Component Shigella GMMA-Based Vaccines. *Microorganisms*, *9*(7), 1375.

Casanova, J. L., Abel, L., Quintana-Murci, L. (2011). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology*, *29*, 447-491.

Da Silva, C. C., Presgrave, O. A. F., Hartung, T., de Moraes, A. M. L., Delgado, I. F. (2016). Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicology In Vitro*, *32*, 70-75.

Daneshian, M., Von Aulock, S., Hartung, T. (2009). Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nature protocols*, *4*(12), 1709-1721.

Daniels, R., Van der Elst, W., Dieltjens, N., Appels, T., So, C. K., Nys, T., Patel, M. (2022). Validation of the monocyte activation test with three therapeutic monoclonal antibodies. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*.

Daniels, R., Van der Elst, W., Dieltjens, N., Appels, T., So, C. K., Nys, T., Patel, M. (2022). Validation of the monocyte activation test with three therapeutic monoclonal antibodies. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*.

Darkow, R., Groth, T., Albrecht, W., Lützow, K., Paul, D. (1999). Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. *Biomaterials*, *20*(14), 1277-1283.

Das, A. P., Kumar, P. S., Swain, S. (2014). Recent advances in biosensor based endotoxin detection. Biosensors and Bioelectronics, 51, 62–75.

De Mattos, K. A., Navega, E. C. A., Silva, V. F., Almeida, A. S., da Silva, C. C., Presgrave, O. A. F., Delgado, I. F. (2018). Applicability of the monocyte activation test (MAT) in the quality control of the 17DD yellow fever vaccine. *Alternatives to Laboratory Animals*, *46*(1), 23-37.

Dinarello, C. A. (2004). Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of Endotoxin Research*, *10*(4), 201-222.

Ding, J. L., Ho, B. (2010). Endotoxin detection–from limulus amebocyte lysate to recombinant factor C. *Endotoxins: structure, function and recognition* içinde (s. 187-208). Springer, Dordrecht.

ECVAM (2006). ESAC Statement on the validity of *in-vitro* pyrogen tests. http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC statement pyrogenicity 20060516.pdf.

Elin, R. J. and Wolff, S. M. (1973).

El-Radhi, A. S. (2018). Pathogenesis of fever. *Clinical manual of fever in children* içinde (s. 53-68). Springer, Cham.

Etna, M. P., Giacomini, E., Rizzo, F., Severa, M., Ricci, D., Shaid, S., Coccia, E. M. (2020). Optimization of the monocyte activation test for evaluating pyrogenicity of tick-borne encephalitis virus vaccine. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, *37*(4), 532-544.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2010-2017). General Chapter 2.6.30, "Monocyte-activation test." European Pharmacopoeia.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2016).European Pharmacopoeia Commission adopts revised general chapter on monocyte activation test to facilitate reduction in testing on laboratory animals.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2016). European Pharmacopiae Chapter 5.1.10.Bacterial Endotoxin Test.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2017). European Pharmacopoeia, 9.2, Chapter 2.6.30. Monocyte Activation Test.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2016). European Pharmacopoeia 8th Edition 7/2016: Supplement 8.8, 2.6.8. Pyrogens.

European Directorate for the Quality of Medicines [EDQM] (2020).European Pharmacopoeia. Supplement 10.3, the new general Chapter 2.6.32. Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C.

European Medicines Agency [EMA]. 2005. Guideline On Similar Biological Medicinal Products.

European Medicines Agency [EMA]. 2012. Questions and Answers on Biosimilar Medicines (Similar Biological Medicinal products).

Fennrich, S., Hennig, U., Toliashvili, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., Stoppelkamp, S. (2016). More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives. *Alternatives to laboratory animals*, *44*(3), 239-253.

Fennrich, S., Wendel, A., Hartung, T. (1999). New applications of the human whole blood pyrogen assay (PyroCheck). *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, *16*(3), 146-149.

Fingola, F. F., Albertino, S. R., de MP Abrantes, S., Zamith, H. P. (2019). Proposed reduction of the *in vivo* pyrogen test by the *in vitro* LAL assay for the quality control of anticrotallic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera. *Toxicology in vitro*, *59*, 292-299.

Fingola, F. F., Albertino, S. R., de MP Abrantes, S., Zamith, H. P. (2013). Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-bothropic serum. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *85*, 93-98.

Food Drug Administration [FDA], 2012. Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, pp. 1–13.

Gerke, C., Colucci, A. M., Giannelli, C., Sanzone, S., Vitali, C. G., Sollai, L., Saul, A. (2015). Production of a Shigella sonnei vaccine based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), 1790GAHB. *PloS one*, *10*(8), e0134478.

Gupta, R. K., Gupta, C. K., Mallet, L. (2015). Lot release of vaccines by regulatory authorities and harmonization of testing requirements. In *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* (pp. 573-596). Springer, Berlin, Heidelberg.

Halder, M., Hendriksen, C., Cussler, K., Balls, M. (2002). ECVAM's contributions to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals. *Alternatives to Laboratory Animals*, *30*(1), 93-108.

Han, Q., Hu, R., Li, H., Lei, Z., Zhang, X., Yu, X., Tan, H. (2019). Application of a TLR overexpression cell model in pyrogen detection. *Biotechnology and bioengineering*, *116*(6), 1269-1279.

Hartung, T. (2015). The human whole blood pyrogen test: lessons learned in twenty years. *ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation*, *32*(2), 79-100.

Hasiwa, M., Kullmann, K., von Aulock, S., Klein, C., Hartung, T. (2007). An *in vitro* pyrogen safety test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials*, *28*(7), 1367-1375.

Hasiwa, N., Daneshian, M., Bruegger, P., Fennrich, S., Hochadel, A., Hoffmann, S., Hartung, T. (2013). Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *Alternatives to animal experimentation: ALTEX*, *30*(2), 169-208.

He, Q., Gao, H., Xu, L. M., Lu, Y., Wang, C., Rui, J., Wang, J. Z. (2018). Analysis of IL-6 and IL-1β release in cryopreserved pooled human whole blood stimulated with endotoxin. *Innate Immunity*, *24*(5), 316-322.

Hendriksen, C. F. (2002). Refinement reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. *ILAR journal*, *43*(Suppl_1), S43-S48.

Hendriksen, C., Cussler, K., Halder, M. (2002). ECVAM's role in the implementation of the Three Rs concept in the field of biologicals. *Alternatives to Laboratory Animals*, *30*(2_suppl), 41-46.

Hoffmann, S., Peterbauer, A., Schindler, S., Fennrich, S., Poole, S., Mistry, Y., Hartung, T. (2005). International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *Journal of immunological methods*, *298*(1-2), 161-173.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. [ICCVAM]. 2008. Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five *In Vitro* Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products (NIH Publication, n. 08e6392).

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. [ICCVAM]. 2020. The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals.

International Conference on Harmonisation. [ICH]. 1999. Topic Q6B Specifications,Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.

International Organization for Standardization. [ISO]. 2009. "ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.

International Organization for Standardization. [ISO]. 2009. "ISO 10993-1: part 11 biological evaluation of medical devices test for systemic toxicity.

International Organization for Standardization. [ISO]. 2016. Pyrogenicity – Principle and method for pyrogen testing of medical devices. ISO/TC 194 N937. ISO/DTR 21582. International Organization for Standardization. Technical Committee 194. Working Group 16. Geneva, Switzerland. 2016-04-06. 23 pp.

International Organization for Standardization. [ISO]. 2020. Biological evaluation of medical devices –Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (ISO 10993-1:2018, including corrected version 2018-11).

Iwanaga, S. (1993). The limulus clotting reaction. Current opinion in immunology, 5(1), 74-82.

İnternet: Bursa Enfeksiyon Hastalıkları Bilişim Ağı. (2018). Ateş ve nedeni bilinmeyen ateş. Web: http://www.drinh.com/e-ders-ates-nba.html adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: ECVAM. (2006). Joint Research. Web:https://bit.ly/2HHAUzS adresinden 18 Şubat 2023'te alınmıştır.

İnternet: EDQM. (2021). Council of Europe. European Pharmacopoeia Animal Testing, European Pharmacopoeia to put an end to the rabbit pyrogen test 2021. Web: https://www.edqm.eu/en/news/european-pharmacopoeia-putend- rabbit-pyrogen-test adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: EFSA. (2022). Assessment of endocrine disruptive properties of PFOS. EFSA/ECHA guidance case study utilising AOP networks and alternative methods. Web: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2022.e200418 adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: EMA. (2007). Replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products. 2007. Web:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003599.pdf adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: EU. (2001). Volume 4, Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 16, Certification by a Qualified Person and Batch release (Under revision). Web: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.html adresinden 18 Şubat 2023'te alınmıştır.

İnternet: ICH. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Nov 2005. Web: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: JACVAM. (2023). Submission of Alternative Methods to JaCVAM. Web:https://www.jacvam.jp/en/list.html;http://www.nifds.go.kr/kocvamen/content/content_4_3.jsp) adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: Millipore. (2018). Preparation, Separation, Filtration Testing Products PyroMAT. 2018. [Diakses pada 16 September 2020], diakses dari. Web: https://www.merckmillipore.com/ID/ adresinden 18 Ocak 2023'te alınmıştır.

İnternet: NICEATM.(2023). Alternative Methods Accepted by US Agencies.” Web: https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: Solvias. (2022). Monocyte activation test in vitro pyrogen test for QC release with a validated cell line. 2022:4. Web: https://www.solvias.com/docs/download/en/000_Brochures_amp_Flyers/Monocyte_Activation_Test.pdf adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2005). Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği. Web: https://www.titck.gov.tr/mevzuat/2035 adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştı

İnternet: TİTCK.(2017). Duyurular. Web: https://www.titck.gov.tr/duyuru/parenteral-preparatlarda-apirojen-ifadesi-7122018173955 adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2018). Duyurular. Web: https://www.titck.gov.tr/faaliyetalanlari/laboratuvar/laboratuvar-hakkinda adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2018). Duyurular. Web: https://www.titck.gov.tr/haber/titck-laboratuvarlari-uluslararasi-arenada-27122018173225 adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2021). Biyobenzer Tıbbi Ürünler Hakkında Kılavuz. Web: https://www.titck.gov.tr/mevzuat/biyobenzer-tibbi-urunler-hakkinda-kilavuz-14092021014336 adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2021). *In Vitro* Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği.Web:https://titck.gov.tr/storage/Archive/2021/contentFile/in%20vitro%20tan%C4%B1%20ama%C3%A7l%C4%B1%20t%C4%B1bbi%20cihaz%20y%C3%B6netmeli%C4%9Fi_7f7d80ac-9d30-4ab7-9cdb-d250239bfed0.pdf adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TİTCK. (2023). Aşı nedir ve türleri nelerdir. Web: https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/41/asi-turleri.html adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: TSAR. (2023). Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance. Web: https://tsar.jrc.ec.europa.eu adresinden 20 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: USP. (2014). General Chapter (“Bacterial Endotoxin Test”). Web: https://www.usp.org/harmonization-standards/pdg/general-methods/bacterial-endotoxins adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: USP.(2018). General Chapter (“Pyrogens”). Web: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c151.html adresinden 17 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: WHO. (2016). Good manufacturing practices for biological products. TRS No. 822, Annex 1; available at. Web: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/gmp/en/; 1991 adresinden 21 Ocak 2023’te alınmıştır.

İnternet: WHO. (2021). International Topics of Vaccines. Web: https://www.who.int/topics/vaccines/en adresinden 17 Ocak 2023'te alınmıştır.

Kindinger, I., Daneshian, M., Baur, H., Gabrio, T., Hofmann, A., Fennrich, S., Hartung, T. (2005). A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. *Journal of Immunological Methods*, *298*(1-2), 143-153.

Kulberg, Rachel Tinker., Dellinger, Kristen., Brady, Terry E., Robertson, Lee., Levy, J. (2020). Horseshoe Crab Aquaculture as a Sustainable Endotoxin Testing Source.

Lang, C., Kolaj-Robin, O., Cirefice, G., Taconet, L., Pel, E., Jouette, S., Charton, E. (2018). Replacement, Reduction, Refinement. *Pharmeuropa Bio Scientific Notes*, 12.

Levin J, Bang F.B. (1964). A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp.; 115: 337.

Maloney, T., Phelan, R., Simmons, N. (2018). Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS Biology*, *16*(10), e2006607.

Metz, B., Hendriksen, C. F., Jiskoot, W., Kersten, G. F. (2002). Reduction of animal use in human vaccine quality control: Opportunities and problems. *Vaccine*, *20*(19-20), 2411-2430.

Nakamura, T., MORITA, T., Iwanaga, S. (1986). Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes: Isolation and characterization. *European Journal of Biochemistry*, *154*(3), 511-521.

Netea, M. G., Kullberg, B. J., Van der Meer, J. W. (2000). Circulating cytokines as mediators of fever. *Clinical Infectious Diseases*, *31*(Supplement_5), 178-184.

Ochiai, M., Yamamoto, A., Naito, S., Maeyama, J. I., Masumi, A., Hamaguchi, I., Yamaguchi, K. (2010). Applicability of bacterial endotoxins test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates. *Biologicals*, *38*(6), 629-636.

Park, C. Y., Jung, S. H., Bak, J. P., Lee, S. S., Rhee, D. K. (2005). Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals*, *33*(3), 145-151.

Pearson, C. F. (1985). Endotoxins, LAL. Testing, and depyrogenation. J. R. Robinson (Ed.), *Pyrogens* içinde (s. 3–272). New York: Marcel Dekker.

Pharmaceutical Inspection Convention Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme (PIC/S, 2019).

Piehler, M., Roeder, R., Blessing, S., Reich, J. (2020). Comparison of LAL and rFC Assays—Participation in a Proficiency Test Program between 2014 and 2019. *Microorganisms*, *8*(3), 418.

Piehler, M., Roeder, R., Blessing, S., Reich, J. (2020). Comparison of LAL and rFC Assays—Participation in a Proficiency Test Program between 2014 and 2019. *Microorganisms*, *8*(3), 418.

Poole S, Thorpe R, Meager A, Gearing AJ. (1988). Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. Dev Biol Stand.;69:121-3.

Poston, R., Hill, R., Allen, C., Casey, W., Gatewood, D., Levis, R., Allen, D. (2019). Achieving scientific and regulatory success in implementing non-animal approaches to human and veterinary rabies vaccine testing: A NICEATM and IABS workshop report. *Biologicals*, *60*, 8-14.

Potu, A. Shashidher, Burra, S. and Patil, A. K. (2011). Monocyte activation test a new pharmacoepial quality control test for pyrogens: a review. *J Adv Pharm Sci*, *1*(1).

Rockel, C., Hartung, T. (2012). Systematic review of membrane components of Gram-positive bacteria responsible as pyrogens for inducing human monocyte/macrophage cytokine release. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 56.

Rosenqvist, E., Høiby, E. A., Bjune, G., Aase, A., Halstensen, A., Lehmann, A. K., Closs, O. (1998). Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B Neisseria meningitidis outer membrane vesicle vaccine. *Developments in Biological Standardization*, *92*, 323-333.

Rozemond, H. J. V. Q. (1986). Laboratory animal protection: The European Convention and the Dutch Act. *Veterinary Quarterly*, *8*(4), 346-349.

Russell WMS and Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen, London; 1959 (Reprinted by UFAW, 1992).

Sanders, R. A. (2013). Adolescent Psychosocial, Social, and Cognitive Development. Pediatrics in Review, 34(8), 354–359.

Sandle, T. (2013). Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: technology, validation and current regulations. Elsevier.

Sandle, T. (2015). Assessing Non-endotoxin Microbial Pyrogens in Relation in Pharmaceutical Processing| IVT.

Schindler, S., Asmus, S., Von Aulock, S., Wendel, A., Hartung, T., Fennrich, S. (2004). Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *Journal of Immunological Methods*, *294*(1-2), 89-100.

Schindler, S., Spreitzer, I., Löschner, B., Hoffmann, S., Hennes, K., Halder, M., Montag, T. (2006). International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *Journal of immunological methods*, *316*(1-2), 42-51.

Schlievert, P. M. (2001). Use of intravenous immunoglobulin in the treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses. *Journal of allergy and clinical immunology*, *108*(4), S107-S110.

Schutte, K., Szczepanska, A., Halder, M., Cussler, K., Sauer, U. G., Stirling, C., Stickings, P. (2017). Modern science for better quality control of medicinal products "Towards global harmonization of 3Rs in biologicals": The report of an EPAA workshop. *Biologicals*, *48*, 55-65.

Seibert, F. B. (1923). Fever-producing substances found in some distilled water. *Am. J. Physiol., 87,* 90-104.

Seibert, F. B. (1925). The causes of many febrile reactions following intravenous injections. *Am. J. Physiol., 71,* 621-652.

Sekreterliği, T. A. B. G. (2009). Avrupa Birliği Terimleri Sözlüğü (İngilizce-Türkçe) Glossary for the European Union (English-Turkish). Ankara: Matus Basım Evi.

Silva, V. F., da Silva Guedes Junior, D., da Silveira, I. A., Almeida, A. S., de Paiva Conte, F., Delgado, I. F., de Mattos, K. A. (2018). A comparison of pyrogen detection tests in the quality control of meningococcal conjugate vaccines: The applicability of the Monocyte Activation Test. *Alternatives to Laboratory Animals*, *46*(5), 255-272.

Solano, G., Gómez, A., León, G. (2015). Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL). Toxicon, 105, 13–18.

Solati, S., Aarden, L., Zeerleder, S., Wouters, D. (2015). An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. *Innate immunity*, *21*(7), 677-684.

Solati S, Zhang T, Timman S. (2022). The monocyte activation test detects potentiated cytokine release resulting from the synergistic effect of endotoxin and non-endotoxin pyrogens. Innate Immun;28(3-4):130-137.

Spoladore, J., Gimenes, I., Bachinski, R., Negherbon, J. P., Hartung, T., Granjeiro, J. M., Alves, G. G. (2021). Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit Pyrogen testing (RPT): A scoping review. *Toxicology in vitro*, *74*, 105160.

Stang, K., Fennrich, S., Krajewski, S., Stoppelkamp, S., Burgener, I. A., Wendel, H. P., Post, M. (2014). Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *25*(4), 1065-1075.

Statements, K. Rationale for Removing Abnormal Toxicity Testing (22 June 2015).

Stoddard, M. B., Pinto, V., Keiser, P. B., Zollinger, W. (2010). Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B Neisseria meningitidis vaccines made from lipid A acylation mutants. *Clinical and Vaccine Immunology*, *17*(1), 98-107.

Stoppelkamp, S., Würschum, N., Stang, K., Löder, J., Avci-Adali, M., Toliashvili, L., Fennrich, S. (2017). Speeding up pyrogenicity testing: Identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT). *Drug Testing and Analysis*, *9*(2), 260-273.

Studholme, L., Sutherland, J., Desai, T., Hockley, J., Care, R., Nordgren, I. K., Collaborative Study Group. (2019). Evaluation of the monocyte activation test for the safety testing of meningococcal B vaccine Bexsero: A collaborative study. *Vaccine*, *37*(29), 3761-3769.

T.C. Sağlık Bakanlığı. (2017-2018). Türk farmakopesi dergisi.

Tinker-Kulberg, R., Dellinger, K., Brady, T. E., Robertson, L., Levy, J. H., Abood, S. K., Dellinger, A. L. (2020). Horseshoe crab aquaculture as a sustainable endotoxin testing source. *Frontiers in Marine Science, 7*, 153.

Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005.

Tüfek, H., Özkan, Ö. (2018). 4R rule in laboratory animal science. *Commagene J Biol*, *21*(1), 55-60.

Utescher, C. L. D. A., Buosi, K. L., Botosso, V. F., Quintilio, W. (2018). Monocyte Activation Test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *54*(2), 1-6.

Valentini, S., Santoro, G., Baffetta, F., Franceschi, S., Paludi, M., Brandini, E., Capecchi, B. (2019). Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: An *in vitro* pyrogen test to overcome *in vivo* limitations. *Vaccine*, *37*(29), 3754-3760.

Vetten, M. A., Yah, C. S., Singh, T., Gulumian, M. (2014). Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *10*(7), 1391-1399.

Vipond, C., Findlay, L., Feavers, I., Care, R. (2016). Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, *33*(1), 47-53.

Vipond, C., Sutherland, J., Nordgren, K., Kemp, G., Heath, A., Care, R., Studholme, L. (2019). Development and validation of a monocyte activation test for the control/safety testing of an OMV-based meningococcal B vaccine. *Vaccine*, *37*(29), 3747-3753.

Weisser, K., Hechler, U. (1997). Pyrogens. *Animal welfare aspects in the quality control of immunologicals*. içinde (s. 131-136). Nottingham: FRAME for ECVAM and PEI.

World Health Organization [WHO]. 1999. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (oral). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty Report. Geneva, World Health Organization, Annex 1, WHO Technical Report Series No. 904.

World Health Organization [WHO]. 1969. Technical Report Series No413, Annex2 Requirements for Immunosera of Animal Origin

World Health Organization [WHO]. (2009). Guidelines on evaluation of Similar Biotherapeutic Products.

Wolfert, M. A., Murray, T. F., Boons, G. J., Moore, J. N. (2002). The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39179-39186.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DOĞAN, Meltem

Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	**Okul/Program**	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ F. Toksikoloji	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi/ Sağlık Ekonomisi ve Farmakoekonomi	2018
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Fen Fakültesi	2004
Lise	Bahçelievler Deneme Lisesi	2000

İş Deneyimi, Yıl	**Çalıştığı Yer**	**Görev**
2018-devam ediyor	Perspective İlaç Danışmanlık ve Eğitim Hizmetleri Ltd. Şti.	Genel Müdür/ Kurucu
2017-2018	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.	Ruhsatlandırma Takım Lideri
2015-2017	Turk İlaç ve Serum Sanayi A.Ş.	Ruhsatlandırma Müdürü
2014-2015	Biem İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Ruhsatlandırma Sorumlusu
2012-2014	World Medicine İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi	Ruhsatlandırma Uzmanı
2005-2011	Mustafa Nevzat İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi	Mikrobiyoloji Lab. Uzmanı

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Turistik geziler, kitap okumak, film izlemek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..