

ارزیابی سمیت سلولی تجهیزات پزشکی - آزمون برون تن به روش MTT

وحید لسان^{*1}

(۱) گروه بیولوژی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

* نویسنده مسئول: Email: vlesan@standard.ac.ir

مقدمه و هدف: معمولاً برای استفاده از یک ماده یا هر وسیله بهداشتی که با انسان مواجهه مستقیم دارد لازم است تست سمیت سلولی برای آن انجام شود تا در صورت دارا بودن عدم سمیت سلولی یا میزان پایین تر از استانداردهای مربوطه و در صورت دارا بودن دیگر استانداردها، بتواند وارد بازار تجهیزات پزشکی شود. منظور از آزمون های سمیت سلولی روشهایی هستند که بررسی کننده ی اثرات ناخواسته ی ترکیبات مختلف بر روی سلول هستند. این روشها در محیط برون تن (کشت سلول) استفاده ی زیادی دارند. با توجه به کارایی عمومی تست های سمیت سلولی برون تن و کاربرد گسترده آن در ارزیابی گستره وسیعی از تجهیزات و مواد، و با توجه به اهمیت بررسی تجهیزات پزشکی از نظر سمیت سلولی، هدف این پروژه تعریف یک طرح جامع بر اساس استاندارد های بین المللی برای تصمیم گیری در مورد تجهیزات و مواد مذکور بر اساس آزمون های استاندارد می باشد

روش پژوهش: رده سلول های پستانداران مشخص در شرایط مناسب کشت داده شده، سپس با تجهیزات پزشکی مورد آزمون تماس مستقیم داده می شوند و/ یا اینکه با عصاره آنها مواجهه داده می شوند. سپس سلول ها از نظر تکثیر سلولی در مقایسه با گروه های کنترل مثبت و منفی ارزیابی می گردند که بیانگر وجود یا عدم وجود اثرات سمیت سلولی در تجهیزات مذکور می باشد. آزمون بر اساس استاندارد ISO10993-5 به روش آزمون سمیت سلولی MTT انجام می پذیرد. در آزمون MTT ابتدا بایستی تعداد مناسبی سلول (ترجیحاً ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) را در هر یک از چاهک ها کشت داده، اجازه داد تا سلولها به کف پلیت چسبیده و بحالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک های کنترل و آزمایش انتخاب شده و مقدار مناسبی از ماده مورد آزمون را به چاهک های تست اضافه می کنیم و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تاثیر ماده مورد نظر، انکوبه می کنیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه نموده و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. در طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروناز که یکی از آنزیم های چرخه تنفسی میتوکندری هاست احیا می شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال های آبی رنگ فورمازان می شود که در زیر میکروسکوپ براحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO بحالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده را می توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلولها را محاسبه نمود.

نتایج: چنانچه بین گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی داری از لحاظ رشد سلول ها ملاحظه نگردد می توان نتیجه گرفت که وسیله مورد نظر فاقد سمیت سلولی است ولی چنانچه در سلول های تیمار داده شده شاهد کاهش معنی دار حیات سلولی از روش MTT باشیم می توان نتیجه گرفت وسیله مورد آزمایش دارای سمیت سلولی است.

بحث: تجهیزات پزشکی از آنجا که در تماس مستقیم با انسان هستند بایستی از لحاظ سمیت سلولی مورد بررسی قرار بگیرند. در این آزمون بر اساس استاندارد بین المللی ISO10993-5 تجهیزاتمانند ست سرم و سرنگ از لحاظ سمیت سلولی مورد ارزیابی قرار می گیرند تا چنانچه فاقد اثرات سمی باشند استاندارد لازم را کسب و وارد بازار شوند