

گزارش آزمون سمیت سلولی

نام و آدرس مشتری:

شرکت اندیشه گستر مسعود (شناسه ملی: ۱۴۰۰۷۴۶۲۶۱۴) - تهران، خیابان شریعتی، روبروی خیابان دولت، کوچه امام زاده، پلاک ۱۴، واحد ۵- شماره تماس: ۲۶۶۴۳۱۲۷ - ۲۲۶۳۰۱۴۸

محل انجام آزمایش:

آزمایشگاه کیا نانو زیست ویستا - تهران، فلکه دوم صادقیه، به سمت جناح، انتهای خیابان طاهریان، پلاک ۵۸، ساختمان رز، طبقه ۴، واحد ۱۰ - شماره تماس: ۰۹۱۲۰۸۰۹۹۰۷ - ۴۴۰۲۴۰۲۳

استاندارد آزمون و ارزیابی انطباق:

- UNI EN ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Test for in vitro cytotoxicity

جدول زمانی:

۱۴۰۰/۰۳/۱۸	شروع آزمون:	۱۴۰۰/۰۳/۱۸	پذیرش نمونه:
۱۴۰۰/۰۴/۰۲	ارائه گزارش:	۱۴۰۰/۰۴/۰۲	پایان آزمون:

مشخصات نمونه:

نام	سمان گلس اینومر
شرکت سازنده	اندیشه گستر مسعود - کشور ایران
کد نمونه آزمایشگاه	N000317/70/01
تاریخ تولید	۱۴۰۰/۰۲/۰۵
LOT Number	۰۰۰۲۰۴۰۱
REF Number	-
تاریخ انقضاء	-
Batch Number	-
روش استریل	-

خلاصه نتایج آزمون:

نوع آزمون	روش آزمون	نتایج آزمون
سمیت سلولی - تست بر روی عصاره نمونه	ISO 10993-5:2009 Annex C	در غلظت ۱۰٪ سمیت سلولی ندارد

مدیریت آزمایشگاه کیا نانو زیست ویستا

سجاد محمدی

سهامی خاص ثبت ۵۰۳۲۱۵

☎ 021-44024023

☎ 09333672386

✉ 1481634615

🌐 www.kiabio.com

✉ info@kiabio.com

مقدمه:

از آزمون (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) MTT برای بررسی سمیت سلول تحت تاثیر عصاره نمونه‌ها استفاده می‌شود تا بتوان معیاری از زیست سازگاری نمونه‌ها را بدست آورد. رنگ MTT در میتوکندری سلول‌های زنده از رنگ زرد به کریستالهای بنفش فورمازان تغییر می‌یابد و غلظت رنگ معیاری از میزان سلول‌های زنده است که با دستگاه فوتومتر در طول موج ۵۷۰nm قابل اندازه‌گیری خواهد بود.

روش آزمون و ارزیابی انطباق:

این آزمون و معیارهای ارزیابی انطباق آن مطابق با استاندارد ISO 10993-5:2009 Annex C می‌باشد. عصاره‌گیری‌ها مطابق با استاندارد ISO 10993-12 به شرح ذیل انجام شد:

• آماده سازی عصاره نمونه مورد آزمون:

نمونه پودر و مایع با نسبت مشخص با هم ترکیب شد. به ازای هر ۰/۲ گرم از سمان مورد آزمون، ۱ میلی لیتر محیط کشت به ظرف حاوی نمونه افزوده شد و به مدت 72 ± 2 ساعت درون انکوباتور با دمای 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از عصاره نمونه غلظت ۱۰٪ و ۵٪ تهیه شد.

• آماده سازی عصاره نمونه کنترل منفی:

به ازای هر ۳ سانتی‌متر مربع از سطح مقطع HDPE (High Density Polyethylene)، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به ظرف حاوی HDPE افزوده شد و به مدت 72 ± 2 ساعت درون انکوباتور با دمای 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

• آماده سازی عصاره نمونه کنترل مثبت:

به ازای هر ۶ سانتی‌متر مربع از سطح مقطع دستکش لاتکس، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به ظرف حاوی دستکش لاتکس افزوده شد و به مدت 72 ± 2 ساعت درون انکوباتور با دمای 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

برای بررسی میزان سمیت سلولی از آزمون MTT cytotoxicity test استفاده شد، به صورتی که ابتدا به میزان 1×10^4 سلول L929 با محیط کشت RPMI (همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ پنی سیلین و استرپتومایسین) درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه با ۶ بار تکرار ریخته شد و سپس به مدت 24 ± 2 ساعت در انکوباتور حاوی ۵٪ گاز دی‌اکسید کربن و دمای 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سلول‌ها به صورت کامل به کف چاهک‌های پلیت بچسبند. پس از گذشت 24 ± 2 ساعت محیط کشت چاهک‌ها خارج شد و عصاره‌ها به چاهک‌های پلیت افزوده و سلول‌ها برای مدت 24 ± 2 ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از گذشت 24 ± 2 ساعت عصاره چاهک‌ها خارج شدند و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۳ ساعت رنگ MTT چاهک‌ها خارج شد و ایزوپروپانول به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ تشکیل شده و به صورت کامل حل

شوند. در پایان مقدار رنگ حل شده در ایزوپروپانول با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ nm محاسبه شد. چاهک‌هایی که دارای سلول‌های زنده هستند چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک‌های با سلول مرده از خود نشان می‌دهند. بنابراین با توجه به فرمول ذیل می‌توان چگالی نوری چاهک‌های نمونه مورد آزمون را با چاهک‌های نمونه کنترل مقایسه نمود.

$$\text{Toxicity}\% = 1 - \frac{\text{mean of OD sample}}{\text{mean of OD control}} \times 100$$

$$\text{Viability}\% = 100 - \text{Toxicity}\%$$

تجهیزات:

- هود لامینار
- انکوباتور CO₂
- سانتریفیوژ
- الیزا ریدر
- میکروسکوپ اینورت

معیار پذیرش:

- نمونه مورد آزمون اگر Viability بیشتر از ۷۰٪ داشته باشد سمیت سلولی ندارد.
- نمونه مورد آزمون اگر Viability کمتر از ۷۰٪ داشته باشد سمیت سلولی دارد.
- نمونه بلانک باید Viability ۱۰۰٪ داشته باشد.
- نمونه کنترل مثبت باید Viability کمتر از ۵۰٪ داشته باشد.
- Standard Deviation بین تکرار نمونه‌های هر گروه باید کمتر از ۱۵٪ باشد.

نتایج:

	Test Sample		Blank	Positive Control	Negative Control
	10%	5%			
Average (OD)	2.272	2.316	2.464	0.044	2.452
STDV	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03
Viability %	92.234	94.006	100	1.786	99.526
Toxicity %	7.766	5.994	0	98.214	0.474

Expanded uncertainty¹ = ±4.34 % Reading

¹ Expanded uncertainty: An interval about the measurement result that encompasses 95% of probability density function of measurement result.

ارزیابی انطباق:

درصد زنده ماندن سلول‌های در تماس با نمونه مورد آزمون (سمان گلس آینومر شرکت اندیشه گستر مسعود) نسبت به نمونه شاهد در غلظت ۱۰٪ حدود ۹۲٪ بود که نشان دهنده عدم سمیت سلولی عصاره جدا شده از نمونه در این غلظت می‌باشد.

تصویر نمونه مورد آزمون:



مراجع:

- UNI EN ISO 10993-5:2009 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity"
- UNI EN ISO 10993-12:2012 "Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials"

مدیریت آزمایشگاه کیا نانو زیست ویستا

سجاد محمدی

سهامی خاص ثبت ۵۰۳۲۱۵