VIRA GROUP
آزمایشگاه زیست سازگاری و تست تجهیزات پزشکی
شماره ثبت : ۶۰۵۰۴۴

گزارش آزمون سمیت سلولی

NZV/Rep14030722-30112325003-001

نام درخواست کننده آزمون: آرکا پژوهان آریانا (GENEX)

آدرس: تبریز، خیابان پاستور، مابین لاله زار و شریعتی، جنب کلانتری ۱۵، مرکز رشد تجهیزات پزشکی علوم پزشکی تبریز

محل انجام آزمون: آزمایشگاه نیکان زیست ویرا (شناسه ملی: ۱۴۰۱۱۶۷۳۵۹۶)

آدرس: تهران، خیابان آزادی، دانشگاه شریف، ساختمان هوافضای جدید، طبقه هفتم.

نوع آزمون درخواست شده: آزمون سمیت سلولی

روش انجام آزمون و استاندارد مرجع جهت انطباق: ISO 10993-5:2009 Annex C

زمان بندی:

پذیرش نمونه: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲	شروع آزمون: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲
پایان آزمون: ۱۴۰۳/۰۷/۲۷	ارائه گزارش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۶

نام شرکت تولید کننده: آرکا پژوهان آریانا(GENEX)	مدت زمان استفاده: -
نام نمونه: فلاسک کشت سلول (T25)	کاربرد: جهت کشت سلول
لات نامبر/رف نامبر : ۳۰۱۱۲۳۲۵۰۰۳	محل استفاده: -
روش سترون سازی: پرتو دهی	تعداد نمونه دریافت شده: ۳ عدد برای آزمون
تاریخ تولید: ۲۰۲۳/۱۱/۳۰	تاریخ انقضا: ۲۰۲۶/۱۱/۳۰
نتیجه آزمون: نمونه ی مورد آزمون تولید شرکت آرکا پژوهان آریانا با الزامات استاندارد مطابقت دارد.	

I. آزمون سمیت سلولی با روش MTT

آزمون سمیت سلولی یکی از روش های مطالعه میزان سمیت مواد بر روی سلول ها به صورت برون تنی است. در این روش پس از مواجهه عصاره نمونه های مورد آزمون با سلول، میزان زنده مانی سلول ها جهت ارزیابی زیست سازگاری محصول مورد نظر محاسبه می‌گردد. نتیجه به این صورت است که برای هر غلظت از ماده میزان زنده بودن سلول ها مشخص خواهد شد. اساس این روش تشکیل رنگ فورمازان به دلیل احیای ترکیب MTT (دی متیل تیازول – ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) و یا دیگر نمک‌های تترازولیوم است. با گسستگی حلقه تترازولیوم از طریق آنزیم‌های میتوکندریایی در سلول‌های زنده، بلورهای فورمازان بنفش رنگ نا محلول تشکیل می‌شود. ایجاد این بلورها حاکی از فعال بودن آنزیم‌های زنجیره تنفسی و معیاری برای زنده مانی سلول‌هایی است که در مواجهه با عصاره نمونه مورد آزمون قرارگرفته‌اند. در نهایت با اندازه گیری میزان جذب توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر می‌توان درصد سلول‌های زنده مانده را مشخص کرد.

تجهیزات مورد استفاده	مواد مصرفی
هود لامینار	دستکش لاتکس
انکوباتور CO_2	HDPE
سانتریفیوژ	DMEM
الایزاریدر	DMSO
میکروسکوپ نوری معکوس	MTT

II. مراحل و روش انجام آزمون

- **عصاره گیری نمونه مورد آزمون** :

ابتدا به ازای هر ۶ سانتی متر مربع از نمونه ۱ میلی لیتر محیط استخراجی DMEM قرار گرفتند. سپس به مدت ۲۴±۲ ساعت در انکوباتور قرارداده شد. پس از پایان انکوباسیون با فیلتر سرسرنگی ۰.۲ میکرون عصاره فیلتر شد.

آماده سازی کنترل مثبت: به ازای هر ۶ سانتی متر مربع برش از دستکش لاتکس، به میزان ۱ میلی لیتر از محیط کشت به ظرف حاوی لاتکس افزوده شده و به مدت۲±۴ در انکوباتور قرار داده شد.

آماده سازی کنترل منفی: به ازای ۳ سانتی متر مربع از سطح مقطع پلی اتیلن با دانسیته بالا، ۱ میلی لیتر از محیط کشت به ظرف حاوی پلی اتیلن افزوده شده و به مدت۲±۴ در انکوباتور قرار داده شد.

شرح انجام آزمون: روز اول سوسپانسیون سلولی L929 تهیه گردید و با استفاده از سمپلر محیط کشت به داخل چاهک های پلیت توزیع گشت. برای هر نمونه عصاره، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی، آماده شد. سلول ها به مدت ۲۴±۲ ساعت در شرایط استاندارد گرمخانه گذاری شد. پلیت با یک میکروسکوپ بررسی شد تا اطمینان حاصل شود که رشد سلولی یکسانی در سراسر پلیت صورت گرفته باشد. بعد از ۲۴±۲ ساعت گرمخانه گذاری، محیط کشت از روی سلول ها آسپیره شد. به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی غلظت مناسب عصاره نمونه، کنترل منفی، کنترل مثبت اضافه شد. سلول ها به مدت ۲۴±۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از ۲۴±۲ ساعت تیمار، هر یک از پلیت ها به وسیله یک میکروسکوپ بررسی شد تا خطاهای سیستماتیک کشت سلولی و خصوصیات رشد سلول های کنترل و تیمار شده بررسی شود. محیط کشت حاوی MTT اضافه شد و مجددا ۱-۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از گرمخانه گذاری، محیط کشت رویی با احتیاط حذف شد و کریستال ها در DMSO حل شد. جذب محلول رنگی در ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا ریدر با استفاده از نمونه های بلنک به عنوان مرجع، اندازه گیری شد.

III. نتایج آزمون

میزان زنده مانی (Viability) سلول ها با استفاده از رابطه ذیل محاسبه می‌گردد: $Viability\% = 100 - Toxicity$

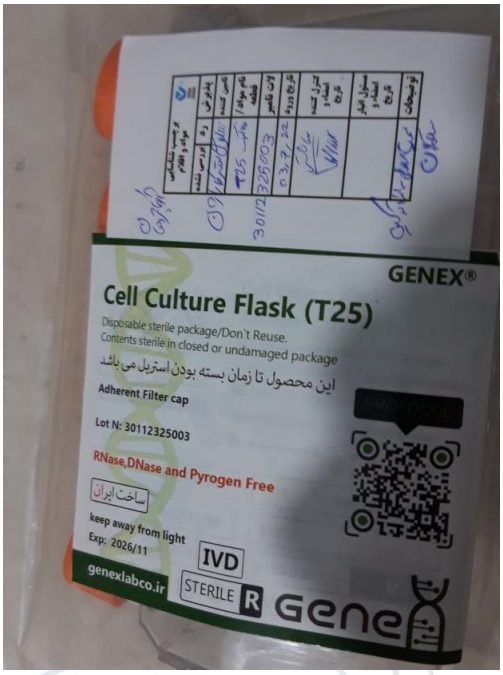
	Ave (OD)	Via (%)	Tox (%)	STDV
Sample	0.445	**93**	**7**	0.11
Control -	0.479	94	06	0.08
Control +	0.0287	06	94	0.005
Blank	0.033	06	94	0.011

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

IV. محدوده رد یا پذیرش نتیجه آزمون

اگر زنده مانی نسبی برای بالاترین غلظت عصاره نمونه بیشتر یا مساوی ٪ ۷۰گروه کنترل باشد، پس آن ماده، غیر سیتوتوکسیک در نظر گرفته خواهد شد و در غیر این صورت نمونه مورد آزمون سمیت‌زا می‌باشد.

V. تصویر نمونه مورد آزمون



VI. مراجع و منابع

ISO 10993-5:2009 “Biological evaluation of medical devices- Part 5 Tests for in vitro cytotoxicity”.
ISO 10993-12:2021 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials

VIRA
Nikan Zist Ltd.
[Reg No : 605044]