การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993-5: ภาชนะพลาสติก-วัสดุทางการแพทย์

รหัส : 3002-1-000-003-02-2566 **จำนวนหน่วยกิต :** 2.5 หน่วยกิต
ผู้แต่ง : ดร. ภญ. ไตรพร วัฒนนาถ
ผู้รับผิดชอบบทความ : ดร. ภญ. ไตรพร วัฒนนาถ **อีเมล :** triporn.w@dmsc.mail.go.th
สถานที่ทำงาน : สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
วันที่รับรอง : 19 กุมภาพันธ์ 2566 **วันที่หมดอายุ :** 18 กุมภาพันธ์ 2567 **จำนวนหน้า :** 7 หน้า
คำสำคัญ : Cytotoxicity, ISO 10993-5

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ผู้อ่านมีความเข้าใจถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สำหรับพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อและวัสดุทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 10993-5: Tests for *in vitro* cytotoxicity

บทนำ

ในปัจจุบัน ภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อที่เป็นของเหลวสำหรับฉีดเข้าสู่ร่างกาย เช่น ถุงบรรจุน้ำเกลือ ถุงบรรจุโลหิต นิยมทำมาจากพลาสติกเนื่องจากมีน้ำหนักเบา ไม่แตกร้าว มีความยืดหยุ่น สามารถผลิตเป็นรูปแบบต่างๆ ได้ง่าย โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้กำหนดมาตรฐานสำหรับภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ (Plastic containers for sterile pharmaceutical products) มาตรฐานเลขที่ มอก. 531-2558[(1)] เพื่อเป็นแนวทางแก่ผู้ผลิตในการผลิตสินค้าให้มีคุณภาพในระดับที่เหมาะสมกับการใช้งานมากที่สุด โดยแบ่งภาชนะพลาสติกดังกล่าวออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ พอลิเอทิลีน (Polyethylene; PE) พอลิโพรพิลีน (Polypropylene; PP) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride; PVC) และพลาสติกหลายชั้นซึ่งต้องไม่มีพอลิไวนิลคลอไรด์เป็นส่วนประกอบ โดยมาตรฐานฉบับนี้ไม่ครอบคลุมกระบอกฉีดยาพลาสติกที่บรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อพร้อมใช้

มอก. 531-2558 กำหนดคุณลักษณะของภาชนะพลาสติกดังกล่าวข้างต้น ไว้ทั้งลักษณะทั่วไป คุณลักษณะทางฟิสิกส์ เคมี ชีวภาพ และความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก ในส่วนของคุณลักษณะทางชีวภาพนั้นกำหนดให้ทำการทดสอบรวม 4 หัวข้อ คือ

- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (Cytotoxicity test)
- การทดสอบหาสารไพโรเจน (Pyrogen test)
- การทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ (Permeability to microorganism test)
- การทำลายเม็ดเลือด (Hemolysis test)

โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงนั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดกรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพของเม็ดพลาสติกที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตภาชนะพลาสติก รวมถึงวัสดุทางการแพทย์อื่นที่มีการสัมผัสกับเนื้อเยื่อ เซลล์ หรือของเหลวในร่างกายของผู้ป่วย

นอกจากนี้ ตำรายาฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา (United States Pharmacopeia; USP) ได้กำหนดให้มีการประเมินคุณลักษณะทางชีวภาพและทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของพลาสติกประเภทอีลาสโตเมอร์ (Elastomers) และวัสดุพอลิเมอร์อื่นๆ (Polymeric materials) ที่มีการสัมผัสกับร่างกายของผู้ป่วยทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมไว้เช่นกัน ดังปรากฏในข้อกำหนดทั่วไป (General chapter) <87> Biological Reactivity Tests, In Vitro[2] โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้งานของวัสดุเหล่านี้ รวมถึงปกป้องผู้ป่วยจากความเสี่ยงทางชีวภาพที่อาจเกิดขึ้น ข้อกำหนดทั่วไปนี้ได้ใช้กันมานานร่วม 40 ปี อย่างไรก็ตาม วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่ระบุไว้ใน USP รวมจำนวน 3 วิธี คือ Elution Test, Direct Contact Test และ Agar Diffusion Test นั้น เป็นเพียงวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative method) เท่านั้น ไม่สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative method) ได้

ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices เป็นมาตรฐานสากลอีกมาตรฐานหนึ่ง ที่ใช้สำหรับการประเมินคุณลักษณะทางชีวภาพของอุปกรณ์ทางการแพทย์ โดยแบ่งย่อยหัวข้อการประเมินความปลอดภัยของอุปกรณ์การแพทย์เป็นส่วนๆ หลายส่วนด้วยกัน มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับแผนการประเมินคุณลักษณะทางชีวภาพ การเลือกวิธีทดสอบที่เฉพาะเจาะจงตามประเภทของเครื่องมือแพทย์หรือวัสดุทางการแพทย์ ข้อกำหนดเรื่องสวัสดิภาพของสัตว์ทดลอง และแนวทางการทดสอบในแต่ละวิธี

การเลือกแผนการทดสอบในการประเมินทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 10993 นั้น ต้องพิจารณาถึงวัสดุที่ใช้ ลักษณะของการสัมผัส และระยะเวลาที่สัมผัสของอุปกรณ์นั้นๆ โดยทั่วไปแล้ววัสดุทางการแพทย์ทุกชนิดที่สัมผัสกับร่างกายของผู้ป่วยจะต้องทำการประเมินใน 3 หัวข้อทดสอบหลักคือ

1. การระคายเคือง (Irritation): เพื่อประเมินอันตรายจากการสัมผัสสารเคมีที่ปนเปื้อนจากเครื่องมือแพทย์หรือวัสดุทางการแพทย์อันอาจจะก่อให้เกิดการระคายเคือง
2. การแพ้ (Sensitization): เพื่อประเมินอันตรายจากการสัมผัสสารเคมีที่ปนเปื้อนจากเครื่องมือแพทย์หรือวัสดุทางการแพทย์อันอาจจะก่อให้เกิดการแพ้บนผิวหนัง
3. ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity): เพื่อศึกษาการตอบสนองทางชีวภาพในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ในบทความนี้จะครอบคลุมเฉพาะการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สำหรับพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อและวัสดุทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 10993-5: Tests for *in vitro* cytotoxicity เท่านั้น

ISO 10993-5[3]

ISO 10993-5[3] เป็นมาตรฐานการประเมินคุณลักษณะทางชีววิทยาของวัสดุทางการแพทย์ด้วยวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง และระบุความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการและจุดสิ้นสุดที่วัดได้แตกต่างกันไป ได้แก่ การประเมินความเสียหายของเซลล์ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา (Morphology) การวัดความเสียหายของเซลล์ (Cell damage) การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell growth) หรือการวัดเมทาบอลิซึมของเซลล์ (Cellular metabolism) แนวทางการทดสอบแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

1. Test on extracts: การทดสอบสารที่สกัดได้จากวัสดุทางการแพทย์
2. Test by direct contact: การทดสอบแบบสัมผัสโดยตรงกับวัสดุทดสอบ
3. Test by indirect contact: การทดสอบแบบสัมผัสทางอ้อมกับวัสดุทดสอบ

รายละเอียดของแต่ละวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

1. Test on extracts

เป็นวิธีประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งสามารถประเมินได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยกำหนดให้มีการสกัดสารจากตัวอย่างเพื่อนำมาประเมินความสามารถในการหลุดรอดของสารในตัวอย่างที่อาจมีผลกระทบต่อเซลล์ในร่างกาย ทั้งนี้ การสกัดสารจากตัวอย่างจะเป็นไปตาม ISO 10993-12[4] ที่กำหนดระยะเวลา อุณหภูมิ และสารละลายที่ใช้ในการสกัดตามสภาวะการใช้งานจริงของวัสดุทางการแพทย์หรือวัสดุทดสอบนั้น รายละเอียดโดยย่อของวิธีมีดังนี้

- เตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (นิยมใช้ L-929 mammalian fibroblast cell; ATCC cell line CCL1, NCTC clone 929) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium)
- เตรียมสารสกัดตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม สกัดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

1.1 การตรวจสอบในเชิงคุณภาพ:

ประเมินผลกระทบต่อเซลล์หลังจากสัมผัสสารสกัดตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง โดยตรวจดูสัณฐานและความเสียหายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) เซลล์ปกติจะมีลักษณะแผ่ไปบนพื้นผิว แต่ละเซลล์จะโตชิดกันเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ไม่มีเซลล์แตก (cell lysis) ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารพิษจะมีลักษณะกลม หลุดออกจากพื้นผิว และพบเซลล์แตก เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับตัวบอกมาตรฐานในการประเมินระดับความเป็นพิษดังรายละเอียดตามตารางที่ 1 และสามารถสรุปได้ดังนี้

- **ระดับความเป็นพิษ “0”** หมายถึง ไม่เป็นพิษ (None)
  สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: เซลล์เจริญเติบโตปกติ ไม่พบเซลล์ตาย
- **ระดับความเป็นพิษ “1”** หมายถึง พิษน้อยมาก (Slight)
  สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: พบเซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิวไม่เกินร้อยละ 20 และอาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
- **ระดับความเป็นพิษ “2”** หมายถึง พิษอย่างอ่อน (Mild)
  สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: พบเซลล์มีลักษณะกลมไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรงและไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดี่ยว
- **ระดับความเป็นพิษ “3”** หมายถึง พิษปานกลาง (Moderate)
  สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: พบเซลล์มีลักษณะกลม หรือพบการแตกทำลายของเซลล์ไม่เกินร้อยละ 70
- **ระดับความเป็นพิษ “4”** หมายถึง พิษมาก (Severe)
  สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: พบการทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

<u>เกณฑ์การทดสอบ:</u> ตัวอย่างจะผ่านการทดสอบและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างปลอดภัยเมื่อระดับความเป็นพิษไม่เกิน “2”

ตารางที่ 1 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Test on extracts[3]

Grade	Reactivity	Conditions of cell cultures
0	None	Discrete cytoplasmic granules; no cell lysis; no reduction of cell growth
1	Slight	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached and without intracytoplasmatic granules, or show changes in morphology; occasional lysed cells are present; only slight growth inhibition observable.
2	Mild	Not more than 50% of the cells are round, devoid of intracytoplasmatic granules, no extensive cell lysis; not more than 50% growth inhibition observable.
3	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed; cell layers not completely destroyed, but more than 50% growth inhibition observable.
4	Severe	Nearly complete or complete destruction of the cell layers.

1.2 การวัดในเชิงปริมาณ:

หลังจากบ่มสารสกัดตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง ตรวจดูสัณฐานและความเสียหายของเซลล์ แล้ววัดหาความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยสามารถเลือกใช้ได้ 4 วิธี คือ Neutral red uptake (NRU) cytotoxicity test, Colony formation cytotoxicity test, MTT cytotoxicity test และ XTT cytotoxicity test ในบทความนี้จะกล่าวถึงวิธี MTT assay เท่านั้น ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันบ่อยที่สุด

หลักการ: วัดความมีชีวิตของเซลล์หลังจากสัมผัสกับสารสกัดตัวอย่างตามเวลาที่เหมาะสม และประเมินความมีชีวิตของเซลล์จากการเปลี่ยนสารละลายสีเหลืองของ MTT หรือ (3-(4,5-<u>dimethylthiazol</u>-2-yl)-2,5-di<u>phenyl</u> tetrazolium <u>bromide</u>) ให้เป็นผลึก formazan (สีม่วง) หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่ได้สูงหมายถึงมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก

คำอธิบาย: เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะมีเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ที่สามารถเปลี่ยน MTT (สีเหลือง) ให้เป็น formazan (สีม่วง) ซึ่ง formazan นี้ สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรได้ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของ formazan ดังนั้นหากค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูง ก็หมายถึงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมากนั่นเอง

<u>เกณฑ์การทดสอบ:</u> ตัวอย่างจะผ่านการทดสอบและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างปลอดภัยเมื่อระดับความเป็นพิษไม่เกิน “2” และมีค่า % ความมีชีวิตมากกว่า 70

2. Direct contact test

เป็นการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งสามารถประเมินได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) เนื่องจากตัวอย่างที่เป็นของแข็งจะสัมผัสโดยตรงกับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ขนาดตัวอย่างที่นำมาทดสอบต้องมีขนาดที่เหมาะสมกับภาชนะที่

ใช้ในสภาวะทดลอง และตัวอย่างที่นำมาใช้นี้จะต้องไม่ได้ผ่านกระบวนการใดๆ ที่มีผลให้ตัวอย่างไม่ใช่ตัวแทนของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดสำหรับพลาสติกชนิด high density เนื่องจากอาจจะไปกดทับให้เซลล์ตายได้ ส่วนพลาสติกชนิด low density อาจจะลอยไปมาในหลุมทดสอบ จนทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้ รายละเอียดโดยย่อของวิธีมีดังนี้

- เตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (นิยมใช้ L-929 mammalian fibroblast cell; ATCC cell line CCL1, NCTC clone 929) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium)
- เตรียมตัวอย่างภายใต้สภาวะและเทคนิคที่ปลอดเชื้อ
- นำตัวอย่างไปสัมผัสกับเซลล์โดยไม่ผ่านการชะล้างใดๆ และบ่มวัสดุกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

2.1 การตรวจสอบในเชิงคุณภาพ:

ประเมินผลกระทบต่อเซลล์หลังจากสัมผัสตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง โดยประเมินลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) โดยเซลล์ปกติจะมีลักษณะแผ่ไปบนพื้นผิว แต่ละเซลล์จะโตชิดกันเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ไม่มีเซลล์แตก (cell lysis) ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารพิษจะมีลักษณะกลมหลุดออกจากพื้นผิว และจะพบวงใสรอบตำแหน่งที่วางชิ้นตัวอย่าง เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับตัวบอกมาตรฐานในการประเมินระดับความเป็นพิษดังรายละเอียดตามตารางที่ 2 และสามารถสรุปได้ดังนี้

- ระดับความเป็นพิษ “0” หมายถึง ไม่เป็นพิษ (None)
สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: ไม่พบวงใสรอบๆ หรือภายใต้ชิ้นตัวอย่าง

- ระดับความเป็นพิษ “1” หมายถึง พิษน้อยมาก (Slight)
สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติภายใต้ชิ้นตัวอย่าง

- ระดับความเป็นพิษ “2” หมายถึง พิษอย่างอ่อน (Mild)
สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: มีเซลล์ตายเป็นวงจำกัดอยู่ในพื้นที่ใต้ชิ้นตัวอย่าง

- ระดับความเป็นพิษ “3” หมายถึง พิษปานกลาง (Moderate)
สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นตัวอย่าง 0.5-1.0 เซนติเมตร

- ระดับความเป็นพิษ “4” หมายถึง พิษมาก (Severe)
สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง: มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นตัวอย่างมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

<u>เกณฑ์การทดสอบ:</u> ตัวอย่างจะผ่านการทดสอบและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างปลอดภัยเมื่อระดับความเป็นพิษไม่เกิน “2”

2.2 การวัดในเชิงปริมาณ:

สามารถใช้หลักการ colorimetric assay ได้

เกณฑ์การทดสอบ: ตัวอย่างจะผ่านการทดสอบและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างปลอดภัยเมื่อระดับความเป็นพิษไม่เกิน “2” และมีค่า % ความมีชีวิตมากกว่า 70

3. Indirect contact test

เป็นการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ในเชิงคุณภาพเท่านั้น สามารถเลือกใช้ได้ 2 วิธี คือ Agar diffusion และ Filter diffusion ในบทความนี้จะกล่าวถึงวิธี Agar diffusion เท่านั้น ซึ่งจะเหมาะกับการทดสอบตัวอย่างที่มีน้ำหนักมาก เช่น เครื่องมือแพทย์ วัสดุทางทันตกรรม จุกยาง เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีรูปร่างต่างๆ ได้

Agar diffusion เป็นวิธีโดยอ้อมในการประเมินความเป็นพิษในเชิงคุณภาพของวัสดุที่มีต่อเซลล์ด้วยการวางชิ้นตัวอย่าง และปล่อยให้เกิดการหลุดรอดของสารจากชิ้นตัวอย่าง (leachable) แพร่ผ่านชั้นวุ้น โดยชั้นวุ้นที่ใช้ในการเททับชั้นแผ่นเซลล์ต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดการกดทับเซลล์จนเกิดความเสียหาย และความเข้มข้นที่ใช้นี้ต้องไม่ทำให้เกิดการขัดขวางการหลุดรอดของสารจากตัวอย่างด้วย สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษนี้ด้วยวิธีนี้ ต้องมีขนาดที่เหมาะสมกับภาชนะที่ประเมิน เพื่อลดการรบกวนของตัวอย่างที่อาจส่งผลให้เกิดการประเมินผิดพลาดได้ รายละเอียดโดยย่อของวิธีมีดังนี้

- เตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (นิยมใช้ L-929 mammalian fibroblast cell; ATCC cell line CCL1, NCTC clone 929) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium)
- ปิดทับด้วยชั้นวุ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Agar with culture medium) ที่มีความเข้มข้นวุ้น 0.5-2.0% โดยปริมาตรวุ้นที่ปิดทับต้องไม่รบกวนการเจริญเติบโตของเซลล์ อาจผสมสีย้อม neutral red ลงไปในวุ้นได้
- วางชิ้นตัวอย่างทดสอบบนวุ้น และบ่มชิ้นวัสดุกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ประเมินลักษณะและความเสียหายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) โดยเซลล์ปกติจะมีลักษณะแผ่ไปบนพื้นผิว แต่ละเซลล์จะโตชิดกันเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ไม่มีเซลล์แตก (cell lysis) ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารพิษจะมีลักษณะกลม หลุดออกจากพื้นผิว และจะพบวงใสรอบตำแหน่งที่วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับตัวบอกมาตรฐานในการประเมินระดับความเป็นพิษเช่นเดียวกันกับวิธี Direct contact test ตามตารางที่ 2 และใช้เกณฑ์การทดสอบเดียวกัน

ตารางที่ 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Direct contact test และ Agar diffusion test[3]

Grade	Reactivity	Description of reactivity zone
0	None	No detectable zone around or under specimen
1	Slight	Some malformed or degenerated cells under specimen
2	Mild	Zone limited to area under specimen
3	Moderate	Zone extending specimen size up to 1.0 cm
4	Severe	Zone extending farther than 1.0 cm beyond specimen

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงนั้นมีข้อดีอยู่หลายประการ เช่น สามารถควบคุมสภาวะการทดสอบ ลดความแปรปรวนระหว่างการทดสอบหลายๆ ครั้งได้ ทำได้คราวละหลายตัวอย่าง และลดการใช้สัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดทางเทคนิคคือ ขาดคุณสมบัติของผนังกั้นเสมือนในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (in vivo-like barrier) รวมถึงข้อจำกัดอื่น เช่น ไม่สามารถหาค่าความสัมพันธ์ของการตอบสนองกับปริมาณพิษที่ได้รับในร่างกายของสิ่งมีชีวิตสำหรับการประเมินความเสี่ยงต่อมนุษย์ และไม่สามารถทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ เป็นต้น ดังนั้น การเลือกวิธีการทดสอบที่เหมาะสมนั้นต้องพิจารณาถึงลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง ข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดของแต่ละวิธีทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 531-2558. ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. Retrieved September 9, 2022, from https://service.tisi.go.th/fulltext/TIS-531-2558m_Auto2690.pdf
2. General Chapter: USP. Biological Reactivity Tests, In Vitro <87>. In: USP–NF. Rockville, MD: USP; Aug 01, 2016. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M98833_01_01
3. International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO Standard No. 10993-5). Available from https://www.iso.org/standard/36406.html
4. International Organization for Standardization. (2021). Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials (ISO Standard No. 10993-12). Available from https://www.iso.org/standard/75769.html