

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7391-5:2020

ISO 10993-5:2009

Xuất bản lần 2

**ĐÁNH GIÁ SINH HỌC TRANG THIẾT BỊ Y TẾ –
PHẦN 5: PHÉP THỬ ĐỘC TÍNH TẾ BÀO *IN VITRO***

*Biological evaluation of medical devices –
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

HÀ NỘI - 2020

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	4
Lời giới thiệu.....	6
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Tài liệu viện dẫn	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa	7
4 Yêu cầu chung	
4.1 Quy định chung	9
4.2 Chuẩn bị dịch chiết của vật liệu.....	9
4.3 Chuẩn bị vật liệu cho các thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp.....	11
4.4 Chuẩn bị đối chứng.....	12
5 Các dòng tế bào	12
6 Môi trường nuôi cấy.....	13
7 Chuẩn bị nuôi cấy dự trữ tế bào.....	13
8 Quy trình thử nghiệm.....	14
8.1 Số lần lặp lại	14
8.2 Thử nghiệm trên dịch chiết	14
8.3 Thử nghiệm bằng cách tiếp xúc trực tiếp	15
8.4 Thử nghiệm bằng cách tiếp xúc gián tiếp.....	16
8.5 Xác định độc tính tế bào	17
9 Báo cáo thử nghiệm	19
10 Đánh giá kết quả.....	20
Phụ lục A (tham khảo) Phép thử độc tính tế bào hấp thu đồ trung tính (NRU)	21
Phụ lục B (tham khảo) Phép thử độc tính hình thành khuẩn lạc	30
Phụ lục C (tham khảo) Phép thử độc tính tế bào MTT.....	36
Phụ lục D (tham khảo) Phép thử độc tính tế bào XTT	42
Thư mục tài liệu tham khảo.....	48

Lời nói đầu

TCVN 7391-5:2020 thay thế cho TCVN 7391-5:2005.

TCVN 7391-5:2020 hoàn toàn tương đương với ISO 10993-5:2009.

TCVN 7391-5:2020 do Ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC194 *Đánh giá sinh học và lâm sàng trang thiết bị y tế* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 7391 (ISO 10993), *Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế*, gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 7391-1:2004 (ISO 10993-1:2003), *Phần 1: Đánh giá và thử nghiệm*
- TCVN 7391-2:2020 (ISO 10993-2:2006), *Phần 2: Yêu cầu sử dụng động vật*
- TCVN 7391-3:2020 (ISO 10993-3:2014), *Phần 3: Phép thử độc tính di truyền, khả năng gây ung thư và độc tính sinh sản*
- TCVN 7391-4:2020 (ISO 10993-4:2017), *Phần 4: Lựa chọn phép thử tương tác với máu*
- TCVN 7391-5:2020 (ISO 10993-5:2009), *Phần 5: Phép thử độc tính tế bào in vitro*
- TCVN 7391-6:2020 (ISO 10993-6:2016), *Phần 6: Phép thử hiệu ứng tại chỗ sau cấy ghép*
- TCVN 7391-7:2004 (ISO 10993-7:1995), *Phần 7: Dư lượng sau tiệt trùng bằng etylen oxit*
- TCVN 7391-10:2002 (ISO 10993-10:2007), *Phần 10: Phép thử kích thích và quá mẫn muộn*
- TCVN 7391-11:2020 (ISO 10993-11:2017), *Phần 11: Phép thử độc tính toàn thân*
- TCVN 7391-12:2002 (ISO 10993-12:2007), *Phần 12: Chuẩn bị mẫu và vật liệu chuẩn*
- TCVN 7391-14:2001 (ISO 10993-14:2007), *Phần 14: Nhận dạng và định lượng sản phẩm phân huỷ từ gốm sứ*
- TCVN 7391-15:2007 (ISO 10993-15:2000), *Phần 15: Nhận dạng và định lượng sản phẩm phân huỷ từ kim loại và hợp kim*
- TCVN 7391-16:2020 (ISO 10993-16:2017), *Phần 16: Thiết kế nghiên cứu độc lực cho sản phẩm phân huỷ và ngâm chiết*
- TCVN 7391-17:2002 (ISO 10993-17:2007), *Phần 17: Thiết lập giới hạn cho phép của chất ngâm chiết*
- TCVN 7391-18:2005 (ISO 10993-18:2007), *Phần 18: Đặc trưng hoá học của vật liệu*

Bộ ISO 10993 còn các tiêu chuẩn sau:

- ISO 10993-9:2019, *Biological evaluation of medical devices – Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products*
- ISO 10993-13:2010, *Biological evaluation of medical devices – Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices*
- ISO/TS 10993-19:2020, *Biological evaluation of medical devices – Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials*
- ISO/TS 10993-20:2006, *Biological evaluation of medical devices – Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices*
- ISO/TR 10993-22:2017, *Biological evaluation of medical devices – Part 22: Guidance on nanomaterials*
- ISO/TR 10993-33:2015, *Biological evaluation of medical devices – Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity – Supplement to ISO 10993-3*

Lời giới thiệu

Do khả năng áp dụng tổng hợp của các phép thử độc tính tế bào *in vitro* và sử dụng rộng rãi trong việc đánh giá một loạt các trang thiết bị và vật liệu, mục đích của tiêu chuẩn này, thay vì quy định một phép thử đơn, để xác định sơ đồ thử nghiệm đòi hỏi các quyết định được thực hiện trong một loạt các bước. Điều này sẽ dẫn đến việc lựa chọn các phép thử phù hợp nhất.

Có ba loại phép thử được liệt kê: phép thử chiết, phép thử tiếp xúc trực tiếp, phép thử tiếp xúc gián tiếp.

Việc lựa chọn một hoặc nhiều loại trong số này phụ thuộc vào bản chất của mẫu được đánh giá, vị trí sử dụng tiềm năng và tính chất của việc sử dụng.

Sự lựa chọn này sau đó xác định các chi tiết của việc chuẩn bị các mẫu cần thử, chuẩn bị các tế bào nuôi cấy và cách thức các tế bào tiếp xúc với các mẫu hoặc dịch chiết của chúng.

Vào cuối thời gian tiếp xúc, việc đánh giá sự hiện diện và mức độ của ảnh hưởng của độc tính tế bào được thực hiện. Mục đích của tiêu chuẩn này nhằm mở ra sự lựa chọn loại đánh giá. Cách thức này làm cho có sẵn một loạt các thử nghiệm, phản ánh cách tiếp cận của nhiều nhóm ủng hộ các thử nghiệm sinh học *in vitro*.

Nhiều phương pháp được sử dụng và các điểm cuối được đo trong xác định độc tính tế bào có thể được nhóm thành các loại đánh giá sau:

- Đánh giá tổn thương *in vitro* tế bào bằng phương pháp hình thái học;
- Đo lường tổn thương tế bào;
- Các phép đo sinh trường tế bào;
- Đo lường các khía cạnh cụ thể của sự trao đổi chất tế bào.

Có một số phương pháp tạo ra kết quả trong mỗi bốn loại này. Điều tra viên cần lưu ý về các loại thử nghiệm và loại kỹ thuật cụ thể phù hợp với loại nào, để so sánh có thể được thực hiện với các kết quả khác trên các trang thiết bị hoặc vật liệu tương tự ở cả cấp độ và liên phòng. Ví dụ về các thủ tục thử nghiệm định lượng được nêu trong các phụ lục. Hướng dẫn cho việc giải thích các kết quả được nêu trong tiêu chuẩn này.

Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 5: Phép thử độc tính tế bào *in vitro*

*Biological evaluation of medical devices –
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp thử để đánh giá độc tính tế bào *in vitro* của các trang thiết bị y tế.

Các phương pháp này quy định việc ủ các tế bào nuôi cấy tiếp xúc với trang thiết bị và/hoặc dịch chiết của trang thiết bị trực tiếp hoặc thông qua khuếch tán.

Những phương pháp này được thiết kế để xác định phản ứng sinh học của tế bào động vật có vú *in vitro* sử dụng các thông số sinh học phù hợp.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là rất cần thiết khi áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các bản sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 7391-1 (ISO 10993-1), *Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 1: Đánh giá và thử nghiệm trong phạm vi hệ thống quản lý rủi ro*

TCVN 7391-12 (ISO 10993-12), *Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 12: Chuẩn bị mẫu và vật liệu chuẩn*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa nêu trong TCVN 7391-1 (ISO 10993-1) và các thuật ngữ, định nghĩa sau:

TCVN 7391-5:2020

3.1

dụng cụ nuôi cấy (culture vessels)

dụng cụ thích hợp cho nuôi cấy tế bào bao gồm đĩa petri bằng thủy tinh, bình nuôi cấy bằng nhựa hoặc đĩa nhiều khoang và đĩa vi chuẩn bằng nhựa.

CHÚ THÍCH: Các dụng cụ này có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong các phương pháp này với điều kiện là chúng đáp ứng các yêu cầu về loại nuôi cấy mô và phù hợp để sử dụng với các tế bào động vật có vú.

3.2

vật liệu đối chứng dương tính (positive control material)

vật liệu mà khi được thử theo tiêu chuẩn này gây ra phản ứng độc tính tế bào có thể tái lập được

CHÚ THÍCH: Mục đích của đối chứng dương tính là thể hiện phản ứng của hệ thống thử thích hợp. Ví dụ, organotin-polyurethane¹⁾ bền vững được sử dụng làm đối chứng dương tính cho các vật liệu rắn và các dịch chiết. Ví dụ, pha loãng phenol được sử dụng làm đối chứng dương tính cho các dịch chiết. Ngoài vật liệu, hóa chất tinh khiết cũng có thể được sử dụng để chứng minh hiệu suất của hệ thống thử nghiệm.

3.3

mẫu trắng (blank)

tá được lỏng chiết không chứa mẫu thử, được giữ lại trong một dụng cụ giống với dụng cụ chứa mẫu thử và chịu các điều kiện giống với các điều kiện mà mẫu thử phải chịu trong quá trình chiết.

CHÚ THÍCH: Mục đích của mẫu trắng là để đánh giá các tác động gây nhiễu có thể có do dụng cụ chiết, tá được lỏng và quá trình chiết.

3.4

vật liệu đối chứng âm tính (negative control material)

vật liệu mà khi được thử nghiệm theo tiêu chuẩn này không gây ra phản ứng độc tính tế bào

CHÚ THÍCH: Mục đích của đối chứng âm tính là để chứng minh phản ứng nền của các tế bào. Ví dụ, polyetylen tỷ trọng cao²⁾ để chế tạo polyme tổng hợp và chụp nhôm oxit cần sử dụng trong nha khoa được sử dụng làm vật liệu đối chứng âm.

¹⁾ Các polyurethan ZDEC và ZDBC có sẵn từ Trung tâm An toàn Thực phẩm và Dược phẩm, Viện Nghiên cứu Hatano, Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Nhật Bản.

²⁾ Polyetylen tỷ trọng cao có thể nhận được từ Dược điển Hoa Kỳ (Rockville, MD, Hoa Kỳ) và từ Trung tâm An toàn Thực phẩm và Dược phẩm, Viện Nghiên cứu Hatano (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Nhật Bản).

Thông tin được cung cấp trong 1) và 2) là để thuận tiện cho người dùng tiêu chuẩn này và không phải là sự chứng thực bởi ISO của các sản phẩm này. Các sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng có thể được hiển thị để dẫn đến kết quả tương tự.

3.5

mẫu thử nghiệm (test sample)

vật liệu, trang thiết bị, phần trang thiết bị, thành phần, dịch chiết hoặc phần của chúng phải chịu thử nghiệm hoặc đánh giá sinh học hoặc hóa học

3.6

tiền hợp (subconfluency)

sự tụ hợp gần 80 %, nghĩa là cuối giai đoạn sinh trưởng logarit

4 Chuẩn bị mẫu và đối chứng**4.1 Quy định chung**

Phép thử phải được thực hiện trên:

- a) dịch chiết mẫu thử và/hoặc
- b) chính bản thân mẫu thử.

Chuẩn bị mẫu phải theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12).

Đối chứng âm tính và dương tính phải bao gồm trong mỗi xét nghiệm.

4.2 Chuẩn bị dịch chiết của vật liệu**4.2.1 Nguyên tắc chiết**

Các điều kiện chiết nên cố gắng mô phỏng hoặc khuyếch tán các điều kiện sử dụng lâm sàng để xác định nguy cơ độc tính tiềm tàng mà không gây ra thay đổi đáng kể trong mẫu thử, như phản ứng tổng hợp, tan chảy hoặc bất kỳ thay đổi nào của cấu trúc hóa học, trừ khi điều này được dự kiến trong ứng dụng lâm sàng. Do bản chất của các vật liệu nhất định (ví dụ: vật liệu phân hủy sinh học), sự thay đổi cấu trúc hóa học có thể xảy ra trong quá trình chiết.

CHÚ THÍCH: Nồng độ của bất kỳ chất nội sinh hoặc ngoại lai nào trong dịch chiết, và do đó lượng tiếp xúc với các tế bào thử nghiệm, phụ thuộc vào vùng giao thoa, thể tích chiết, pH, độ hòa tan hóa học, tốc độ khuếch tán, độ thấm thấu, khuấy trộn, nhiệt độ, thời gian và các yếu tố khác các yếu tố.

Đối với các trang thiết bị liên quan đến việc trộn hai hoặc nhiều thành phần trong bệnh nhân để đến trang thiết bị cuối cùng (ví dụ xi măng xương), không nên rửa trang thiết bị cuối cùng trước khi chiết. Rửa mẫu thử có thể làm giảm hoặc loại bỏ cặn có trên trang thiết bị. Nếu mẫu thử được sử dụng trong môi trường vô khuẩn, nên sử dụng mẫu thử tiệt trùng để chiết các thành phần hóa học.

TCVN 7391-5:2020

4.2.2 Tá dược lỏng chiết

Việc lựa chọn các tá dược lỏng chiết có tính đến các đặc tính hóa học của mẫu thử phải được chứng minh và ghi lại. Đối với các xét nghiệm tế bào động vật có vú, một hoặc nhiều tá dược lỏng sau phải được sử dụng:

- môi trường nuôi cấy với huyết thanh;
- dung dịch muối sinh lý;
- tá dược lỏng phù hợp khác.

Việc lựa chọn tá dược lỏng nên phản ánh mục đích chiết. Cần xem xét việc sử dụng cả tá dược lỏng phân cực và tá dược lỏng không phân cực. Môi trường nuôi cấy với huyết thanh là tá dược lỏng chiết được ưa thích. Việc sử dụng môi trường nuôi cấy với huyết thanh được ưu tiên để chiết vì khả năng hỗ trợ sự phát triển của tế bào cũng như chiết cả hai chất phân cực và không phân cực. Ngoài môi trường nuôi cấy với huyết thanh, nên xem xét sử dụng môi trường không có huyết thanh để chiết đặc biệt các chất phân cực (ví dụ: các hợp chất ion). Các tá dược lỏng phù hợp khác bao gồm nước tinh khiết và dimethyl sulfoxide (DMSO). DMSO gây độc tính tế bào trong các hệ thống xét nghiệm được chọn ở mức lớn hơn 0,5 % (phần thể tích). Nồng độ tiếp xúc tế bào của các dịch chiết trong DMSO phải thấp hơn do độ pha loãng lớn hơn so với chiết trong môi trường nuôi cấy với huyết thanh.

CHÚ THÍCH 1: Các loại huyết thanh khác (ví dụ: huyết thanh thai nhi, huyết thanh bò/bê, huyết thanh bê sơ sinh) có thể được sử dụng và việc lựa chọn huyết thanh phụ thuộc vào loại tế bào.

CHÚ THÍCH 2: Điều quan trọng là phải nhận ra rằng huyết thanh/protein được biết là liên kết, ở một mức độ nào đó, có thể chiết được.

4.2.3 Điều kiện chiết

4.2.3.1 Việc chiết phải được thực hiện trong các vật chứa vô khuẩn, trở về mặt hóa học, đóng kín bằng cách sử dụng các kỹ thuật vô khuẩn, theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12).

4.2.3.2 Ngoại trừ các trường hợp được nêu dưới đây, việc chiết phải được tiến hành theo một trong các điều kiện sau và phải được áp dụng theo các đặc trưng của trang thiết bị và điều kiện cụ thể để sử dụng:

- (24 ± 2) h ở (37 ± 1) °C;
- (72 ± 2) h ở (50 ± 2) °C;
- (24 ± 2) h ở (70 ± 2) °C;
- $(1 \pm 0,2)$ h ở (121 ± 2) °C.

Các điều kiện chiết được mô tả ở trên, đã được sử dụng để cung cấp thước đo về khả năng gây nguy hiểm cho việc ước tính rủi ro của trang thiết bị hoặc vật liệu, dựa trên tiền lệ lịch sử. Các điều kiện khác, ví dụ: thời gian chiết kéo dài hoặc rút ngắn ở 37 °C, mô phỏng quá trình chiết xảy ra trong quá trình sử dụng lâm sàng hoặc cung cấp một thước đo đầy đủ về khả năng gây nguy hiểm, có thể được sử dụng, nhưng phải được chứng minh và ghi lại. Đối với các trang thiết bị y tế tiếp xúc ngắn hạn (thời gian tiếp xúc tích lũy không quá 4 h) với da hoặc niêm mạc còn nguyên vẹn và không được cấy ghép, điều này có thể bao gồm thời gian chiết dưới 24 h nhưng không dưới 4 h, như đã nêu trong a) đến c).

Môi trường nuôi cấy tế bào với huyết thanh chỉ nên được sử dụng theo a) vì nhiệt độ chiết lớn hơn (37 ± 1) °C có thể ảnh hưởng xấu đến hóa học và/hoặc tính ổn định của huyết thanh và các thành phần khác trong môi trường nuôi cấy.

Đối với các mẫu thử polyme, nhiệt độ chiết không được vượt quá nhiệt độ chuyển thủy tinh vì nhiệt độ cao hơn có thể thay đổi thành phần dịch chiết.

4.2.3.3 Nếu dịch chiết được lọc, ly tâm hoặc xử lý bằng các phương pháp khác trước khi áp dụng cho các tế bào, các chi tiết này phải được ghi lại trong báo cáo cuối cùng cùng với lý do cho các bước bổ sung (xem Điều 9). Bất kỳ điều chỉnh pH của dịch chiết phải được báo cáo. Cần tránh thao tác chiết, chẳng hạn như điều chỉnh pH, vì nó có thể ảnh hưởng đến kết quả.

4.3 Chuẩn bị vật liệu cho các thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp

4.3.1 Mẫu thử nghiệm

Các vật liệu có hình dạng, kích thước hoặc trạng thái vật lý khác nhau (nghĩa là chất lỏng, gel, chất rắn, v.v...) có thể được thử nghiệm mà không cần sửa đổi trong các xét nghiệm độc tính tế bào.

Mẫu thử ưu tiên của vật liệu rắn phải có ít nhất một bề mặt phẳng. Nếu không, phải tiến hành điều chỉnh để đạt được bề mặt phẳng.

4.3.2 Tính vô khuẩn của mẫu thử

4.3.2.1 Tính vô khuẩn của mẫu thử phải được tính đến.

4.3.2.2 Các mẫu thử từ các trang thiết bị tiệt trùng phải được xử lý vô khuẩn trong suốt quy trình thử nghiệm.

4.3.2.3 Các mẫu thử từ các trang thiết bị thường được cung cấp không vô khuẩn nhưng được khử khuẩn trước khi sử dụng phải được khử khuẩn theo phương pháp được nhà sản xuất khuyến nghị và xử lý vô khuẩn trong suốt quá trình thử nghiệm.

TCVN 7391-5:2020

Hiệu quả của các phương pháp khử khuẩn hoặc các tác nhân trên trang thiết bị nên được xem xét trong việc xác định việc chuẩn bị mẫu thử trước khi sử dụng trong hệ thống thử nghiệm.

4.3.2.4 Các mẫu thử từ các trang thiết bị không cần phải vô khuẩn trong sử dụng phải được sử dụng như được cung cấp và xử lý vô khuẩn trong suốt quy trình thử nghiệm. Có thể chính đáng để khử khuẩn vật liệu thử nghiệm để tránh lây nhiễm vi khuẩn của nuôi cấy tế bào; tuy nhiên, quá trình khử khuẩn phải không làm thay đổi tính chất của vật liệu thử.

Nếu các mẫu thử không vô khuẩn được sử dụng, chúng cần được kiểm tra độ nhiễm vi khuẩn vì sự nhiễm bẩn có thể dẫn đến đánh giá sai về độc tính tế bào.

4.3.3 Mẫu thử lỏng

Các mẫu thử lỏng phải được thử nghiệm bằng một trong hai cách:

a) lắng đọng trực tiếp

hoặc là

b) lắng đọng trên một mặt chất nền hấp thụ trở về mặt sinh học.

Các đĩa lọc đã cho thấy là phù hợp để sử dụng như chất nền hấp thụ trở.

4.3.4 Mẫu thử hấp thụ

Nếu thích hợp, các mẫu thử có khả năng hấp thụ phải được ngâm với môi trường nuôi cấy trước khi thử để tránh sự hấp phụ của môi trường nuôi cấy trong dụng cụ thử.

4.4 Chuẩn bị đối chứng

Các đối chứng nên được chọn để chúng có thể được chuẩn bị theo cùng một quy trình như mẫu thử.

5 Các dòng tế bào

Ưu tiên các dòng tế bào được thiết lập và khi được sử dụng phải nhận được từ kho chứa đã được công nhận³⁾.

³⁾ Ví dụ: các dòng tế bào American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) và CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) và CCL 10 [BHK-21 (C-13)] và V-79 379A được các chuyên gia ISO xác nhận là phù hợp.

Thông tin này được cung cấp để thuận tiện cho người dùng tiêu chuẩn này và không phải là chứng thực bởi ISO của các sản phẩm được nêu tên. Các dòng tế bào khác có thể được sử dụng nếu chúng có thể được hiển thị để dẫn đến kết quả tương tự hoặc có liên quan hơn.

Khi cần độ nhạy riêng, nuôi cấy tế bào gốc, các dòng tế bào và cơ quan nuôi cấy nhận được trực tiếp từ các mô sống chỉ được sử dụng nếu chứng minh khả năng tái lập và độ chính xác của phản ứng.

Nếu nuôi cấy gốc của một dòng tế bào được bảo quản, việc bảo quản phải ở $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc thấp hơn trong môi trường nuôi cấy tương ứng nhưng có chứa chất tạo tinh thể, ví dụ: dimethylsulfoxide hoặc glycerol. Bảo quản lâu dài (vài tháng đến nhiều năm) chỉ có thể tiến hành ở $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc thấp hơn.

Chỉ các tế bào không mang mầm nguyên sinh được sử dụng để thử nghiệm. Trước khi sử dụng, dịch nuôi cấy dự trữ nên được thử nghiệm xem có mầm nguyên sinh hay không.

Điều quan trọng là phải kiểm tra các tế bào thường xuyên (ví dụ: hình thái học, thời gian nhân đôi, số lượng nhiễm sắc thể phương thức) vì độ nhạy trong các phép thử có thể thay đổi theo số lần truyền.

Nên sử dụng Thực hành nuôi cấy tế bào tốt. Xem tài liệu tham khảo^[5].

6 Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy phải vô khuẩn.

Môi trường nuôi cấy có hoặc không có huyết thanh phải đáp ứng các yêu cầu sinh trưởng của dòng tế bào được chọn.

Kháng sinh có thể được bao gồm trong môi trường với điều kiện là chúng không ảnh hưởng xấu đến các xét nghiệm.

Điều kiện bảo quản phải được đánh giá xác nhận.

CHÚ THÍCH: Độ ổn định của môi trường nuôi cấy biến đổi theo thành phần và điều kiện bảo quản.

Môi trường nuôi cấy phải được duy trì ở độ pH từ 7,2 đến 7,4.

7 Chuẩn bị nuôi cấy dự trữ tế bào

Sử dụng dòng tế bào và môi trường nuôi cấy đã chọn, chuẩn bị đủ các tế bào để hoàn thành phép thử. Nếu các tế bào được sinh trưởng lấy từ các dịch nuôi cấy dự trữ, phải loại chất chống tạo tinh thể, nếu có. Tiền nuôi cấy tế bào phải được tiến hành ít nhất một lần trước khi sử dụng.

Khi cấy ghép tế bào, loại bỏ và hòa tan các tế bào bằng cách phân tách enzym và/hoặc cơ học bằng phương pháp thích hợp cho dòng tế bào.

8 Quy trình thử nghiệm

8.1 Số lần lặp lại

Tối thiểu ba lần lặp lại phải được sử dụng cho các mẫu thử nghiệm và đối chứng.

8.2 Thử nghiệm trên dịch chiết

8.2.1 Thử nghiệm này cho phép đánh giá cả độc tính và định lượng về độc tính tế bào.

8.2.2 Dùng pipet lấy một lượng dịch huyền phù tế bào được khuấy liên tục, cho vào mỗi bình lượng vừa đủ để tiếp xúc với dịch chiết. Xoay nhẹ bình để phân bố đều các tế bào trên bề mặt mỗi bình.

8.2.3 Ủ dịch nuôi cấy ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong môi trường không khí có hoặc không có carbon dioxide phù hợp với hệ thống đệm được chọn cho môi trường nuôi cấy.

Thử nghiệm phải được thực hiện trên một tầng tế bào đơn tiền hợp hoặc trên các tế bào mới hòa tan.

Trong xét nghiệm hình thành khuẩn lạc chỉ sử dụng mật độ tế bào thấp thích hợp.

8.2.4 Kiểm tra đánh giá độ tiền hợp và hình thái của dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử nghiệm.

Trong các trường hợp đặc biệt, các tế bào sinh trưởng theo cấp số nhân (ví dụ: các tế bào chính, các tế bào tăng sinh cao) có thể được gieo vào điểm bắt đầu của thử nghiệm.

8.2.5 Thực hiện kiểm tra trên:

a) dịch chiết gốc

và/hoặc

b) dịch chiết gốc và một loạt pha loãng của dịch chiết sử dụng tá được lỏng chiết làm chất pha loãng.

Ngoài ra, trong trường hợp vật liệu có độ hòa tan giới hạn được biết hoặc nghi ngờ có mặt, cần pha loãng bằng cách thay đổi tỷ lệ chiết ban đầu của mẫu thử với môi trường chiết.

Nếu sử dụng các tầng tế bào đơn để thử nghiệm, loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi dịch nuôi cấy và thêm một lượng nhỏ dịch chiết hoặc dịch pha loãng vào mỗi bình.

Nếu sử dụng các tế bào lơ lửng để thử nghiệm, thêm dịch chiết hoặc dịch pha loãng vào mỗi bình lặp lại ngay sau khi chuẩn bị dịch huyền phù tế bào.

8.2.6 Khi sử dụng dịch chiết phi sinh lý, ví dụ: nước, dịch chiết phải được thử ở nồng độ tương hợp sinh lý cao nhất sau khi pha loãng trong môi trường nuôi cấy.

CHÚ THÍCH: Môi trường nuôi cấy đậm đặc, ví dụ: gấp 2 lần, 5 lần, được khuyến nghị sử dụng để pha loãng dịch chiết lỏng.

8.2.7 Thêm lượng đã biết của mẫu trắng và các đối chứng âm tính và dương tính vào các bình lặp lại bổ sung.

CHÚ THÍCH: Nếu thích hợp, cũng có thể thử nghiệm đối chứng môi trường nuôi cấy mới.

8.2.8 Ủ các bình bằng các điều kiện tương tự như được mô tả trong 8.2.3 trong một khoảng thời gian thích hợp tương ứng với xét nghiệm cụ thể đã chọn.

8.2.9 Sau thời gian ủ ít nhất 24 h, xác định ảnh hưởng độc tính tế bào theo 8.5.

8.3 Thử nghiệm bằng cách tiếp xúc trực tiếp

8.3.1 Thử nghiệm này cho phép đánh giá cả độc tính tế bào và định lượng về độc tính tế bào.

8.3.2 Dùng pipet lấy một lượng dịch đã biết của huyền phù tế bào được khuấy liên tục cho vào mỗi bình một lượng vừa đủ để tiếp xúc trực tiếp với mẫu thử. Xoay nhẹ bình để phân bố đều các tế bào trên bề mặt mỗi bình.

8.3.3 Ủ dịch nuôi cấy ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong môi trường không khí, có hoặc không có carbon dioxide phù hợp với hệ thống đệm được chọn cho môi trường nuôi cấy, cho đến khi nuôi cấy phát triển thành dạng tiền hợp.

8.3.4 Xác minh độ tiền hợp và hình thái dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử nghiệm.

Trong các trường hợp đặc biệt, các tế bào sinh trưởng theo cấp số nhân (ví dụ: các tế bào chính, các tế bào tăng sinh cao) có thể được gieo vào điểm bắt đầu của thử nghiệm.

8.3.5 Loại bỏ môi trường nuôi cấy. Sau đó thêm môi trường nuôi cấy mới vào mỗi bình.

8.3.6 Đặt cẩn thận các mẫu riêng biệt của mẫu thử lên tầng tế bào ở trung tâm của mỗi bình lặp lại. Đảm bảo rằng mẫu thử bao phủ xấp xỉ 1/10 bề mặt tầng tế bào.

Các tỷ lệ khác của bề mặt mẫu thử đến bề mặt tầng tế bào có thể được sử dụng nếu được chứng minh.

Tiến hành cẩn thận để ngăn cản sự di chuyển không cần thiết của mẫu thử, vì điều này có thể gây ra tổn thương vật lý cho các tế bào. Ví dụ, các miếng kết nối của các tế bào bị bật ra có thể là kết quả của sự di chuyển không cần thiết.

CHÚ THÍCH: Khi thích hợp, mẫu thử có thể được đặt vào dụng cụ nuôi cấy trước khi thêm các tế bào.

8.3.7 Chuẩn bị các bình lặp lại cho cả vật liệu đối chứng âm tính và đối chứng dương tính.

TCVN 7391-5:2020

8.3.8 Ủ các bình trong cùng điều kiện như được mô tả trong 8.3.3 trong khoảng thời gian thích hợp (tối thiểu 24 h) tương ứng với xét nghiệm cụ thể đã chọn.

8.3.9 Loại bỏ môi trường nuôi cấy nổi trên mặt trước khi thêm hóa chất/thuốc nhuộm để xác định ảnh hưởng độc tính tế bào theo 8.5.

8.4 Thử nghiệm bằng cách tiếp xúc gián tiếp

8.4.1 Khuếch tán thạch

8.4.1.1 Thử nghiệm này cho phép đánh giá định tính độc tính tế bào. Xét nghiệm này không phù hợp với các chất có thể lọc không thể khuếch tán qua lớp thạch hoặc có thể phản ứng với thạch. Việc sử dụng xét nghiệm khuếch tán thạch để đánh giá độc tính tế bào phải được chứng minh.

8.4.1.2 Dùng pipet lấy một lượng dịch đã biết của huyền phù tế bào được khuấy liên tục cho vào mỗi bình một lượng vừa đủ để thử nghiệm. Xoay nhẹ bình để phân bố đều các tế bào trên bề mặt mỗi bình.

8.4.1.3 Ủ các dịch nuôi cấy ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong môi trường không khí, có hoặc không có carbon dioxide phù hợp với hệ thống đệm được chọn cho môi trường nuôi cấy, cho đến khi các dịch nuôi cấy phát triển xấp xỉ dạng tiền hợp ở giai đoạn logarit của đường cong sinh trưởng.

8.4.1.4 Xác minh độ tiền hợp và hình thái học của các dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử nghiệm.

8.4.1.5 Loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi bình. Sau đó trộn môi trường nuôi cấy mới chứa huyết thanh với thạch tan chảy để thu được nồng độ khối lượng thạch cuối cùng từ 0,5 % đến 2 % và lấy một lượng phù hợp cho mỗi bình. Chỉ sử dụng thạch phù hợp cho sự sinh trưởng của tế bào động vật có vú trong nuôi cấy. Hỗn hợp môi trường thạch/môi trường nuôi cấy phải ở trạng thái lỏng và ở nhiệt độ tương thích với các tế bào động vật có vú.

CHÚ THÍCH: Thạch có sẵn trong các phạm vi trọng lượng phân tử và độ tinh khiết khác nhau.

8.4.1.6 Đặt cẩn thận các mẫu lặp lại của mẫu thử trên tầng thạch rắn trong mỗi bình. Đảm bảo rằng mẫu thử bao phủ khoảng 1/10 bề mặt tầng tế bào.

Các tỷ lệ khác của bề mặt mẫu thử trên bề mặt lớp tế bào có thể được sử dụng nếu được chứng minh.

Để tránh mất nước của môi trường thạch, phải ngâm bất kỳ vật liệu hấp thụ nào vào môi trường nuôi cấy trước khi đặt nó lên môi trường thạch.

8.4.1.7 Chuẩn bị các bình lặp lại với cả vật liệu đối chứng âm tính và vật liệu đối chứng dương tính.

8.4.1.8 Ủ các bình bằng các điều kiện tương tự như được mô tả trong 8.4.1.3 trong 24 h đến 72 h.

8.4.1.9 Kiểm tra các tế bào để xác định ảnh hưởng độc tính tế bào trước và sau khi chuyển cẩn thận mẫu ra khỏi môi trường thạch.

Sử dụng một chất nhuộm sống, ví dụ: đỏ trung tính, có thể hỗ trợ trong việc phát hiện độc tính tế bào. Các chất nhuộm sống có thể được thêm vào trước hoặc sau khi ủ với mẫu thử. Nếu chất nhuộm được thêm vào trước khi ủ, phải bảo vệ môi trường nuôi cấy khỏi ánh sáng để ngăn cản tổn thương tế bào gây ra bởi quá trình quang hoạt hóa của chất nhuộm.

8.4.2 Khuếch tán lên màng lọc

8.4.2.1 Phép thử này cho phép đánh giá định tính độc tính tế bào.

8.4.2.2 Đặt màng lọc không có chất hoạt động bề mặt với kích thước lỗ 0,45 µm vào mỗi bình và thêm một lượng đã biết dịch huyền phù tế bào được khuấy liên tục vào mỗi bình trong số các bình lặp lại vừa đủ để thử nghiệm.

Xoay nhẹ bình để phân phối đều các tế bào lên bề mặt của mỗi màng lọc.

8.4.2.3 Ủ các dịch nuôi cấy ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong môi trường không khí, có hoặc không có carbon dioxide phù hợp với hệ thống đệm được chọn cho môi trường nuôi cấy, cho đến khi các dịch nuôi cấy phát triển xấp xỉ dạng tiền hợp ở giai đoạn logarit của đường cong sinh trưởng.

8.4.2.4 Loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi các bình. Sau đó chuyển các màng lọc, quay mặt dưới có tế bào lên tầng thạch rắn (xem 8.4.1.5).

8.4.2.5 Đặt cẩn thận các mẫu lặp lại của mẫu thử lên mặt không có tế bào (phía trên) của màng lọc. Giữ lại dịch chiết và các hợp chất mới trộn trong các vòng vô hoạt được đặt trên màng lọc.

8.4.2.6 Chuẩn bị các màng lọc lặp lại với cả vật liệu đối chứng âm tính và vật liệu đối chứng dương tính.

8.4.2.7 Ủ các bình bằng các điều kiện tương tự được mô tả trong 8.4.2.3 trong $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$.

8.4.2.8 Cẩn thận lấy mẫu ra khỏi màng lọc và cẩn thận tách màng lọc ra khỏi bề mặt thạch.

8.4.2.9 Xác định ảnh hưởng độc tính tế bào bằng quy trình nhuộm phù hợp.

8.5 Xác định độc tính tế bào

8.5.1 Xác định ảnh hưởng độc tính tế bào bằng phương pháp định tính hoặc định lượng. Tốt hơn là đánh giá định lượng độc tính tế bào. Phương pháp định tính chỉ thích hợp cho mục đích sàng lọc.

TCVN 7391-5:2020

Đánh giá định tính: Kiểm tra các tế bào bằng kính hiển vi bằng cách sử dụng chất nhuộm hóa học nếu muốn. Đánh giá các thay đổi, ví dụ, hình thái học khái quát, không bào hóa, sự tách ra, dung giải tế bào và hợp màng. Sự thay đổi từ hình thái học thông thường phải được ghi lại trong báo cáo thử nghiệm mô tả hoặc định lượng. Một cách hữu ích để phân cấp các mẫu thử nghiệm được nêu trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1 - Phân cấp hình thái học định tính về độc tính tế bào của dịch chiết

Cấp	Khả năng phản ứng	Điều kiện của các loại môi trường nuôi cấy
0	Không	Các hạt tế bào intracytoplasmatic rời rạc, không dung giải tế bào, không làm giảm sự sinh trưởng của tế bào
1	Rất nhẹ	Không quá 20 % các tế bào có hình tròn, được gắn lỏng lẻo và không có các hạt trong tế bào, hoặc cho thấy những thay đổi về hình thái học; thỉnh thoảng có dung giải tế bào; chỉ ức chế sinh trưởng nhẹ.
2	Nhẹ	Không quá 50 % các tế bào là hình tròn, không có các hạt tế bào, không có sự dung giải tế bào mạnh; ức chế sinh trưởng không quá 50 % có thể quan sát được.
3	Vừa phải	Không quá 70 % các lớp tế bào chứa các tế bào tròn hoặc bị dung giải; các lớp tế bào không bị phá hủy hoàn toàn, nhưng có thể quan sát được sự ức chế sinh trưởng hơn 50 %.
4	Nặng	Sự phá hủy gần như hoàn toàn hoặc hoàn toàn đối với các lớp tế bào.

Bảng 2 - Các cấp phản ứng đối với thử nghiệm khuếch tán thạch và màng lọc và thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp

Cấp	Khả năng phản ứng	Mô tả vùng phản ứng
0	Không	Không có khu vực phát hiện xung quanh hoặc dưới mẫu thử
1	Rất nhẹ	Một số tế bào dị dạng hoặc thoái hóa dưới mẫu thử
2	Nhẹ	Vùng giới hạn trong khu vực dưới mẫu thử
3	Vừa phải	Khu vực mở rộng mẫu thử lên tới 1,0 cm
4	Nặng	Vùng mở rộng ra xa hơn 1 cm so với mẫu thử

Phương pháp đánh giá và kết quả đánh giá phải được đưa vào báo cáo thử nghiệm.

Kết quả đạt được là cấp số lớn hơn 2, dựa trên Bảng 1 và 2, được coi là có ảnh hưởng độc tính tế bào.

Đánh giá định lượng: Đo tham số tế bào chết, sự ức chế sinh trưởng tế bào, sự tăng sinh tế bào hoặc hình thành khuẩn lạc. Số lượng tế bào, lượng protein, sự giải phóng enzym, sự giải phóng chất nhuộm sống, sự giảm chất nhuộm sống hoặc bất kỳ thông số có thể đo được khác có thể được định lượng bằng các phương pháp cụ thể. Các phương pháp đo và phản ứng phải được ghi lại trong báo cáo thử nghiệm.

Giảm khả năng sống của tế bào hơn 30 % được coi là ảnh hưởng độc tính tế bào. Các tiêu chí khác, bao gồm các điểm giới hạn khác nhau hoặc tỷ lệ kết quả thử nghiệm-đối chứng chấp nhận được phải được chứng minh đối với các dòng tế bào thay thế hoặc cấu trúc mô nhiều lớp. Các tiêu chí phải được chứng minh và ghi lại.

Các thủ tục được mô tả trong Phụ lục A đến D có thể được sử dụng để xác định định lượng độc tính tế bào của dịch chiết.

CHÚ THÍCH: Các thủ tục A và B đã được chứng minh là phù hợp với các hóa chất trong các nghiên cứu đánh giá xác nhận quốc tế và đối với các trang thiết bị y tế trong thử nghiệm liên phòng quốc tế. Đối với các vật liệu gây độc tính tế bào, các thủ tục này cho phép phân cấp ảnh hưởng độc tính tế bào bằng cách tính giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế ước tính ảnh hưởng đến điểm cuối trong khoảng nghỉ ngơi 50 %). Phụ lục C và D mô tả các thủ tục khác được sử dụng rộng rãi để xác định định lượng độc tính tế bào.

Đối với các phương pháp xác định độc tính tế bào, có thể cần phải kiểm soát nuôi cấy tế bào tại thời điểm "zero" hoặc tại đường cơ sở.

8.5.2 Cần đảm bảo cẩn thận trọng khi lựa chọn phương pháp đánh giá, vì kết quả thử nghiệm có thể không hợp lệ nếu mẫu thử giải phóng các chất gây cản trở hệ thống thử nghiệm hoặc phép đo.

Các vật liệu có thể giải phóng formaldehyd chỉ có thể được thử nghiệm một cách đáng tin cậy khi đánh giá khả năng sống của tế bào.

8.5.3 Nếu có sự khác biệt rõ ràng trong kết quả thử nghiệm đối với các dụng cụ nuôi cấy, thì thử nghiệm này không phù hợp hoặc không hợp lệ. Trong trường hợp này, thử nghiệm phải được lặp lại, hoặc sử dụng một phương pháp thay thế.

8.5.4 Nếu các đối chứng âm tính, dương tính và bất kỳ đối chứng nào khác (tham chiếu, môi trường, mẫu trắng, thuốc thử, v.v...) không có phản ứng mong đợi trong hệ thống thử nghiệm, thì lặp lại toàn bộ các xét nghiệm.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các chi tiết sau:

a) tên và địa chỉ của cơ sở thử nghiệm;

TCVN 7391-5:2020

- b) tên của người đã tiến hành thử nghiệm;
- c) ngày bắt đầu và kết thúc phép thử;
- d) mô tả mẫu;
- e) dòng tế bào, giải thích về sự lựa chọn và các nguồn tế bào;
- f) tên của công ty và lô trung bình, huyết thanh và kháng sinh, khi được thêm vào;
- g) phương pháp khảo nghiệm và lý do;
- h) quy trình chiết (nếu thích hợp) và, nếu có thể, bản chất và nồng độ của chất đã lọc;
- i) đối chứng âm tính, dương tính và đối chứng khác;
- j) phản ứng của tế bào và các quan sát khác;
- k) mọi dữ liệu liên quan khác cần thiết cho việc đánh giá kết quả.

10 Đánh giá kết quả

Việc đánh giá tổng thể kết quả phải được thực hiện bởi một người có khả năng đưa ra quyết định dựa trên dữ liệu thử nghiệm. Dữ liệu độc tính tế bào phải được đánh giá liên quan đến dữ liệu tương thích sinh học khác và mục đích sử dụng của sản phẩm.

Việc giải thích kết quả của phép thử độc tính tế bào phải tính đến việc phân loại trang thiết bị như được nêu trong TCVN 7391-1 (ISO 10993-1).

Nếu có ảnh hưởng độc tính tế bào, có thể thực hiện đánh giá thêm, ví dụ:

- a) các phép thử bổ sung (có/không có huyết thanh, thay đổi mức độ huyết thanh trong môi trường nuôi cấy);
- b) phân tích chiết (ví dụ: dư lượng từ khử khuẩn và các quy trình sản xuất khác), khi thích hợp;
- c) phân tích đáp ứng nồng độ của pha loãng;
- d) đặc tính hóa học của các thành phần có thể lọc được,
- e) các quy trình thử nghiệm khác.

Bất kỳ tác dụng gây độc tính tế bào có thể được quan tâm. Tuy nhiên, chủ yếu là một dấu hiệu cho thấy tiềm năng độc tính *in vivo* và trang thiết bị không nhất thiết phải được xác định là không phù hợp cho một ứng dụng lâm sàng nhất định chỉ dựa trên dữ liệu độc tính tế bào.

Phụ lục A
(tham khảo)

Phép thử độc tính tế bào hấp thu đồ trung tính (NRU)

A.1 Quy định chung

Thủ tục thử nghiệm sau đây dựa trên và chỉ mô tả các phần của Phụ lục C của Tài liệu tham khảo^[1], có liên quan đến thử nghiệm này.

A.2 Quy trình thực nghiệm

A.2.1 Quy trình cơ bản

Các tế bào BALB/c 3T3 được gieo vào các đĩa 96 giếng và được nuôi cấy trong 24 h (~ 1 thời gian nhân đôi) để tạo thành một tầng tế bào đơn bán hợp lưu (xem Tài liệu tham khảo^[5] để biết thêm thông tin về quy trình nuôi cấy và bảo dưỡng tế bào). Sau đó, chúng được phơi nhiễm với hợp chất thử nghiệm trong một phạm vi nồng độ. Sau 24 h phơi nhiễm, NRU được xác định cho từng nồng độ xử lý và được so sánh với nồng độ được xác định trong nuôi cấy đối chứng. Đối với mỗi phương pháp xử lý (nghĩa là nồng độ của hóa chất thử nghiệm), độ ức chế tỷ lệ sinh trưởng được tính, nếu dịch chiết thể hiện tác dụng gây độc tính tế bào trên các tế bào. IC_{50} (nghĩa là nồng độ tạo ra sự giảm 50 % NRU) được tính từ nồng độ-đáp ứng và được biểu thị bằng phần trăm pha loãng của dịch chiết. Các dịch chiết nguyên chất được định danh là 100 % dịch chiết.

A.2.2 Vật liệu

A.2.2.1 Dòng tế bào

Các tế bào BALB/c 3T3, dòng 31 (ví dụ: ECACC86110401, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK; CCL-163, European Collection of Cell Cultures [ATCC], Manassas, VA, USA) và JCRB 9005, được chuẩn bị từ CCL-163 [ATCC], Human Science Research Resources Bank, Osaka, Nhật Bản.

A.2.2.2 Thiết bị kỹ thuật

A.2.2.2.1 Lòng áp, 37 °C, được làm ẩm, 5 % CO₂/không khí [cách khác, trong trường hợp không có chất đệm thích hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào, có thể sử dụng 7,5 % CO₂/không khí vì các tế bào rất nhạy với sự thay đổi pH; tuy nhiên 5 % được sử dụng phổ biến hơn trong hầu hết các phòng thí nghiệm, trong khi HEPES [axit 4- (2-hydroxyethyl) -1- piperazineethanesulfonic acid] được thêm vào để đệm tốt hơn.

TCVN 7391-5:2020

A.2.2.2.2 Tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp, tiêu chuẩn: Nguy hiểm sinh học.

A.2.2.2.3 Bồn nước, 37 °C.

A.2.2.2.4 Kính hiển vi soi ngược phản pha.

A.2.2.2.5 Lò đốt trong phòng thí nghiệm.

A.2.2.2.6 Máy ly tâm, tùy chọn trang bị rôto đĩa vi chuẩn.

A.2.2.2.7 Cân phòng thí nghiệm.

A.2.2.2.8 Máy quang kế đĩa 96 giếng, được trang bị kính lọc 540 nm.

A.2.2.2.9 Máy lắc, cho các đĩa vi chuẩn.

A.2.2.2.10 Bộ đếm tế bào hoặc bộ dụng cụ đếm hồng cầu.

A.2.2.2.11 Dụng cụ hỗ trợ ống hút.

A.2.2.2.12 Pipet, pipet 8 kênh, khối pha loãng.

A.2.2.2.13 Lọ trữ lạnh.

A.2.2.2.14 Bình nuôi cấy mô, 80 cm², 25 cm².

A.2.2.2.15 Đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng.

A.2.2.3 Hóa chất, môi trường và huyết thanh

A.2.2.3.1 Môi trường Eagle đã hiệu chỉnh bởi Dulbecco (DMEM), không có L-glutamine

A.2.2.3.2 L-glutamine, 200 mM hoặc glutamax.

A.2.2.3.3 Huyết thanh bê sơ sinh (NBCS).

QUAN TRỌNG - Không được sử dụng huyết thanh thai nhi (FCS). FCS gây ra O.D. giảm mạnh do sự hình thành không bào trong các tế bào.

Do sự thay đổi rất nhiều của NBCS, trước tiên, kiểm tra thật nhiều các đặc tính kích thích sinh trưởng với các tế bào 3T3 (thời gian nhân đôi từ 20 h đến 25 h) và sau đó dự trữ một lượng NBCS đủ.

A.2.2.3.4 Dung dịch Trypsin/EDTA.

A.2.2.3.5 Nước muối đệm photphat (PBS), không có Ca²⁺ và Mg²⁺ (đối với trypsinization).

A.2.2.3.6 HEPES (xem A.2.2.2.1).

A.2.2.3.7 PBS, với Ca²⁺ và Mg²⁺ (để súc rửa).

A.2.2.3.8 Dung dịch Penicillin/streptomycin.

A.2.2.3.9 Đò trung tính (NR).

A.2.2.3.10 Dimethyl sulfoxide (DMSO), cấp phân tích.

A.2.2.3.11 Ethanol (ETOH), cấp phân tích.

A.2.2.3.12 Axit axetic, lớp phân tích.

A.2.2.3.13 Nước cất hoặc nước tinh khiết bất kỳ phù hợp cho nuôi cấy tế bào.

A.2.2.4 Chuẩn bị**A.2.2.4.1 Quy định chung**

Tất cả các dung dịch (trừ dung dịch gốc NR, môi trường NR và chất khử NR), dụng cụ thủy tinh, v.v..., phải được vô khuẩn và tất cả các quy trình phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn và trong môi trường vô khuẩn của tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp (tiêu chuẩn nguy hiểm sinh học).

A.2.2.4.2 Môi trường

DMEM (được đệm bằng natri bicarbonate) được bổ sung (nồng độ cuối cùng trong DMEM được trích dẫn):

(A) Để đóng băng

- 20 % NBCS
- 7 % đến 10 % DMSO

(B) Đối với nuôi cấy thường quy

- 10 % NBCS
- 4 mM L-glutamine hoặc glutamax
- 100 IU/ml penicillin
- 100 µg/ml streptomycin
- 20 mM HEPES

(C) Để xử lý với các mẫu thử

- 5 % NBCS
- 4 mM glutamine hoặc glutamax
- 100 IU/ml penicillin
- 100 µg/ml streptomycin
- 20 mM HEPES

TCVN 7391-5:2020

Môi trường hoàn chỉnh nên được giữ ở 4 °C và được bảo quản không quá hai tuần.

Nồng độ trong huyết thanh của môi trường xử lý giảm xuống còn 5 %, vì protein huyết thanh có thể che dấu độc tính của chất thử. Huyết thanh không thể được loại trừ hoàn toàn vì sự sinh trưởng của tế bào giảm rõ rệt khi không có huyết thanh.

A.2.2.4.3 Dung dịch gốc đồ trung tính (NR)

- 0,4 g NR dye
- 100 ml H₂O

Pha chế đủ trước khi sử dụng và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong tối đa hai tháng. Các dung dịch gốc đồ trung tính pha chế sẵn có trên thị trường có thể được sử dụng cho đến ngày hết hạn khi được bảo quản theo nhãn.

A.2.2.4.4 Môi trường đồ trung tính (NR)

- 1 ml dung dịch gốc NR
- 79 ml DMEM

Môi trường NR nên được ủ qua đêm ở 37 °C và ly tâm ở 600g trong 10 min (để loại bỏ tinh thể NR) trước khi thêm vào các tế bào. Các quy trình thay thế (ví dụ: lọc millipore) có thể được sử dụng miễn là đảm bảo môi trường NR không có tinh thể. Các phần của môi trường NR phải được duy trì ở 37 °C (ví dụ: trong bể nước) trước khi thêm vào các tế bào. Chúng nên được sử dụng trong vòng 30 min sau khi chuẩn bị và trong vòng 15 min sau khi lấy ra khỏi nơi bảo quản 37 °C.

A.2.2.4.5 Ethanol/dung dịch axit axetic (NRdesorb)

- 1 % dung dịch axit axetic
- 50 % ethanol
- 49 % H₂O

Chuẩn bị ngay trước khi sử dụng. Không bảo quản lâu hơn 1 h.

A.2.2.4.6 Chuẩn bị dịch chiết mẫu

Các mẫu được chiết theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12).

A.2.3 Phương pháp

A.2.3.1 Quy định chung

Đối với các phương pháp nuôi cấy tế bào thường quy, xem Phụ lục C của Tài liệu tham khảo^[1].

A.2.3.2 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (I); đối chứng dương tính (PC)

Một đối chứng dương tính phải được bao gồm trong mọi phép thử độc tính tế bào.

Liên quan đến nhiều hóa chất được hỗ trợ bởi lịch sử đầy đủ hoặc các phép thử lặp lại trong một phòng thí nghiệm và liên phòng thí nghiệm, natri lauryl sulfate (SLS, CAS # 151-21-3) là một trong những thử nghiệm thường xuyên nhất và do đó được khuyến dùng như một PC. Khuyến cáo SLS nên được thử nghiệm theo thang bốn nồng độ: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,2 mg/ml.

Giá trị trung bình lịch sử, IC_{50} , của SLS (Spielmann và cộng sự, 1991^[10]) là 0,093 mg/ml.

CI 95 % (khoảng tin cậy) là 0,070 mg/ml đến 0,116 mg/ml.

Một thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận, nếu IC_{50} cho SLS nằm trong phạm vi 95 % CI.

Nên sử dụng các đối chứng dương tính và đối chứng âm tính [ví dụ: ZDEC và ZDBC (xem chú thích 1 ở cuối trang 8, 3.2 và 3.4)].

A.2.3.3 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (II); mẫu trắng

Giá trị tuyệt đối (không liên quan đến mẫu trắng) của mật độ quang (OD_{540} của NRU) nhận được trong mẫu trắng chưa được xử lý cho biết liệu các tế bào 1×10^4 được gieo trên mỗi giếng có tăng theo cấp số nhân với thời gian nhân đôi bình thường trong hai ngày thử nghiệm hay không.

Thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu OD_{540} trung bình của mẫu trắng là $\geq 0,3$.

Để kiểm tra lỗi gieo tế bào có hệ thống, các mẫu trắng được xử lý trong các điều kiện chiết (xem A.2.2.4.6) và được đặt ở cả bên trái (hàng 2) và bên phải (hàng 11) của đĩa 96 giếng (không được sử dụng hàng 1 và hàng 12, để bố trí đĩa, xem Phụ lục E trong Tài liệu tham khảo^[11]).

Một thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu giá trị trung bình bên trái và bên phải của các mẫu trắng không chênh lệch quá 15 % so với giá trị trung bình của tất cả các mẫu trắng.

Kiểm tra các lỗi gieo tế bào cũng có thể được thực hiện bằng cách kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phân pha để đảm bảo số lượng tế bào phù hợp. Đánh giá kính hiển vi làm giảm nhu cầu về hai hàng mẫu trắng.

A.2.3.4 Kiểm tra chất lượng nồng độ-đáp ứng

IC_{50} có nguồn gốc từ nồng độ-đáp ứng nên được hỗ trợ bởi ít nhất hai, hoặc nếu có thể, ba phản ứng giữa ức chế NRU 10 % đến 90 %. Nếu đây không phải là trường hợp và có thể dễ dàng giảm yếu tố tiến triển nồng độ, từ chối thực nghiệm và lặp lại với hệ số tiến triển nhỏ hơn.

A.2.3.5 Nồng độ dịch chiết mẫu thử**A.2.3.5.1 Thử nghiệm tìm phạm vi**

Thử nghiệm tám nồng độ của dịch chiết mẫu bằng cách pha loãng dung dịch gốc với hệ số không đổi, bao phủ một phạm vi lớn, ví dụ: khoảng thời gian nửa log. Nếu việc giảm khả năng sống của

TCVN 7391-5:2020

nuôi cấy tế bào với nồng độ chiết mẫu cao nhất là 30 % hoặc ít hơn, thì vật liệu phải được coi là không gây độc tính tế bào và không cần thực nghiệm chính nữa.

A.2.3.5.2 Thực nghiệm chính

Tùy thuộc vào độ dốc của đường cong nồng độ-đáp ứng được ước tính từ công cụ tìm phạm vi, hệ số pha loãng/tiến triển trong chuỗi nồng độ của thực nghiệm chính phải nhỏ hơn (ví dụ: $\sqrt[6]{10} = 1,47$). Cố gắng bao phủ phạm vi nồng độ có liên quan (từ 10 % đến 90 % ảnh hưởng) với ít nhất ba điểm của ảnh hưởng được phân loại, tránh quá nhiều nồng độ không gây độc tính tế bào và/hoặc 100 % độc tính tế bào.

A.2.3.6 Quy trình thử nghiệm

QUAN TRỌNG - Sau khi rửa đông từ mẫu gốc, vượt qua hai đến ba lần trước khi sử dụng các tế bào trong thử nghiệm.

Bảng A.1 nêu lưu đồ làm việc của quy trình thử nghiệm.

Ngày thứ nhất

- Chuẩn bị huyền phù tế bào 1×10^5 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy. Sử dụng pipet đa kênh, chỉ phân phối 100 μ l môi trường nuôi cấy vào các giếng ngoại vi của đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng (= mẫu trắng, xem Phụ lục E trong Tài liệu tham khảo^[1]). Trong các giếng còn lại, phân phối 100 μ l huyền phù tế bào 1×10^5 tế bào/ml (= 1×10^4 tế bào/giếng). Chuẩn bị một đĩa cho mỗi dịch chiết mẫu cần thử nghiệm, một đĩa cho PC và một đĩa cho vật liệu đối chứng âm tính nếu có.
- Ủ các tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %) để các tế bào tạo thành một đơn lớp nửa hợp lưu. Thời kỳ ủ bệnh này đảm bảo phục hồi tế bào, tuân thủ và tiến triển đến giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân.
- Kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để đảm bảo rằng sự sinh trưởng của tế bào tương đối đồng đều trên đĩa vi chuẩn. Việc kiểm tra này được thực hiện để xác định lỗi thực nghiệm.

Ngày thứ hai

- Sau 24 h ủ, hút môi trường nuôi cấy khỏi các tế bào.
- Mỗi giếng, thêm 100 μ l môi trường xử lý có chứa nồng độ dịch chiết mẫu thích hợp hoặc đối chứng âm tính hoặc PC hoặc không có gì ngoài tá được lỏng (mẫu trắng).
- Ủ tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %).

Ngày thứ ba

Sau 24 h xử lý, kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để xác định lỗi gieo tế bào có hệ thống và đặc điểm sinh trưởng của tế bào đối chứng và tế bào được xử lý. Ghi lại những thay đổi về hình thái học của các tế bào do ảnh hưởng độc tính tế bào của dịch chiết mẫu thử, nhưng không sử dụng những hồ sơ này để tính liều dung nạp cao nhất (HTD) hoặc bất kỳ biện pháp định lượng độc tính tế bào nào khác. Các đặc tính sinh trưởng không mong muốn của các tế bào đối chứng có thể chỉ ra lỗi thử nghiệm và có thể là nguyên nhân từ chối xét nghiệm.

Việc đo lường NRU dựa trên kết quả của Ellen Borenfreund (Borenfreund và Puermer^[3]). Sự hấp thụ của NR vào lysosome/endosome và không bào của các tế bào sống được sử dụng như một dấu hiệu định lượng về số lượng tế bào và khả năng sống.

- Rửa các tế bào với 150 µl PBS được làm ấm trước. Loại bỏ dung dịch rửa bằng cách gõ nhẹ. Thêm 100 NRI môi trường NR và ủ ở 37 °C trong môi trường ẩm 5 % CO₂ trong 3 h.
- Sau khi ủ, loại bỏ môi trường NR và rửa các tế bào với 150 µl PBS.
- Decant và blot PBS hoàn toàn (tùy chọn, ly tâm đĩa đảo ngược).
- Thêm 150 µl dung dịch khử NR (ETOH/axit axetic) vào tất cả các giếng, kể cả mẫu trắng.
- Lắc nhanh đĩa vi chuẩn trên máy lắc đĩa vi chuẩn trong 10 min cho đến khi NR được tách ra khỏi tế bào và tạo thành dung dịch đồng nhất.
- Đo độ hấp thụ của dung dịch màu thu được ở bước sóng 540 nm trong đầu đọc đĩa vi chuẩn, sử dụng mẫu trắng làm tham chiếu. Lưu dữ liệu thô ở định dạng tệp (ví dụ: ASCII, TXT, XLS) phù hợp để phân tích thêm về nồng độ-đáp ứng và tính toán của IC₅₀.

A.2.4 Phân tích dữ liệu

Một tính toán về khả năng sống của tế bào được biểu thị bằng NRU được thực hiện cho từng nồng độ của dịch chiết mẫu thử bằng cách sử dụng NRU trung bình của sáu giá trị lặp lại trên mỗi nồng độ thử nghiệm. Giá trị này được so sánh với NRU trung bình của tất cả các giá trị mẫu trắng (các mẫu trắng được cung cấp đã đáp ứng các tiêu chí chấp nhận mẫu trắng). Khả năng sống tương đối của tế bào sau đó được biểu thị bằng phần trăm của mẫu trắng chưa được xử lý. Nếu có thể đạt được, tám nồng độ của mỗi hợp chất được thử nghiệm phải trải rộng trong phạm vi không ảnh hưởng đến tổng ức chế khả năng sống của tế bào.

Bảng A.1 – Lưu đồ công việc thử nghiệm độc tính tế bào 3T3 NRU

Thời gian h	Quy trình
00:00	Gieo vào đĩa 96 giếng: 1×10^4 tế bào/100 μ l môi trường nuôi cấy DMEM/giếng Ù (37 °C/5 % CO ₂ /22 h đến 24 h) ↓
24:00	Loại bỏ môi trường nuôi cấy ↓
24:00	Xử lý với tám nồng độ dịch chiết mẫu thử trong môi trường xử lý (100 μ l) (mẫu trắng không được xử lý = môi trường xử lý) Ù (37 °C/5 % CO ₂ /24 h) ↓
48:00	Đánh giá bằng kính hiển vi về sự thay đổi hình thái học Loại bỏ môi trường xử lý Rửa một lần với 150 μ l PBS Thêm 100 μ l môi trường NR Ù (37 °C/5 % CO ₂ /3 h) ↓
51:00	Loại hoàn toàn môi trường NR Rửa một lần với 150 μ l PBS Thêm 150 μ l NR giải hấp cố định (ETOH/dung dịch axit axetic) ↓
51:40	Lắc đĩa trong 10 min
51:50	Phát hiện sự hấp thụ NR ở bước sóng 540 nm (nghĩa là khả năng sống của tế bào)

Nếu khả năng sống tương đối của tế bào đối với nồng độ cao nhất của dịch chiết mẫu (chiết 100 %) thấp hơn 70 % của nhóm đối chứng, thì nồng độ của một hóa chất thử nghiệm phản ánh sự ức chế 50 % khả năng sống của tế bào (nghĩa là IC_{50}) được xác định từ nồng độ-đáp ứng. Điều này có thể được thực hiện bằng cách áp dụng:

- một phương pháp phù hợp đồ họa thủ công,

Nên sử dụng giấy xác suất với thang đo "X = log" và "Y = probit", vì trong hầu hết các trường hợp, hàm đáp ứng tập trung phải trở nên gần như tuyến tính trong phạm vi có liên quan. Giấy bán-log cũng có thể được sử dụng cho kỹ thuật này.

hoặc

- bất kỳ quy trình hồi quy phi tuyến tính thích hợp nào (tốt nhất là hàm Hill⁴⁾ hoặc hồi quy logistic) đối với dữ liệu nồng độ-đáp ứng.

Trước khi sử dụng IC_{50} để tính toán thêm, chất lượng của sự phù hợp cần được kiểm tra một cách thích hợp.

Nếu khả năng sống tương đối của tế bào đối với nồng độ cao nhất của dịch chiết mẫu (chiết 100 %) là $\geq 70\%$ của nhóm đối chứng, thì vật liệu phải được coi là không gây độc tính tế bào.

⁴⁾ Các hàm Hill có hình dạng đơn điệu và sigmoidal, đại diện cho một mô hình chấp nhận được cho nhiều đường cong liều-đáp ứng.

Phụ lục B

(tham khảo)

Phép thử độc tính hình thành khuẩn lạc

B.1 Quy định chung

Thủ tục thử nghiệm dựa trên Phần I của phép thử độc tính tế bào theo hướng dẫn của Nhật Bản đối với các phép thử sinh học cơ bản của vật liệu và trang thiết bị y tế, xem Tài liệu tham khảo^[2].

CHÚ THÍCH: Thủ tục sau đây chỉ mô tả các phần của Phần I liên quan đến phép thử độc tính tế bào.

B.2 Quy trình thực nghiệm

B.2.1 Thủ tục cơ bản

Các tế bào V79 được gieo vào các đĩa sáu giếng và được nuôi cấy trong 24 h để bắt đầu sinh trưởng trong pha logarit. Sau đó, chúng được tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm trong một phạm vi nồng độ. Chúng được ủ trong sáu ngày để làm cho các khuẩn lạc đủ lớn để đếm. Các khuẩn lạc được cố định bằng metanol, nhuộm màu bằng dung dịch Giemsa và được đếm. Nếu dịch chiết thể hiện tác dụng gây độc tính tế bào trên các tế bào, IC_{50} (hiệu suất phủ ức chế nồng độ đến 50 %) được tính và biểu thị bằng phần trăm của dịch chiết.

B.2.2 Vật liệu

B.2.2.1 Dòng tế bào

Các tế bào V79 (JCRB 0603, Ngân hàng Tài nguyên Nghiên cứu Khoa học Con người, Osaka, Nhật Bản, có sẵn từ các ngân hàng tế bào khác của Mỹ và EU).

CHÚ THÍCH: Các tế bào V79 được khuyến nghị vì chúng tạo ra các khuẩn lạc lớn và rõ ràng.

B.2.2.2 Thiết bị kỹ thuật

B.2.2.2.1 Lòng áp, 37 °C, được làm ẩm, 5 % CO₂/không khí.

B.2.2.2.2 Tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp, tiêu chuẩn: Nguy hiểm sinh học.

B.2.2.2.3 Bồn nước, 37 °C.

B.2.2.2.4 Kính hiển vi soi ngược phân pha.

B.2.2.2.5 Kính hiển vi lập thể.

B.2.2.2.6 Lò đốt trong phòng thí nghiệm.

B.2.2.2.7 Cân phòng thí nghiệm.

B.2.2.2.8 Bộ đếm tế bào hoặc hemocytometer.

B.2.2.2.9 Dụng cụ hỗ trợ ống hút.

B.2.2.2.10 Pipet.

B.2.2.2.11 Bình nuôi cấy mô, 75 cm², 25 cm² hoặc đĩa nuôi cấy mô, đường kính 100 mm.

B.2.2.2.12 Đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 6 giếng.

B.2.2.3 Hóa chất, môi trường và huyết thanh

B.2.2.3.1 Môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (MEM), chứa dung dịch muối cân bằng Earle.

B.2.2.3.2 Huyết thanh thai bê (FCS).

CHÚ THÍCH: Do sự biến động rất nhiều của FCS, trước tiên kiểm tra thật nhiều các đặc tính kích thích tăng trưởng với các tế bào V79 và sau đó dự trữ đủ lượng FCS.

B.2.2.3.3 Dung dịch Trypsin/EDTA.

B.2.2.3.4 Nước muối đệm photphat (PBS), không có Ca²⁺ và Mg²⁺ (đối với trypsinization).

B.2.2.3.5 Dung dịch Penicillin/streptomycin.

B.2.2.3.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO), cấp phân tích.

B.2.2.3.7 Metanol, cấp phân tích.

B.2.2.3.8 Dung dịch Giemsa.

B.2.2.3.9 Dung dịch đệm photphat.

B.2.2.3.10 Nước cất hoặc nước tinh khiết bất kỳ phù hợp cho nuôi cấy tế bào.

B.2.2.3.11 Natri bicarbonate.

B.2.2.3.12 L-glutamine.

B.2.2.3.13 Dung dịch axit amin không thiết yếu MEM.

B.2.2.3.14 Natri pyruvate, 100 mM.

B.2.2.4 Chuẩn bị

B.2.2.4.1 Quy định chung

Tất cả các dung dịch (trừ dung dịch Giemsa), dụng cụ thủy tinh, v.v..., phải được vô khuẩn và tất cả các quy trình phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn và trong môi trường vô khuẩn của tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp (tiêu chuẩn nguy hiểm sinh học).

B.2.2.4.2 Môi trường

1 000 ml Eagle MEM được bổ sung như sau:

(A) Để đông băng và nuôi cấy thường quy, môi trường có 10 % FCS được sử dụng (MEM 10)

- 111 ml FCS
- 2,2 g natri bicarbonate
- 0,292 g L-glutamine

(B) Để chiết và xử lý, môi trường có 5 % FCS được sử dụng (MEM 05)

- 53,5 ml FCS
- 5 ml dung dịch axit amin không thiết yếu MEM
- 10 ml natri pyruvate, 100 mM
- 0,292 g L-glutamine
- 2,2 g natri bicarbonate

Môi trường hoàn chỉnh phải được giữ ở 4 °C và được bảo quản không quá 1 tháng.

Nồng độ trong huyết thanh của môi trường xử lý giảm xuống còn 5 %, vì protein huyết thanh có thể che dấu độc tính của chất thử. Huyết thanh không thể được loại trừ hoàn toàn vì sự sinh trưởng của tế bào giảm rõ rệt khi không có huyết thanh. Một lượng kháng sinh thích hợp có thể được thêm vào trong môi trường trên trừ khi chúng ảnh hưởng xấu đến xét nghiệm.

B.2.2.4.3 Dung dịch Giemsa 5 %

- 5 ml Dung dịch Giemsa
- 95 ml dung dịch đệm phosphate, bất kỳ loại nào, pH 6,5 đến pH 7,5

Chuẩn bị ngay trước khi sử dụng.

B.2.2.4.4 Chuẩn bị dịch chiết mẫu

Các mẫu được chiết theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12), nhưng tỷ lệ chiết của diện tích bề mặt trên mỗi thể tích chiết được khuyến nghị ở mức 6 cm²/ml và khối lượng trên mỗi thể tích chiết được khuyến nghị ở mức 0,1 g/ml. Xem Tài liệu tham khảo^{[6], [7] và [11]}.

Các dịch chiết được phân tách bằng decantation, là dịch chiết được định danh 100 %. Dịch chiết 100 % được pha loãng với môi trường MEM05 để cung cấp các độ bền khác nhau của dịch chiết pha loãng.

B.2.3 Phương pháp

B.2.3.1 Quy định chung

Đối với các phương pháp nuôi cấy tế bào thường quy, xem Phụ lục C của Tài liệu tham khảo^[1].

B.2.3.2 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (I); đối chứng dương tính (PC) và đối chứng âm tính (NC)

Đối chứng dương tính và âm tính phải được bao gồm trong mọi phép thử độc tính tế bào. Đối chứng dương tính và âm tính được khuyến nghị, ví dụ: ZDEC và ZDBC (xem chú thích 1 ở cuối trang 8).

Các tiêu chí chấp nhận sau đây nên được sử dụng cho ZDEC và ZDBC:

- a) IC_{50} cho ZDEC không được vượt quá 7 %;
- b) IC_{50} cho ZDBC không được vượt quá 80 %.

B.2.3.3 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (II); mẫu trắng

Một phép thử đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu số lượng khuẩn lạc trung bình trong mẫu trắng ít nhất là 70 % số lượng tế bào được mạ trên mỗi giếng.

B.2.3.4 Kiểm tra chất lượng nồng độ-đáp ứng

IC_{50} có nguồn gốc từ nồng độ-đáp ứng phải được hỗ trợ bởi ít nhất hai hoặc nếu có thể, ba phản hồi giữa ức chế 10 % đến 90 % đối với đối chứng. Nếu đây không phải là trường hợp và có thể dễ dàng giảm yếu tố tiến triển nồng độ, từ chối thử nghiệm và lặp lại với hệ số tiến triển nhỏ hơn.

B.2.3.5 Nồng độ dịch chiết mẫu thử

B.2.3.5.1 Thực nghiệm tìm phạm vi

Thử nghiệm bốn nồng độ của dịch chiết mẫu bằng cách pha loãng dung dịch gốc với hệ số không đổi, bao phủ một phạm vi lớn, ví dụ: $1 \geq 1/10 \geq 1/100 \geq 1/1000$. Nếu giảm khả năng sống của nuôi cấy tế bào với nồng độ cao nhất của dịch chiết mẫu là 30 % hoặc ít hơn, thì vật liệu phải được coi là không gây độc tính tế bào và không cần thực nghiệm chính nữa.

B.2.3.5.2 Thực nghiệm chính

Tùy thuộc vào độ dốc của đường cong nồng độ-đáp ứng được ước tính từ công cụ tìm phạm vi, hệ số pha loãng/tiến triển trong chuỗi nồng độ của thực nghiệm chính phải nhỏ hơn. Cố gắng bao phủ phạm vi nồng độ có liên quan (từ 10 % đến 90 % ảnh hưởng) với ít nhất ba điểm của ảnh hưởng được phân cấp, tránh quá nhiều nồng độ không gây độc tính tế bào và/hoặc 100 % độc tính tế bào.

B.2.3.6 Quy trình thử nghiệm

QUAN TRỌNG - Sau khi rã đông từ mẫu gốc, qua hai đến ba lần trước khi sử dụng các tế bào trong thử nghiệm.

Ngày thứ nhất

Chuẩn bị huyền phù tế bào 33,3 tế bào/ml trong môi trường MEM05. Đặt 3 ml huyền phù vào mỗi giếng của một đĩa 6 giếng.

Ngày thứ hai

Sau 24 h ủ, hút môi trường nuôi cấy từ mỗi giếng. Thêm 2 ml dịch chiết 100 % hoặc pha loãng với môi trường MEM05. Kiểm tra từng nồng độ trong ba lần. Ủ chúng trong lồng ấp thêm 6 ngày nữa.

Ngày thứ tám

Hút môi trường xử lý từ mỗi giếng, rửa giếng bằng PBS, cố định khuẩn lạc bằng metanol và nhuộm chúng bằng dung dịch Giemsa 5 %. Đếm số lượng khuẩn lạc trong mỗi giếng.

B.2.3.7 Trình bày kết quả

- Quan sát các giếng bằng kính hiển vi lập thể và đếm số lượng khuẩn lạc gồm 50 tế bào trở lên trong mỗi giếng.
- Ghi lại số lượng khuẩn lạc trong giếng.
- Tính số lượng khuẩn lạc trung bình cho mỗi nồng độ dịch chiết.
- Chia số này cho nhóm đối chứng và biểu thị thương số (hiệu suất phủ: PE) theo phần trăm.
- Nếu hiệu suất phủ đối với nồng độ cao nhất của dịch chiết mẫu (chiết 100 %) thấp hơn 70 % của nhóm đối chứng, vật liệu phải được coi là có khả năng gây độc tính tế bào và độc tính tế bào của các mẫu thử được biểu thị bằng giá trị IC_{50} theo phần trăm.
- IC_{50} (nồng độ PE ức chế đến 50 %) được tính là liều có tỷ lệ sống tương đối 50 %, được tính từ dòng truyền qua một liều có tỷ lệ sống cao hơn và liều có tỷ lệ sống thấp hơn 50 %.
- Nếu hiệu suất phủ là ≥ 70 % của nhóm đối chứng, vật liệu phải được coi là không gây độc tính tế bào.

CHÚ THÍCH: Khi hiệu suất phủ ở nồng độ cao nhất nằm trong khoảng từ 50 % đến 70 %, có thể không thực tế khi tính giá trị IC_{50} so với nồng độ cao nhất.

B.2.4 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải được chuẩn bị theo Điều 9; ngoài ra, những điều sau đây phải được đưa ra:

- a) đối chứng PE trong các điều kiện nhất định;
- b) tất cả dữ liệu thử nghiệm, bao gồm số lượng khuẩn lạc, đường cong ức chế hình thành khuẩn lạc và, nếu có thể, các giá trị IC_{50} nhận được đối với các mẫu thử nghiệm.

Phụ lục C
(tham khảo)

Phép thử độc tính tế bào MTT

C.1 Quy định chung

Thủ tục thử nghiệm sau đây dựa trên việc đo khả năng sống của các tế bào thông qua hoạt động trao đổi chất, xem Tài liệu tham khảo^[9]. MTT tan trong nước màu vàng (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazoliumbromid) được chuyển hóa giảm trong các tế bào sống thành formazan không hòa tan màu xanh tím. Số lượng tế bào sống tương quan với cường độ màu được xác định bằng phép đo trắc quang sau khi hòa tan formazan trong rượu.

C.2 Quy trình thực nghiệm

C.2.1 Thủ tục cơ bản

Các tế bào L929 được gieo vào các đĩa 96 giếng và được nuôi cấy trong 24 h (~1 thời gian nhân đôi) để tạo thành một đơn lớp bán hợp lưu (xem Tài liệu tham khảo^[5] để biết thêm thông tin về quy trình nuôi cấy và bảo dưỡng tế bào). Sau đó, chúng được tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm trong một phạm vi nồng độ. Sau 24 h tiếp xúc, sự hình thành formazan được xác định cho từng nồng độ xử lý và được so sánh với nồng độ được xác định trong nuôi cấy đối chứng. Đối với mỗi điều trị, phần trăm ức chế sinh trưởng được tính toán.

C.2.2 Vật liệu

C.2.2.1 Dòng tế bào

Các tế bào L-929 (NCTC clone 929: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC số 88102702, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK). Nuôi cấy tế bào phải không mang mầm nguyên sinh.

C.2.2.2 Thiết bị kỹ thuật

C.2.2.2.1 Lò ấp, 37 °C, độ ẩm, 5 % CO₂/không khí.

C.2.2.2.2 Tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp, tiêu chuẩn: Nguy hiểm sinh học.

C.2.2.2.3 Bồn nước, 37 °C.

C.2.2.2.4 Kính hiển vi soi ngược phân pha.

C.2.2.2.5 Lò đốt trong phòng thí nghiệm.

C.2.2.2.6 Máy ly tâm, tùy chọn trang bị rôto đĩa vi chuẩn.

C.2.2.2.7 Cân phòng thí nghiệm.

C.2.2.2.8 Máy quang kế đĩa 96 giếng, được trang bị kính lọc 570 nm (tham khảo 650 nm).

C.2.2.2.9 Máy lắc, cho các đĩa vi chuẩn.

C.2.2.2.10 Bộ đếm tế bào hoặc bộ dụng cụ đếm hồng cầu.

C.2.2.2.11 Dụng cụ hỗ trợ ống hút.

C.2.2.2.12 Pipet, pipet 8 kênh, khối pha loãng.

C.2.2.2.13 Lọ trữ lạnh.

C.2.2.2.14 Bình nuôi cấy mô hoặc đĩa petri nuôi cấy mô.

C.2.2.2.15 Đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng.

C.2.2.3 Hóa chất, môi trường và huyết thanh

C.2.2.3.1 Môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (MEM), không có phenol đỏ, không có glutamine và không có NaHCO_3 .

C.2.2.3.2 Huyết thanh thai bê (FCS).

C.2.2.3.3 Dung dịch Trypsin/EDTA.

C.2.2.3.4 Nước muối đệm phát phát (PBS).

C.2.2.3.5 MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid).

C.2.2.3.6 Isopropanol, cấp phân tích.

C.2.2.4 Chuẩn bị**C.2.2.4.1 Quy định chung**

Tất cả các dung dịch, dụng cụ thủy tinh, v.v..., phải được vô khuẩn và tất cả các quy trình phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn và trong môi trường vô khuẩn của tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp (tiêu chuẩn nguy hiểm sinh học).

C.2.2.4.2 Môi trường

MEM (được đệm bằng natri bicarbonate) được bổ sung (nồng độ cuối cùng trong MEM được trích dẫn):

(A) Đối với đóng băng

- 20 % FCS
- 7 % đến 10 % DMSO

TCVN 7391-5:2020

(B) Đối với nuôi cấy thường quy

- 10 % FCS
- 4 mM glutamine hoặc glutamax
- 100 IU/ml penicillin
- 100 µg/ml streptomycin

Môi trường hoàn chỉnh phải được giữ ở 4 °C và được bảo quản không quá hai tuần.

C.2.2.4.3 Dung dịch MTT

MTT được hòa tan trong MEM mà không cần bổ sung và không có phenol đỏ ở nồng độ 1 mg/ml. Dung dịch được khử khuẩn bằng cách lọc vô khuẩn bằng các màng lọc dạng xi lanh (kích thước lỗ rỗng 0,22 µm). Các dung dịch nên được sử dụng cùng một ngày.

C.2.2.4.4 Chuẩn bị dịch chiết mẫu

Các mẫu được chiết theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12).

C.2.3 Phương pháp

C.2.3.1 Quy định chung

Đối với các phương pháp nuôi cấy tế bào thường quy, xem Phụ lục C của Tài liệu tham khảo^[1].

C.2.3.2 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (I); đối chứng dương tính (PC) và đối chứng âm tính (NC)

Đối chứng dương tính và âm tính nên được đưa vào trong mọi phép thử độc tính tế bào. Đối chứng dương tính và âm tính được khuyến nghị, ví dụ: ZDEC và ZDBC (xem chú thích 1 ở cuối trang 8).

C.2.3.3 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (II); mẫu trắng

Giá trị tuyệt đối của mật độ quang, OD_{570} , thu được trong mẫu trắng chưa được xử lý cho biết liệu các tế bào 1×10^4 được gieo trên mỗi giếng có tăng theo cấp số nhân với thời gian nhân đôi bình thường trong hai ngày thử nghiệm hay không.

Thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu OD_{570} trung bình của mẫu trắng là $\geq 0,2$.

Để kiểm tra lỗi gieo tế bào có hệ thống, các mẫu trắng được đặt cả ở bên trái (hàng 2) và bên phải (hàng 11) của đĩa 96 giếng (hàng 1 và hàng 12 phải không được sử dụng; để bố trí đĩa, xem Phụ lục E trong tài liệu tham khảo [1]).

Một thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu giá trị trung bình bên trái và bên phải của các mẫu trắng không chênh lệch quá 15 % so với giá trị trung bình của tất cả các mẫu trắng.

Kiểm tra các lõi gieo tế bào cũng có thể được thực hiện bằng cách kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để đảm bảo số lượng tế bào phù hợp. Đánh giá kính hiển vi làm giảm nhu cầu về hai mẫu trắng.

C.2.3.4 Quy trình thử nghiệm

QUAN TRỌNG - Sau khi rã đông từ kho, vượt qua hai đến ba lần trước khi sử dụng các tế bào trong thử nghiệm.

Bảng C.1 nêu lưu đồ công việc của quy trình thử nghiệm.

Ngày đầu tiên sau khi sinh trưởng các tế bào từ kho đông lạnh

- Nuôi cấy tế bào được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy bằng cách tiêu hóa enzym (trypsin/EDTA) và huyền phù tế bào được ly tâm (200 g, 3 min). Các tế bào sau đó được tái huyền phù trong môi trường nuôi cấy và huyền phù tế bào được điều chỉnh ở mật độ 1×10^5 tế bào/ml. Sử dụng pipet đa kênh, chỉ phân phối 100 μ l môi trường nuôi cấy (mẫu trắng) vào các giếng ngoại vi của đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng (= mẫu trắng, xem Phụ lục E trong Tài liệu tham khảo⁽¹⁾). Trong các giếng còn lại, phân phối 100 μ l huyền phù tế bào 1×10^5 tế bào/ml (= 1×10^4 tế bào/giếng).
- Ủ các tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %) để các tế bào tạo thành một đơn lớp nửa hợp lưu. Thời kỳ ủ bệnh này đảm bảo phục hồi tế bào, và tuân thủ và tiến triển đến giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân.
- Kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để đảm bảo rằng sự sinh trưởng của tế bào tương đối đồng đều trên đĩa vi chuẩn. Kiểm tra này được thực hiện để xác định lõi thử nghiệm.

Ngày thứ hai

- Sau 24 h ủ, hút môi trường nuôi cấy khỏi các tế bào.

Mỗi giếng, thêm 100 μ l môi trường xử lý có chứa nồng độ chiết mẫu thích hợp, hoặc đối chứng âm hoặc PC, hoặc không có gì ngoài mẫu trắng. Ít nhất bốn nồng độ khác nhau của dịch chiết thử nghiệm hoặc dịch chiết đối chứng dương phải được kiểm tra. Nồng độ cao nhất được sử dụng phải là 100 % dịch chiết và các nồng độ khác phải được đặt cách nhau đầy đủ trong một phạm vi logarit duy nhất. Đối với đối chứng âm tính, chỉ nên kiểm tra dịch chiết 100 %. Môi trường nuôi cấy nên được sử dụng như mẫu trắng.

- Ủ tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %).

Ngày thứ ba

Sau 24 h xử lý, kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để xác định lõi gieo tế bào có hệ thống và đặc điểm sinh trưởng của tế bào đối chứng và tế bào được xử lý. Ghi lại những thay đổi về hình thái của các tế bào do ảnh hưởng độc tính tế bào của dịch chiết mẫu thử, nhưng

TCVN 7391-5:2020

không sử dụng những hồ sơ này cho bất kỳ phép đo định lượng nào về độc tính tế bào. Các đặc tính sinh trưởng không mong muốn của các tế bào đối chứng có thể chỉ ra lỗi thử nghiệm và có thể là nguyên nhân từ chối xét nghiệm.

Sau khi kiểm tra các đĩa, cẩn thận lấy môi trường nuôi cấy ra khỏi các đĩa. Đây là một bước quan trọng, bởi vì các hóa chất khử trong dịch chiết cũng có thể làm giảm MTT, gây ra kết quả âm tính giả. 50 µl dung dịch MTT (xem C.2.2.4.3) sau đó được thêm vào từng giếng thử nghiệm và các đĩa được ủ tiếp trong 2 h trong tủ ấm ở 37 °C. Sau đó, dung dịch MTT được loại bỏ và 100 µl isopropanol được thêm vào trong mỗi giếng. Lắc đĩa này và sau đó chuyển nó vào một đầu đọc vi bản được trang bị kính lọc 570 nm để đọc độ hấp thụ (bước sóng tham chiếu 650 nm).

Bảng C.1 – Lưu đồ công việc kiểm tra độc tính tế bào MTT

Thời gian h	Quy trình
00:00	Gieo vào đĩa 96 giếng: 1×10^4 tế bào/100 µl môi trường nuôi cấy MEM/giếng Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /22 h đến 26 h) ↓
24:00	Loại bỏ môi trường nuôi cấy ↓
24:00	Xử lý với nồng độ ≥ 4 của dịch chiết mẫu thử trong môi trường xử lý (100 µl) (mẫu trắng không được xử lý = môi trường xử lý) Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /24 h) ↓
48:00	Đánh giá bằng kính hiển vi về sự thay đổi hình thái học Loại bỏ môi trường nuôi cấy Thêm dung dịch MTT 50 µl Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /2 h) ↓
51:00	Loại bỏ dung dịch MTT Thêm 100 ml isopropanol vào mỗi giếng Lắc đĩa
51:30	Phát hiện sự hấp thụ ở bước sóng 570 nm (tham khảo 650 nm)

C.2.4 Ghi dữ liệu

Dữ liệu được tạo phải được ghi lại trong tệp dữ liệu thô. Các kết quả phải được trình bày dưới dạng bảng, bao gồm các nhóm thử nghiệm với mục thử nghiệm, các đối chứng âm tính, mẫu trắng và các đối chứng dương tính.

C.2.5 Phân tích dữ liệu

Việc giảm số lượng tế bào sống dẫn đến giảm hoạt động trao đổi chất trong mẫu. Sự giảm này tương quan trực tiếp với lượng formazan màu xanh tím được hình thành, như được theo dõi bởi mật độ quang học ở bước sóng 570 nm. Để tính mức giảm khả năng sống so với mẫu trắng, sử dụng Công thức (C.1):

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad (\text{C.1})$$

trong đó:

OD_{570e} là giá trị trung bình của mật độ quang đo được của dịch chiết 100 % của mẫu thử;

OD_{570b} là giá trị trung bình của mật độ quang đo được của các mẫu trắng.

Giá trị Viab.% càng thấp thì khả năng gây độc tính tế bào của vật phẩm thử nghiệm càng cao.

Nếu khả năng sống giảm xuống < 70 % mẫu trắng, có khả năng gây độc tính tế bào. Dịch chiết 50 % của mẫu thử ít nhất phải có cùng khả năng hoặc cao hơn khả năng dịch chiết 100 %; nếu không nên thử nghiệm lặp lại.

Phụ lục D

(tham khảo)

Phép thử độc tính tế bào XTT

D.1 Quy định chung

Thủ tục kiểm tra sau đây dựa trên việc đo khả năng sống của các tế bào thông qua dehydrogenase ty thể, xem Tài liệu tham khảo^[9].

XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5 - [(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium hydroxide) được chuyển hóa trong các tế bào sống thành sản phẩm formazan tan trong nước. Số lượng tế bào sống tương quan với cường độ màu được xác định bằng phép đo trắc quang.

D.2 Quy trình thực nghiệm

D.2.1 Thủ tục cơ bản

Các tế bào L929 được gieo vào các đĩa 96 giếng và được nuôi cấy trong 24 h (~ 1 thời gian nhân đôi) để tạo thành một đơn lớp bán hợp lưu (xem Tài liệu tham khảo^[5] để biết thêm thông tin về quy trình nuôi cấy và bảo trì tế bào). Sau đó, chúng được tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm trong một phạm vi nồng độ. Sau 24 h tiếp xúc, sự hình thành formazan được xác định cho từng nồng độ xử lý và được so sánh với nồng độ được xác định trong nuôi cấy đối chứng. Đối với mỗi điều trị, phần trăm ức chế sinh trưởng được tính toán.

D.2.2 Vật liệu

D.2.2.1 Dòng tế bào

Các tế bào L929 (NCTC clone 929: CCL 1, Bộ sưu tập nuôi cấy kiểu Mỹ [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC số 88102702, Bộ sưu tập tế bào nuôi cấy châu Âu, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK). Nuôi cấy tế bào phải không mang nấm nguyên sinh.

D.2.2.2 Thiết bị kỹ thuật

D.2.2.2.1 Lòng áp, 37 °C, độ ẩm, 5 % CO₂/không khí.

D.2.2.2.2 Tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp, tiêu chuẩn: Nguy hiểm sinh học.

D.2.2.2.3 Bồn nước, 37 °C.

D.2.2.2.4 Kính hiển vi soi ngược phân pha.

D.2.2.2.5 Lò đốt trong phòng thí nghiệm.

D.2.2.2.6 Máy ly tâm, tùy chọn trang bị rôto đĩa vi chuẩn.

D.2.2.2.7 Cân phòng thí nghiệm.

D.2.2.2.8 Máy quang kế đĩa 96 giếng, được trang bị kính lọc 450 nm (tham khảo 650 nm).

D.2.2.2.9 Máy lắc, cho các đĩa vi chuẩn.

D.2.2.2.10 Bộ đếm tế bào hoặc bộ dụng cụ đếm hồng cầu.

D.2.2.2.11 Dụng cụ hỗ trợ ống hút.

D.2.2.2.12 Pipet, pipet 8 kênh, khối pha loãng.

D.2.2.2.13 Lọ trữ lạnh.

D.2.2.2.14 Bình nuôi cấy mô hoặc đĩa petri nuôi cấy mô.

D.2.2.2.15 Đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng.

D.2.2.3 Hóa chất, môi trường và huyết thanh

D.2.2.3.1 Môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (MEM), không có phenol đỏ, không có glutamine và không có NaHCO_3 .

D.2.2.3.2 Huyết thanh thai bê (FCS).

D.2.2.3.3 Dung dịch Trypsin/EDTA.

D.2.2.3.4 Nước muối đệm phát phát (PBS).

D.2.2.3.5 XTT (2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl] -2H-tetrazolium-5-carboxyaniline muối bên trong).

D.2.2.3.6 PMS (phenazine metosulfate).

D.2.2.4 Chuẩn bị

D.2.2.4.1 Quy định chung

Tất cả các dung dịch, dụng cụ thủy tinh, v.v..., phải được vô khuẩn và tất cả các quy trình phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn và trong môi trường vô khuẩn của tủ cấy vi sinh (vô trùng) thổi dòng khí theo lớp (tiêu chuẩn nguy hiểm sinh học).

D.2.2.4.2 Môi trường

MEM (được đệm bằng natri bicarbonate) được bổ sung (nồng độ cuối cùng trong MEM được trích dẫn):

(A) Đối với đóng băng

- 20 % FCS
- 7 % đến 10 % DMSO

TCVN 7391-5:2020

(B) Đối với nuôi cấy thường quy

- 10 % FCS
- 4 mM glutamine hoặc glutamax
- 100 IU/ml penicillin
- 100 µg/ml streptomycin

Môi trường hoàn chỉnh phải được giữ ở 4 °C và được bảo quản không quá hai tuần.

D.2.2.4.3 Dung dịch XTT/PMS

XTT được hòa tan trong 56 °C đến 60 °C MEM, không có màu đỏ phenol, ở nồng độ 1 mg/ml với sự trợ giúp của máy lắc. Dung dịch được khử khuẩn bằng cách lọc vô khuẩn bằng các màng lọc dạng xi lanh (kích thước lỗ rỗng 0,22 µm). PMS (phenazine metosulfate) được chế tạo dưới dạng dung dịch 5 mM trong dung dịch đệm PBS và được lọc vô khuẩn qua màng lọc vô khuẩn 0,22 µm.

Dung dịch PMS được thêm vào dung dịch XTT ngay trước khi sử dụng với nồng độ 25 µM (5 µl dung dịch XTT PMS/ml 5 mM). Dung dịch XTT/PMS sau đó ngay lập tức được thêm vào các giếng thử nghiệm.

D.2.2.4.4 Chuẩn bị dịch chiết mẫu

Các mẫu được chiết theo TCVN 7391-12 (ISO 10993-12), sử dụng MEM không có phenol đỏ và với FBS.

D.2.3 Phương pháp

D.2.3.1 Quy định chung

Đối với các phương pháp nuôi cấy tế bào thường quy, xem Phụ lục C của Tài liệu tham khảo^[1].

D.2.3.2 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (I); đối chứng dương tính (PC) và đối chứng âm tính (NC)

Đối chứng dương tính và âm tính phải được bao gồm trong mọi phép thử độc tính tế bào. Đối chứng dương tính và âm tính được khuyến nghị, ví dụ: ZDEC và ZDBC (xem chú thích 1 ở cuối trang 8).

D.2.3.3 Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (II); mẫu trắng

Giá trị tuyệt đối của mật độ quang (OD_{450}) nhận được trong mẫu trắng chưa được xử lý cho biết liệu các tế bào 1×10^4 được gieo trên mỗi giếng có tăng theo cấp số nhân với thời gian nhân đôi bình thường trong hai ngày thử nghiệm hay không.

Một thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu OD_{450} trung bình của mẫu trắng là $\geq 0,2$.

Để kiểm tra lỗi gieo tế bào có hệ thống, các mẫu trắng được đặt cả ở bên trái (hàng 2) và bên phải (hàng 11) của đĩa 96 giếng (hàng 1 và hàng 12 phải không được sử dụng; để bố trí đĩa, xem Phụ lục E trong tài liệu tham khảo^[1]).

Một thử nghiệm đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nếu giá trị trung bình bên trái và bên phải của các mẫu trắng không chênh lệch quá 15 % so với giá trị trung bình của tất cả các mẫu trắng.

Kiểm tra các lỗi gieo tế bào cũng có thể được thực hiện bằng cách kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để đảm bảo số lượng tế bào phù hợp. Đánh giá kính hiển vi làm giảm nhu cầu về hai mẫu trắng.

D.2.3.4 Quy trình thử nghiệm

QUAN TRỌNG - Sau khi rã đông từ kho, qua hai đến ba lần trước khi sử dụng các tế bào trong thử nghiệm.

Bảng D.1 nêu lưu đồ công việc của quy trình thử nghiệm.

Ngày đầu tiên sau khi sinh trưởng các tế bào từ kho đông lạnh

- Dịch nuôi cấy tế bào được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy theo cách phân hủy bằng enzym (trypsin/EDTA) và huyền phù tế bào được ly tâm (200 g, 3 min). Các tế bào sau đó được tái huyền phù trong môi trường nuôi cấy và huyền phù tế bào được điều chỉnh ở mật độ 1×10^5 tế bào/ml. Sử dụng pipet đa kênh, chỉ phân phối 100 μ l môi trường nuôi cấy (mẫu trắng) vào các giếng ngoại vi của đĩa vi chuẩn nuôi cấy mô 96 giếng (= mẫu trắng, xem Phụ lục E trong Tài liệu tham khảo^[1]). Trong các giếng còn lại, phân phối 100 μ l huyền phù tế bào 1×10^5 tế bào/ml (= 1×10^4 tế bào/giếng).
- Ủ các tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %) để các tế bào tạo thành một đơn lớp nửa hợp lưu. Thời kỳ ủ bệnh này đảm bảo phục hồi tế bào, và tuân thủ và tiến triển đến giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân.
- Kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để đảm bảo rằng sự sinh trưởng của tế bào tương đối đồng đều trên đĩa vi chuẩn. Kiểm tra này được thực hiện để xác định lỗi thử nghiệm.

Ngày thứ hai

- Sau 24 h ủ, hút môi trường nuôi cấy từ các tế bào.
- Mỗi giếng, thêm 100 μ l môi trường xử lý có chứa nồng độ chiết mẫu thích hợp, hoặc đối chứng âm hoặc PC, hoặc không có gì ngoài mẫu trắng. Ít nhất bốn nồng độ khác nhau của dịch chiết thử nghiệm hoặc dịch chiết đối chứng dương phải được kiểm tra. Nồng độ cao nhất được sử dụng phải là 100 % dịch chiết và các nồng độ khác phải được đặt cách nhau đầy đủ trong một phạm vi logarit duy nhất. Đối với đối chứng âm tính, chỉ nên kiểm tra dịch chiết 100 %. Môi trường nuôi cấy nên được sử dụng như mẫu trắng.

- Ủ tế bào trong 24 h (5 % CO₂, 37 °C, độ ẩm > 90 %).

Ngày thứ ba

Sau 24 h xử lý, kiểm tra từng đĩa dưới kính hiển vi soi ngược phản pha để xác định lỗi gieo tế bào có hệ thống và đặc điểm sinh trưởng của tế bào đối chứng và tế bào được xử lý. Ghi lại những thay đổi về hình thái của các tế bào do ảnh hưởng độc tính tế bào của dịch chiết mẫu thử, nhưng không sử dụng các hồ sơ này cho bất kỳ phép đo định lượng nào về độc tính tế bào. Các đặc tính sinh trưởng không mong muốn của các tế bào có thể chỉ ra lỗi thử nghiệm và có thể là nguyên nhân từ chối xét nghiệm.

Sau khi kiểm tra các đĩa, 50 µl dung dịch XTT/PMS được thêm vào từng giếng thử nghiệm và các đĩa được tiếp tục ủ trong 3 h đến 5 h trong tủ ấm ở 37 °C. Các đĩa nên được giữ trong môi trường tối. Sau đó, các đĩa được lắc cẩn thận và một lượng 100 µl được chuyển từ mỗi giếng vào giếng tương ứng của một đĩa mới và đĩa này sau đó được chuyển đến một đầu đọc vi mô được trang bị kính lọc 450 nm để đọc độ hấp thụ (bước sóng tham chiếu 630 nm).

Bảng D.1 - Luồng công việc kiểm tra độc tính tế bào XTT

Thời gian h	Quy trình
00:00	Gieo vào đĩa 96 giếng: 1×10^4 tế bào/100 µl môi trường nuôi cấy MEM/giếng Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /22 h đến 26 h) ↓
24:00	Loại bỏ môi trường nuôi cấy ↓
24:00	Xử lý với nồng độ ≥ 4 của dịch chiết mẫu thử trong môi trường xử lý (100 µl) (mẫu trắng không được xử lý = môi trường xử lý) Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /24 h) ↓
48:00	Đánh giá bằng kính hiển vi về sự thay đổi hình thái học Thêm 50 µl dung dịch XTT/PMS Ủ (37 °C/5 % CO ₂ /3 h đến 5 h) ↓
51:00	Lắc đĩa Chuyển 100 µl từ mỗi giếng sang đĩa mới ↓
51:30	Phát hiện sự hấp thụ ở 450 nm (tham khảo 630 nm)

D.2.4 Ghi dữ liệu

Dữ liệu được tạo phải được ghi lại trong tệp dữ liệu thô. Các kết quả phải được trình bày dưới dạng bảng, bao gồm các nhóm thử nghiệm với mục thử nghiệm, đối chứng âm tính, mẫu trắng và đối chứng dương tính.

D.2.5 Phân tích dữ liệu

Việc giảm số lượng tế bào sống dẫn đến giảm hoạt động chung của dehydrogenase ty thể trong mẫu. Sự giảm này tương quan trực tiếp với lượng formazan màu cam được hình thành, như được theo dõi bởi mật độ quang học ở 450 nm. Để tính mức giảm khả năng sống so với mẫu trắng, sử dụng Công thức (D.1):

$$\text{Viab.}\% = \frac{100 \times OD_{450e}}{OD_{450b}} \quad (\text{D.1})$$

trong đó:

OD_{450e} là giá trị trung bình của mật độ quang đo được của dịch chiết 100 % của mẫu thử;

OD_{450b} là giá trị trung bình của mật độ quang đo được của các mẫu trắng.

Giá trị Viab.% càng thấp thì khả năng gây độc tính tế bào của vật phẩm thử nghiệm càng cao.

Nếu khả năng sống giảm xuống < 70 % mẫu trắng, có khả năng gây độc tính tế bào. Dịch chiết 50 % của mẫu thử ít nhất phải có cùng khả năng hoặc cao hơn khả năng dịch chiết 100 %; nếu không nên thử nghiệm lặp lại.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Guidance Document on Using *In Vitro* Data to Estimate *In Vivo* Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500 available under (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf).
- [2] Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa, **36**, 2003
- [3] BORENFREUND, E. and PUERNER, J.A. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicological Letters*, **24**, pp. 119-124, 1985
- [4] United States Pharmacopeia
- [5] COECKE, S., BALLS, M., BOWE, G., DAVIS, J., CSTRANTHALER, G., HARTUNG, T., HAY, R., MERTEN, O., PRICE, A., SCHECTMAN, L., STACEY, G. and STOKES, W. Guidance on Good Cell Culture Practice, *A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*, ATLA, **33**, pp. 261-287, 2005
- [6] ISAMA, K., MATSUOKA, A., HAISHIMA, Y. and TSUCHIYA, T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.*, **43**, pp. 3155-3159, 2002
- [7] TSUCHIYA, T. Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomaterials Applications*, **5**, pp. 139-157, 1994
- [8] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods*, **65**, pp. 55-63, 1983
- [9] SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T.H., CURRENS, M.J., SENIFF, D. and BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, **48**, pp. 4827-4833, 1988
- [10] SPIELMANN, H, et al., *Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany*, *Toxicol. In Vitro*, **5**, pp. 539-542, 1991
- [11] HEXIG, B., NAKAOKA, R. and TSUCHIYA, T. Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity testing. *J. Artif. Organs*, **11**, pp. 204-211, 2008