

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์

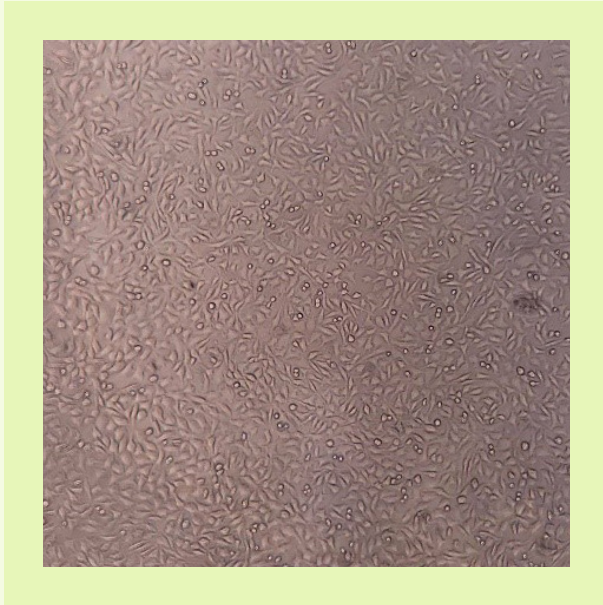
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

35 หมู่ที่ 3 เทคโนธานี ตำบลคลองห้า อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ปัจจุบันการผลิตวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์เป็นอุตสาหกรรมการผลิตที่มีการเติบโตอย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศของเรา อีกทั้งเป็นการลดการนำเข้าวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มีต้นทุนราคาสูง มีหลากหลายงานวิจัยที่นักวิจัยและผู้ประกอบการมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ ซึ่งเมื่อมีการวิจัยและพัฒนาการผลิตให้ได้วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์แล้ว ในการนำผลผลิตจากงานวิจัยออกสู่ท้องตลาดต้องผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาของประเทศเช่นกัน ซึ่งในการยื่นขอการรับรองต้องมีข้อมูลผลการทดสอบความปลอดภัยประกอบในการยื่นขอการรับรอง เช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น

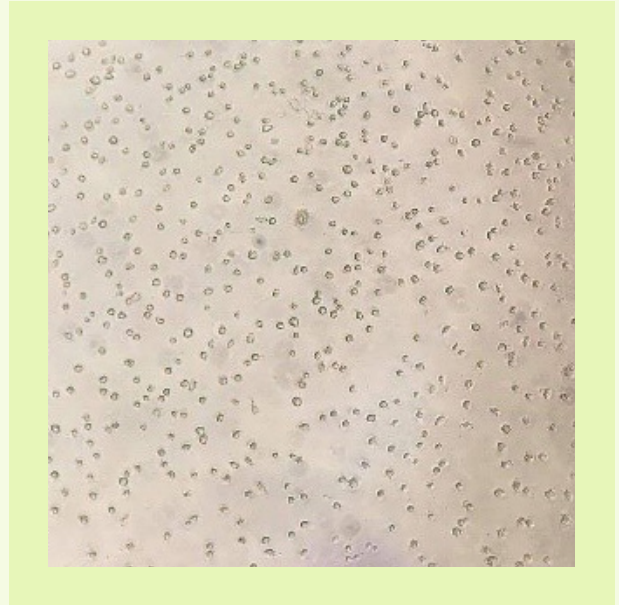
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นอีกหนึ่งการทดสอบที่มีการใช้ประกอบการยื่นขอการรับรองผลิตภัณฑ์วัสดุทางการแพทย์ ซึ่งเซลล์ที่ใช้ทดสอบนั้นเปรียบเสมือนเป็นตัวแทนของร่างกาย คือ เซลล์ L929 ทำการทดสอบตามมาตรฐานวิธีทดสอบ ISO 10993-5 ซึ่งเป็นการให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดหรือสารละลายตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินความเป็นพิษของสารสกัดหรือสารละลายต่อเซลล์ และทำการประเมินผลเชิงคุณภาพ โดยศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับตัวอย่างทดสอบ โดยตรวจลักษณะของเซลล์เปรียบเทียบกับลักษณะของกลุ่มควบคุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ และให้คะแนนตามเกณฑ์

การประเมินของ ISO 10993-5 ซึ่งโดยปกติเซลล์ L929 จะมีลักษณะเป็นกระสวย ดังแสดงในรูปที่ 1 และหากเซลล์มีความผิดปกติหรือตายจะทำให้เซลล์มีลักษณะกลม ดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นทำการประเมินผลเชิงปริมาณ โดยวัดความเข้มของสารที่มีสีจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสาร 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide หรือ สาร MTT ซึ่งเอนไซม์ในของเซลล์ที่มีชีวิตจะทำให้เกิดผลึกสีม่วงและในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่เกิดผลึกสีม่วง จากนั้นนำสารเคมี Isopropanol ละลายผลึกสีม่วงนั้น แล้วจึงวัดค่าความเข้มของสีแปรผันตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต แล้วจึงคำนวณและเปรียบเทียบค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม



ที่มา: ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์ ถ่ายภาพ (15 ก.ค. 2563)

รูปที่ 1. ลักษณะของเซลล์ L929 ที่มีชีวิต



รูปที่ 2. ลักษณะของเซลล์ L929 ที่ตาย

อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเพียงการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นเท่านั้น เพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยของวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ต้องมีการทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ทดลองที่ขึ้นต่อไป เพื่อประกอบการยื่นการขอรับรองจากคณะกรรมการของประเทศ 🌀

เอกสารอ้างอิง

ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์. (ถ่ายภาพ). 2565. ลักษณะของเซลล์ L929 ที่มีชีวิต. (ถ่ายเมื่อ 15 กรกฎาคม 2565). ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์. (ถ่ายภาพ). 2565. ลักษณะของเซลล์ L929 ที่ตาย. (ถ่ายเมื่อ 15 กรกฎาคม 2565). ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

International Organization for Standardization. 2009. *ISO 10993-5: 2009 Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: International Organization for Standardization.

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ : เซลล์และเนื้อเยื่อ

ภัทรวิทย์ เก่งกว่าสิงห์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

35 หมู่ที่ 3 เทคโนธานี ตำบลคลองห้า อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

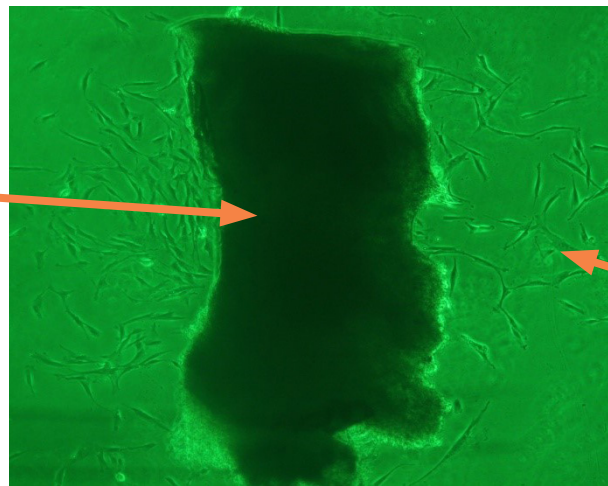
ในปัจจุบันมีงานวิจัยและพัฒนาเทคนิคการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางทั้งการทดสอบด้านความเป็นพิษ (Toxicology) การทดสอบด้านเภสัชวิทยา (Pharmacology) การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับระบบพันธุกรรม รวมไปถึงการทดสอบเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาทางด้านการประเมินความปลอดภัยและด้านประสิทธิภาพของตัวอย่างทดสอบประเภทต่างๆ อีกทั้งยังสามารถใช้ในงานวิจัยเพื่อการวินิจฉัยโรคเพื่อหาสาเหตุรวมไปถึงวิธีการป้องกันได้

การทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมีขั้นตอนสำคัญ คือ การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงมี 3 ลักษณะ คือ 1. การเตรียมเซลล์โดยการแยกจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ 2. การเตรียมเซลล์จากเซลล์ปฐมภูมิหรือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ได้จากการแยกเซลล์จากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของมนุษย์หรือสัตว์ 3. การเตรียมเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการแยกเซลล์จากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของมนุษย์หรือสัตว์ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งมีความซับซ้อนในด้านการเตรียมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และสารอาหารให้เหมาะสม ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของผู้ให้เซลล์เหล่านั้น ซึ่งชิ้นส่วนหรืออวัยวะที่นำมาใช้ส่วน

ใหญ่เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ ตัวอย่างเช่น การแยกเซลล์ผิวหนังหรือดวงตา เป็นที่นิยมมากในการทดสอบความเป็นพิษและการทดสอบประสิทธิภาพ การแยกเนื้อเยื่อ เช่น ตับ ปอด ไต หรือสมอง ต้องมีตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีขนาดบางที่สุด ในการแยกเซลล์ผิวหนัง สมอง และตับ เมื่อแยกได้เซลล์เดี่ยวแล้วเซลล์สามารถรวมกลุ่มกันเป็นสามมิติ และสามารถกลับเป็นเนื้อเยื่อเหมือนอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเหล่านั้น รวมถึงหน้าที่และคุณสมบัติยังเหมือนเดิมอีกด้วย นอกจากนี้เซลล์ที่ได้จากเลือดหรือของเหลวภายในร่างกาย โดยส่วนใหญ่จะเป็นแหล่งกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาได้หลากหลายการทดสอบ

ชั้นเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์



เซลล์สร้างเส้นใย

ที่มา: ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์ ถ่ายภาพ (2565)

รูปที่ 1. เซลล์สร้างเส้นใย ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์

การเตรียมเซลล์จากเซลล์ปฐมภูมิและเซลล์เพาะเลี้ยง ได้จากการแยกเซลล์จากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของมนุษย์หรือสัตว์ ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากสัตว์หรือมนุษย์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามเซลล์เพาะเลี้ยงในกลุ่มนี้มีช่วงชีวิตและการแบ่งตัวอย่างที่จำกัด อีกทั้งยังต้องการอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะ รวมไปถึงซีรัมหรือองค์ประกอบอื่น แม้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดไม่มีซีรัมจะสามารถใช้ในการเลี้ยงเซลล์ได้ แต่ว่าเซลล์ในกลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้ไม่เท่าที่ควร เซลล์ในกลุ่มนี้ที่เป็นเซลล์แขวนลอยสามารถเลี้ยงในภาชนะแก้วหรือพลาสติกได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการเลี้ยงแบบร่วมกัน (co-culture) และการเลี้ยงให้เป็นเซลล์ 3 มิติ ยังคงเป็นเทคนิคที่มีการศึกษาอย่างมากในปัจจุบันสำหรับการเพิ่มจำนวนและหน้าที่การทำงาน

เซลล์ไลน์เป็นเซลล์ชนิดที่มีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ สามารถขยายได้หลายรุ่น สามารถแบ่งย่อยได้เป็นเซลล์ไลน์แบบแบ่งเซลล์ได้จำกัด เซลล์ไลน์แบบแบ่งเซลล์ได้ต่อเนื่อง และเซลล์ไลน์ที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งเซลล์ไลน์แบบแบ่งเซลล์ได้

จำกัด สามารถขยายจำนวนเซลล์ได้หลายครั้งแต่ขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์นั้นด้วย ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ซึ่งอาจมีการแสดงถึงเซลล์ที่มีการแบ่งตัวช้ากว่ารุ่นก่อนหน้า ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือเซลล์สร้างเส้นใย สามารถแบ่งตัวได้ 60-70 รุ่น ในส่วนเซลล์ไลน์ที่มีการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง มีความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างคงที่ ไม่มีการแสดงถึงการแบ่งตัวช้า สามารถขยายได้หลายรุ่น ซึ่งสามารถเก็บสำรองเซลล์ไว้ใช้ได้ และเซลล์ไลน์ที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดมาจากตัวอ่อนหรือเซลล์สืบพันธุ์ อยู่ในกลุ่มที่มีการแบ่งเซลล์ได้ต่อเนื่องซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเซลล์

ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดให้เหมาะสม เพื่อนำเซลล์มาใช้ในการวิจัยทดสอบในด้านต่างๆ มีความสำคัญยิ่ง ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ รวมไปถึงการวางแผนการทดสอบอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์. (ถ่ายภาพ). 2565. เซลล์สร้างเส้นใยได้จากการแยกเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์. (ถ่ายเมื่อ 15 กรกฎาคม 2565). ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

Coecke, S., et al., 2005. Guidance on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, **33**, pp. 261-287.

International Organization for Standardization. 2009. *ISO 10993-5: 2009 Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: International Organization for Standardization.