

การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ตัวอย่างสาร: IM-9

รายละเอียดของตัวอย่าง: ผง

วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 25 กุมภาพันธ์ 2568

วิธีทดสอบ: MTT

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay

1.1 ทำการเลี้ยงเซลล์ A549 ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 5×10^3 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

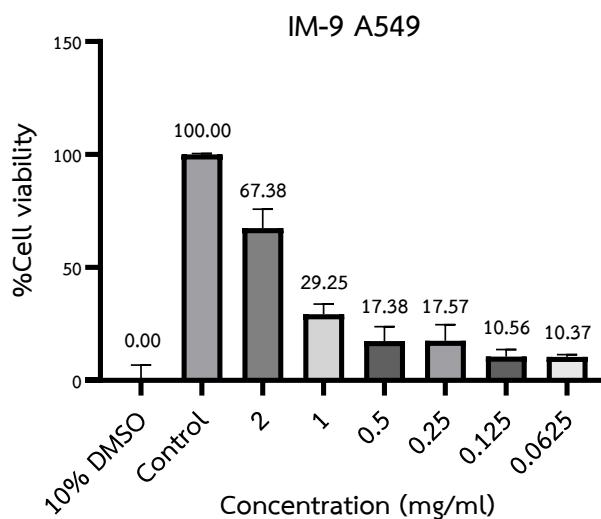
1.2 เติมน้ำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 µg/mL จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 ทำการเติมสารละลาย 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เปลี่ยน MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน (Formazan)

1.4 เมื่อครบกำหนดเวลาทำการละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย DMSO และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570/630 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของผลึกฟอร์มาซานซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 1)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/mL และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ 67.38% และความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ 29.25% - 10% ดัง(รูปที่ 1)



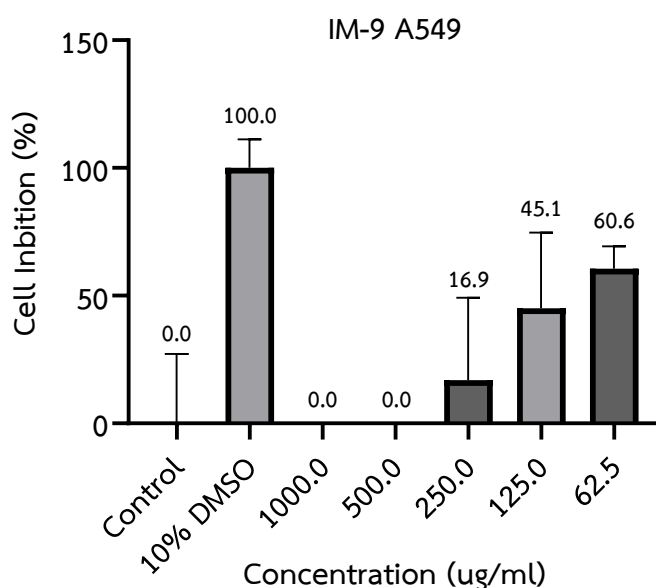
รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารทดสอบที่มีความเข้มข้นสูงพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าการใช้สารทดสอบที่มีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานจึงต้องการการทดลองเพิ่มเติม

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 2)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 1,000, 500, 250, 125 และ 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 1,000 - 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีอัตราการยับยั้งเซลล์ 0% - 45% และที่ความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีอัตราการยับยั้งเซลล์ 60.6% (รูปที่ 2)



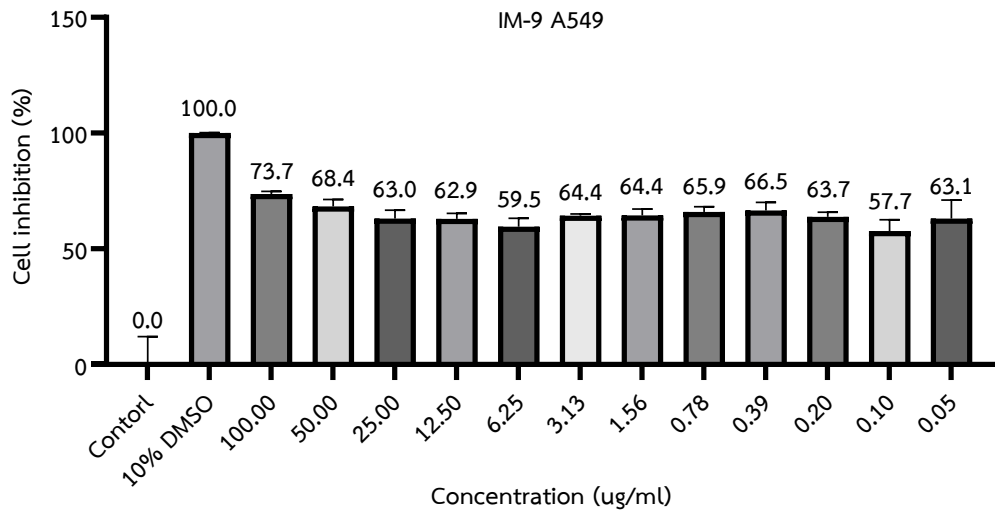
รูปที่ 2 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองผู้วิจัยพบว่าขณะทำการทดสอบพบตะกอนของสารทดสอบ ผู้ทดสอบจึงมีความเห็นว่า การทดสอบนี้ไม่มีความน่าเชื่อถือ โดยจะทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งแต่ใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ลดลง

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 3)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 และ 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 100 - 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 50% - 80% (รูปที่ 3)



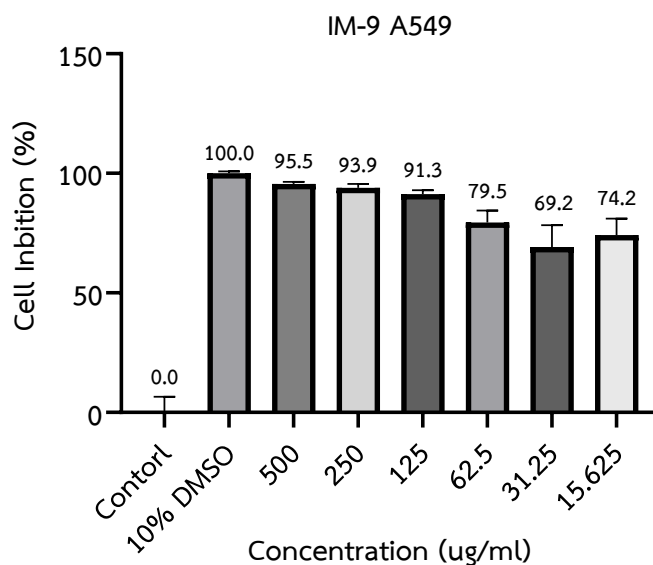
รูปที่ 3 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองผู้วิจัยพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากพื้นหลังของสารทดลอง จึงต้องมีการทดลองเพิ่มเติม

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 4)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 $\mu\text{g/mL}$ และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 100 – 0.05 $\mu\text{g/mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 50% - 80% (รูปที่ 4)



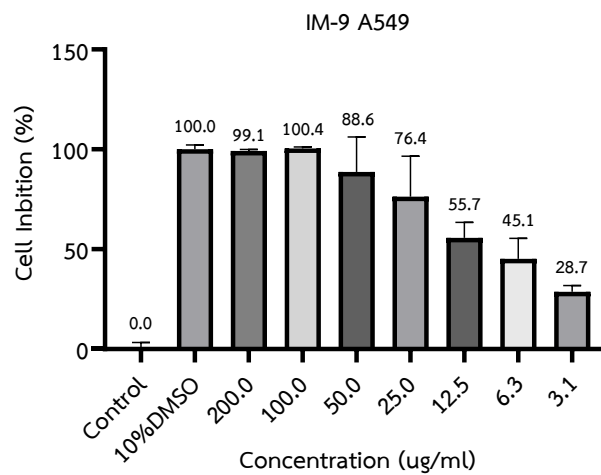
รูปที่ 4 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

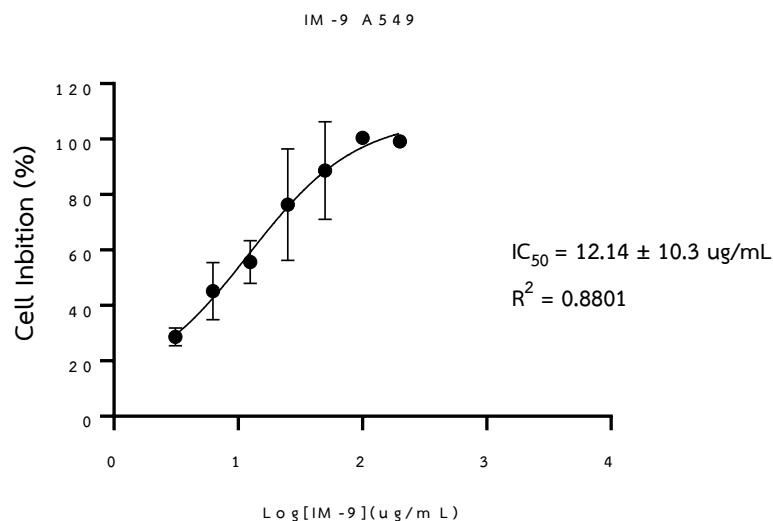
จากผลการทดลองผู้วิจัยพบว่ายังไม่พบความเข้มข้นที่สามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50% (IC_{50}) จึงต้องทำการทดลองเพิ่มเติม

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 5)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 200 – 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 100% - 80% และที่ความเข้มข้น 12.5 – 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 60% - 30% (รูปที่ 5) ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 12.14 ± 10.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดัง(รูปที่ 6)



รูปที่ 5 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50})