

การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ตัวอย่างสาร: Vitalis

รายละเอียดของตัวอย่าง: ผงหนืดสีดำ

วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 21 มีนาคม 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

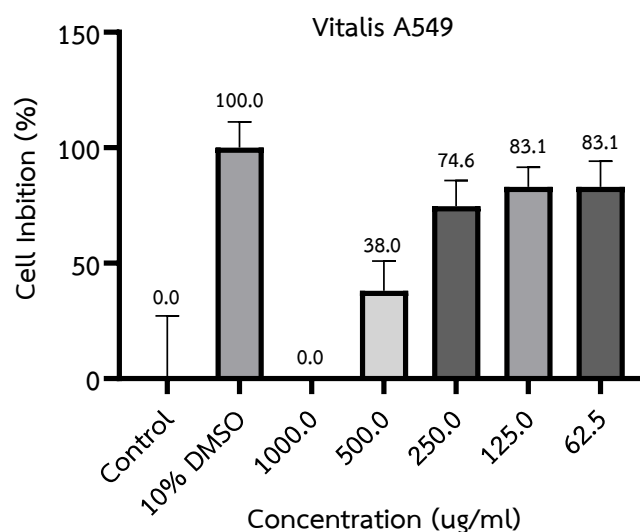
1.2 เติมน้ำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 µg/mL จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 ทำการเติมน้ำสารละลาย 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 Vitalis เริ่มต้นที่ 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 µg/mL และผลการทดสอบพบว่า Vitalis ที่ความเข้มข้น 1000 – 500 µg/mL มีอัตราการยับยั้งเซลล์ 0% - 40% และความเข้มข้น 250 – 62.5 µg/mL มีอัตราการยับยั้งเซลล์ 70% - 90% (รูปที่ 1)



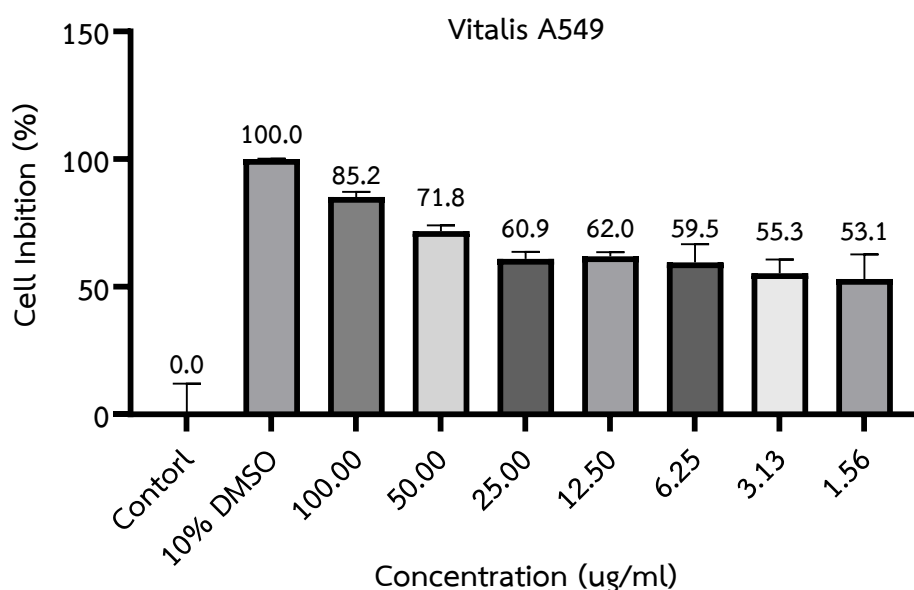
รูปที่ 1 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย Vitalis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารทดสอบที่มีความเข้มข้นสูงพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าการใช้สารทดสอบที่มีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานจึงต้องการการทดลองเพิ่มเติม

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 2)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Vitalis ด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ Vitalis เริ่มต้นที่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ 1.56 $\mu\text{g/mL}$ และผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้น 1.56 – 100 $\mu\text{g/mL}$ มีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 50% - 90% (รูปที่ 2)



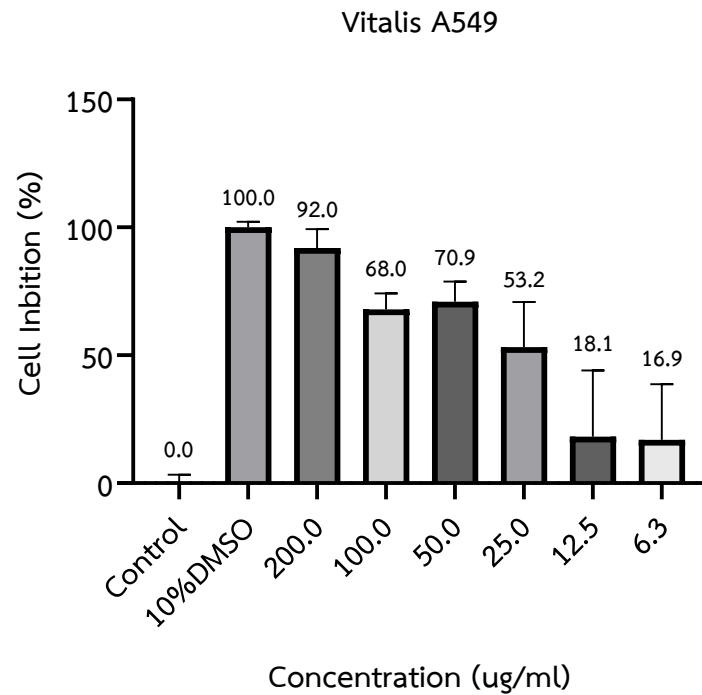
รูปที่ 2 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย Vitalis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

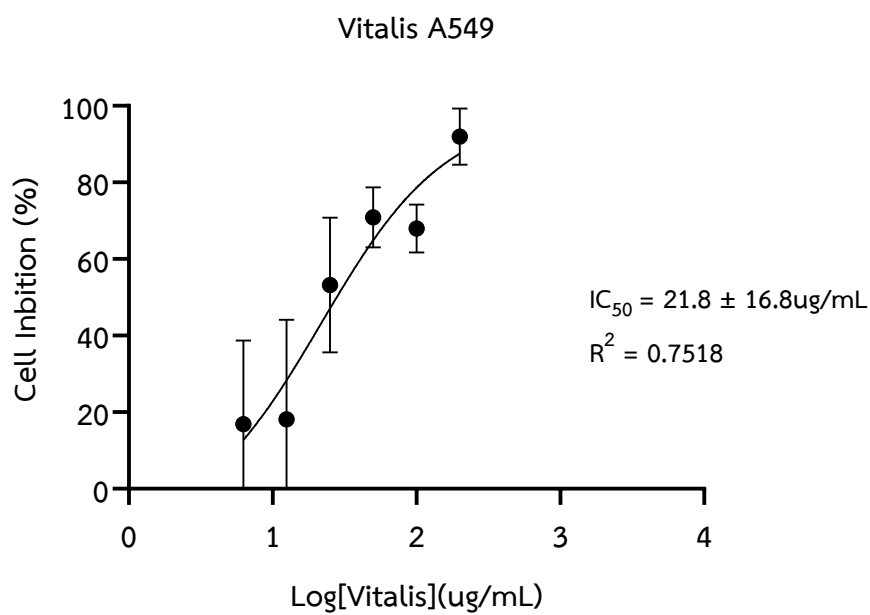
จากผลการทดลองต้องมีการทำการทดลองเพิ่มเติม เนื่องจากต้องการทราบว่าที่ความเข้มข้น 500 – 15.625 $\mu\text{g/mL}$ มีอัตราการยับยั้งสอดคล้องกันหรือไม่

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 3)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Vitalis ด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ Vitalis เริ่มต้นที่ 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้น 200 - 50 $\mu\text{g/mL}$ มีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 95% - 65% mL และที่ความเข้มข้น 25 - 6.25 $\mu\text{g/mL}$ มีอัตราการยับยั้งเซลล์มากกว่า 55% - 20% (รูปที่ 3) และมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ $21.8 \pm 16.8 \mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 แสดงอัตราการยับยั้งเซลล์ (Cell inhibition) หลังจากบ่มด้วย Vitalis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50})