การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ตัวอย่างสาร: IM-9
รายละเอียดของตัวอย่าง: ผง
วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 5 มีนาคม 2568
วิธีทดสอบ: MTT

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay

1.1 ทำการเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 1×10^4cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

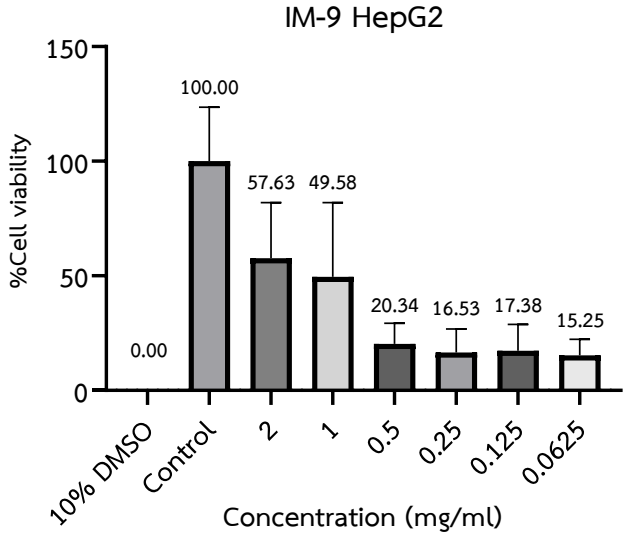
1.2 เติมอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 µg/mL จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 ทำการเติมสารละลาย 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เปลี่ยน 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 – 1 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ 60% - 40% และความเข้มข้น 0.5, - 0.0625 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ 20% - 10% ดัง(รูปที่ 1)



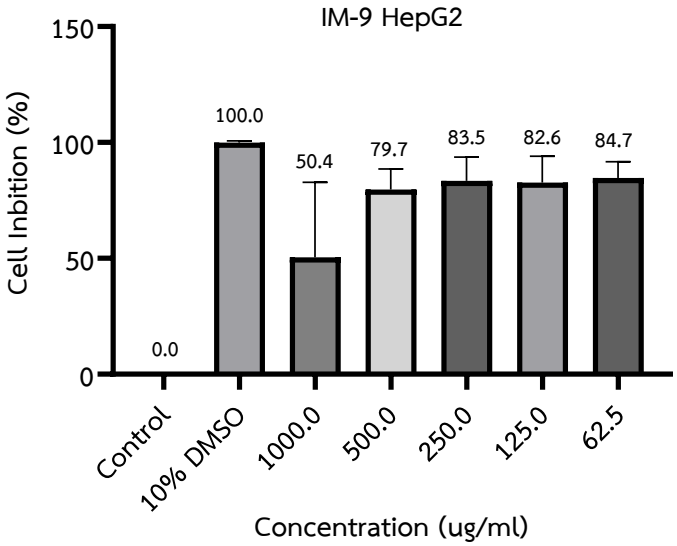
รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การใช้สารทดสอบ IM-9 ที่ความเข้มข้นสูงกลับมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าความเข้มข้นต่ำ ซึ่งขัดแย้งกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่า ความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นควรส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง โดยความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดในการดำเนินการทดลองของผู้วิจัย เช่น ขั้นตอนการเตรียมสารหรือการเติมสารลงในหลุมทดลอง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่มเติม เพื่อยืนยันผลและตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลที่ได้

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 2)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 mg/mL และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50% และความเข้มข้น 500 – 62.5 mg/mL มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 70% - 85% ดัง(รูปที่ 2)



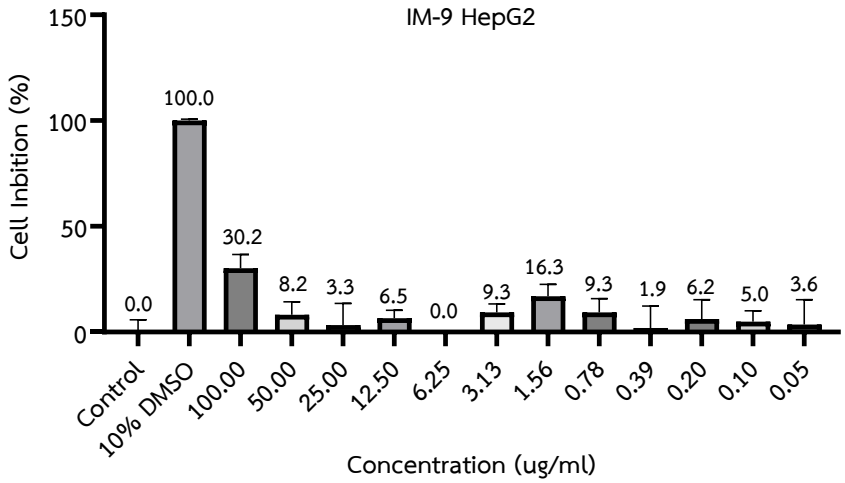
รูปที่ 2 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองผู้วิจัยพบว่าขณะทำการทดสอบพบตะกอนของสารทดสอบ ผู้ทดสอบจึงมีความเห็นว่าการทดสอบนี้ไม่มีความน่าเชื่อถือ 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 µg/mL และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 100 – 0.05 µg/mL มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 0% - 30% ดัง(รูปที่ 3)



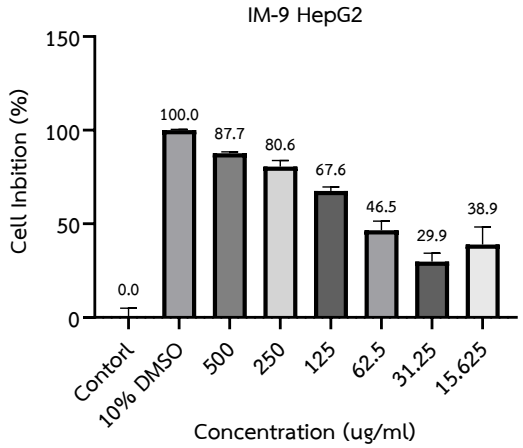
รูปที่ 3 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell inhibition) ภายหลังจากบ่มด้วย IM-9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

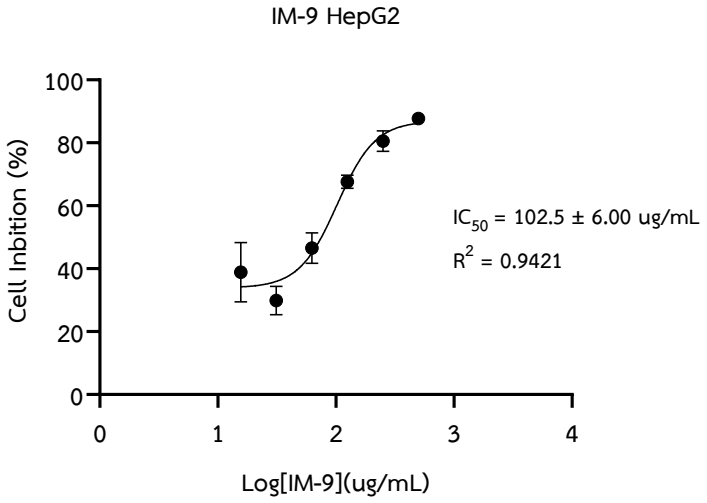
จากผลการทดลองพบว่ายังไม่มีความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% จึงต้องทำการทดลองเพิ่มเติม

ผลการทดสอบ (ครั้งที่ 4)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay โดยความเข้มข้นของสารทดสอบ IM-9 เริ่มต้นที่ 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 µg/mL และผลการทดสอบพบว่า IM-9 ที่ความเข้มข้น 500 – 125 µg/mL มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 60% – 90% และความเข้มข้น 62.5 – 15.625 µg/mL มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50% – 30% ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 102.5 ± 6.00 µg/mL ดัง(รูปที่ 4)



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



รูปที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) ของ IM-9