

รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารตัวอย่างต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7)

ตัวอย่างสาร: Bova

รายละเอียดของตัวอย่าง: -

วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 29 กรกฎาคม 2568

วิธีทดสอบ: MTT และ Griess test

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay

1.1 ทำการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 1×10^5 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 เติมน้ำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 63, 32, 16 และ 8 µg/mL จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 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 ไปเป็นฟลิคฟอร์มาซาน (Formazan)

1.4 เมื่อครบกำหนดเวลาทำการละลายฟลิคฟอร์มาซานด้วย DMSO และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570/630 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของฟลิคฟอร์มาซาน ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต

2. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ของสารทดสอบด้วยวิธี Griess test

2.1 ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 1×10^5 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วทำการล้างเซลล์ในหลุมด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นทำการบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นมีความปลอดภัยต่อเซลล์มากกว่า 80% และทำการเจือจางลง 2 เท่า แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS (Lipopolysaccharide) ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL

2.3 ทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาปริมาตร 25 µL แล้วเติม Sulfanilamide reagent ปริมาตร 25 µL แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายทำหน้าที่เปลี่ยนไนไตรท์เป็นกรดไนตริก

2.5 เติม NED reagent ปริมาตร 25 μL แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายทำหน้าที่ยับกับกรดไนตริกแล้วเกิดเป็นสารประกอบเอโซ (Azo) ที่มีสีชมพูอมม่วง

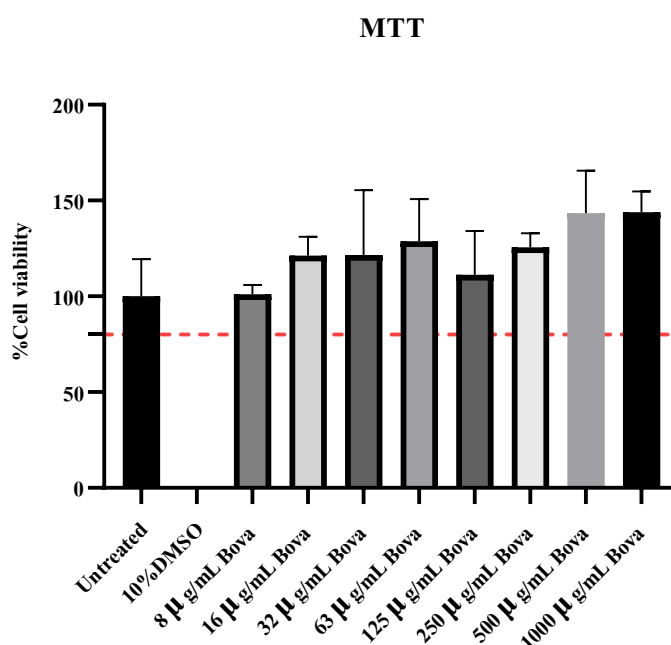
2.6 ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยความเข้มข้นของสีชมพูอมม่วงที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณของไนไตรท์ในตัวอย่างทดสอบ

2.7 แทนค่าที่ได้เทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานของสารไนไตรท์ (Nitrite) เพื่อหาปริมาณการหลังไนไตรท์จากเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารทดสอบ

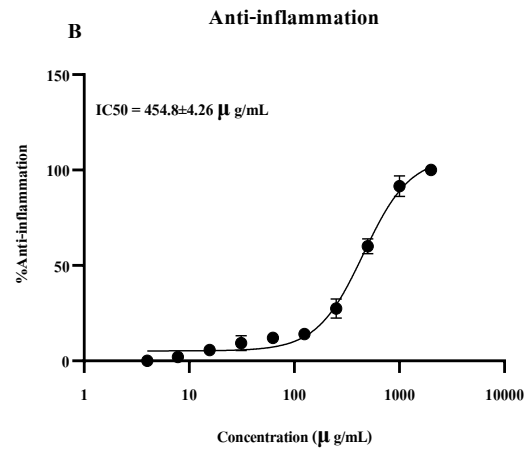
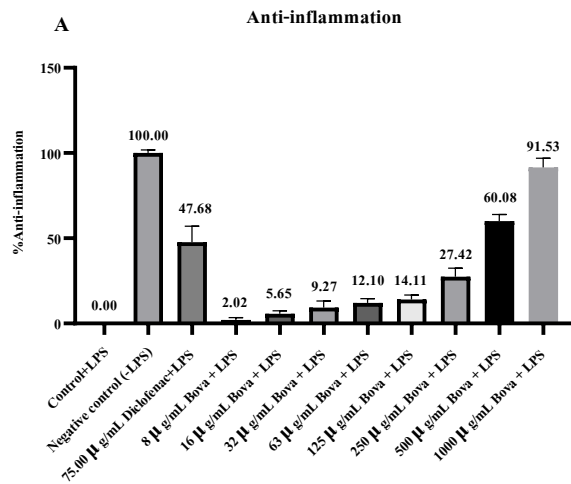
ผลการทดสอบ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay เป็นขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับการคัดกรองความเข้มข้นของสารทดสอบที่ไม่ส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ โดยความเข้มข้นของ Bova เริ่มต้นที่ 1000, 500, 250, 125, 63, 32, 16 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ และผลการทดสอบพบว่า Bova ที่ความเข้มข้น 8 – 1000.00 $\mu\text{g/mL}$ มีความปลอดภัยต่อเซลล์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% (รูปที่ 1) ดังนั้นความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบเหล่านี้จึงนำไปประเมินความสามารถในการต้านการอักเสบต่อไป

การประเมินความสามารถในการต้านการอักเสบของ Bova โดยความเข้มข้นของสารทดสอบเริ่มต้นที่ 1000 $\mu\text{g/mL}$ และเจือจางลง 2 เท่าและผลการทดสอบพบว่า Bova สามารถลดการหลังไนไตรท์ (Nitrite) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารทดสอบ Bova ที่ความเข้มข้น 8 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 2.02 - 91.53% และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 50% (IC_{50}) ก็คือ $454.8 \pm 4.26 \mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ภายหลังจากบ่มด้วย Bova เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 แสดงกิจกรรมด้านการอักเสบของเซลล์ (Anti-inflammation) ภายหลังจากผ่านการบ่มด้วย Bova เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และแสดงความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 50%; IC₅₀ (B)

สรุปผลการทดสอบ

สารทดสอบ Bova มีความสามารถในการต้านอักเสบ