

## บทที่ 5

### การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ของโครงยัดเกาะ AW-GC

#### ที่เติมสารเจือ Zn และ Ag

##### 5.1 บทนำ

จากผลการทดลองในบทที่ 3-4 โครงยัดเกาะ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn และ Ag สามารถเตรียมได้โดยกระบวนการ Sol-gel ในบทนี้จะเป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay โดยเลือกเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งมาทดสอบความเป็นพิษในงานวิจัยนี้ เนื่องจากเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้เร็ว และใช้เวลาในการศึกษาสั้น นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดด้วยเรื่องงบประมาณและระยะเวลาในการทดสอบ อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยเซลล์มะเร็งยังสามารถใช้ทดสอบผลของการกำจัดหรือการทำลายเซลล์มะเร็งสำหรับตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย Ag ได้อีกด้วย ในการทดสอบความเป็นพิษนี้มีตัวอย่างที่ทดสอบ 7 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบทางเคมีของโครงยัดเกาะเซลล์ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn และ Ag

Compound	SiO <sub>2</sub> (%wt)	CaO (%wt)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%wt)	MgO (%wt)	CaF <sub>2</sub> (%wt)	ZnO (%wt)	Ag <sub>2</sub> O (%wt)
Undope	34.2%	44.9%	16.3%	4.6%	0.5%	-	-
1Zn	34.06%	43.82%	16.23%	4.58%	0.49%	1.30%	-
5Zn	33.52%	39.60%	15.98%	4.51%	0.49%	6.40%	-
1Ag	33.83%	43.53%	16.13%	4.55%	0.49%	-	1.97%
1Zn5Ag	33.17%	38.31%	15.81%	4.46%	0.48%	6.34%	1.93%
5Zn1Ag	32.32%	37.33%	15.40%	4.35%	0.47%	1.23%	9.39%
5Zn5Ag	31.83%	33.41%	15.17%	4.28%	0.47%	6.08%	9.25%

เมื่อ Undope คือ AW-GC ที่ปราศจากสารเจือ

1 Zn คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn ปริมาณ 1 mol%

5 Zn คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn ปริมาณ 5 mol%

1 Ag คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Ag ปริมาณ 1 mol%

1Zn5Ag คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn ปริมาณ 1 mol% และ Ag ปริมาณ 5 mol%

5Zn1Ag คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn ปริมาณ 5 mol% และ Ag 1 mol%

5Zn5Ag คือ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn ปริมาณ 5 mol% และ Ag 5 mol%

## 5.2 วิธีดำเนินการทดสอบ MTT assay [Nezafati N. et al, 2013]

### สารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco modified Eagle medium<sup>9</sup> (DMEM; Gibco-BRL, life Technologies, Grand Island, NY)
2. Fetal bovine serum (FBS)
3. Penicillin-streptomycin
4. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay
5. Dimethylsulfoxide (DMSO)
6. Phosphate buffered saline (PBS)

HepG2 cell culture ได้นำมาเลี้ยงใน 6-well plate ด้วยสาร medium ที่ประกอบด้วย 98% Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 10% Fetal Bovine Serum (FSB), 1% Penicillin streptomycin และ 1% L-glutamine การเลี้ยงเซลล์จะทำในตู้บ่มที่มี 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37 °C สาร medium นี้จะเปลี่ยนทุกๆ 48-72 ชั่วโมง

### ขั้นตอน HepG2 cell passage

1. หลังจากเลี้ยงเซลล์ใน 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37°C แล้วถ่าย Medium ออกและล้าง monolayer ด้วย 750µl 1x Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ pH 7.4

2. ถ่าย PBS ออกแล้วเติม 750  $\mu\text{l}$  ของ 0.25% trypsin EDTA solution และเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อกำจัดเซลล์ออกจากผิว
3. หลังจากนั้นเติม 750 $\mu\text{l}$  ของ Complete medium เพื่อ inactivated trypsin นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอด centrifuge
4. นำส่วนผสมไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. หลังจากเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายออก เติม complete medium อีกครั้ง และทำให้เซลล์กระจายตัวโดยการใช้ปิเปตดูดเข้าออก
6. เติมเซลล์ลงใน well และเลี้ยงต่อไป ใน 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์วิเคราะห์ด้วย MTT (3-{4,5-dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay เป็นเวลา 3 วัน**

1. เตรียมสารละลาย MTT solution 0.5 mg/ml ด้วยผง MTT ใน PBS ที่อุณหภูมิ 37°C
2. เตรียมตัวอย่างโดยการนำมาบดเป็นผงละเอียดและร่อนผ่าน 325 เมช
3. นำตัวอย่างมาผ่านการฆ่าเชื้อโรคใน Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
4. นำตัวอย่างใส่ใน medium โดยใช้สัดส่วนผงตัวอย่างต่อ medium เท่ากับ 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 mg/ml และเก็บที่ 37°C ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> และ 95% air เป็นเวลา 3 วัน
5. หลังจากครบ 3 วัน นำออกจาก incubation และนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตัวอย่างออกจากสารที่สกัดได้ ดังรูปที่ 6.1
6. เติมเซลล์ 1 x 10<sup>4</sup> cells/well และเลี้ยงใน 96- well และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ครบ 24 ชั่วโมง ดูด medium ออกและเติมสารสกัดปริมาณ 100  $\mu\text{l}$  แทน จากนั้นเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub>
8. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่าย medium ออกแล้วเติม 100  $\mu\text{l}$  0.5 mg/ml MTT solution และเลี้ยงต่อไปอีก 4 ชั่วโมงที่ 37°C
9. เมื่อครบ 4 ชม. เปลี่ยนถ่าย medium MTT solution และแทนที่ด้วย 100  $\mu\text{l}$  of DMSO ที่ทิ้งไว้ 5 นาที ดังรูปที่ 6.2

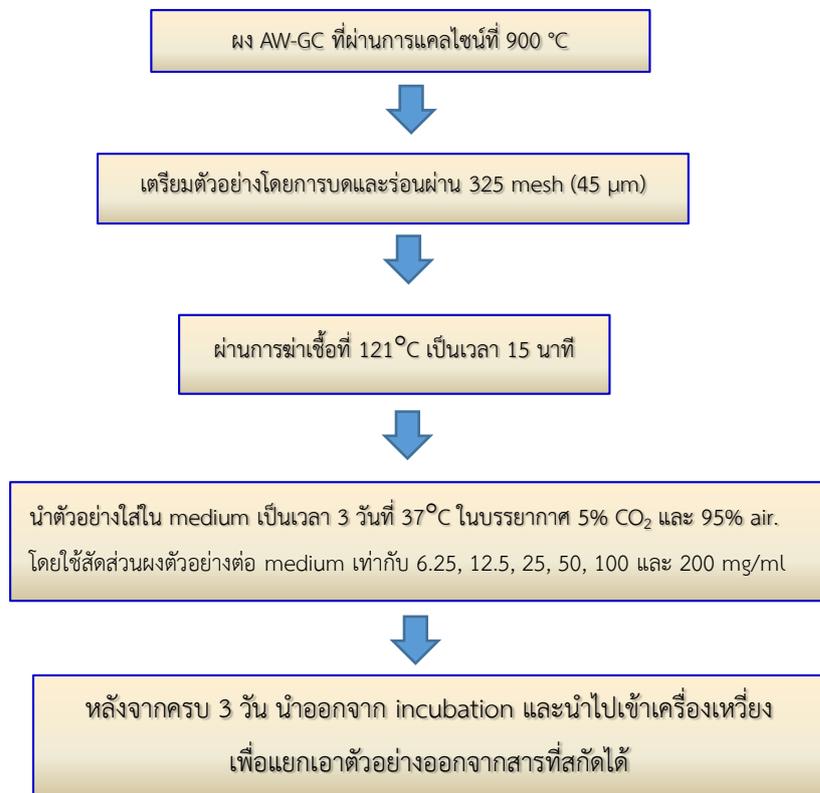
10. นำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 590 nm ด้วย microplate reader รุ่น Benchmark plus ยี่ห้อ Bio Rad
11. คำนวณหา The percentage of viable cells ดังสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ Cell Inhibition} = \frac{\text{O.D.value (Control cell)} - \text{O.D.value (treated cells)}}{\text{O.D.value (Control cell)}} \times 100 \quad (1)$$

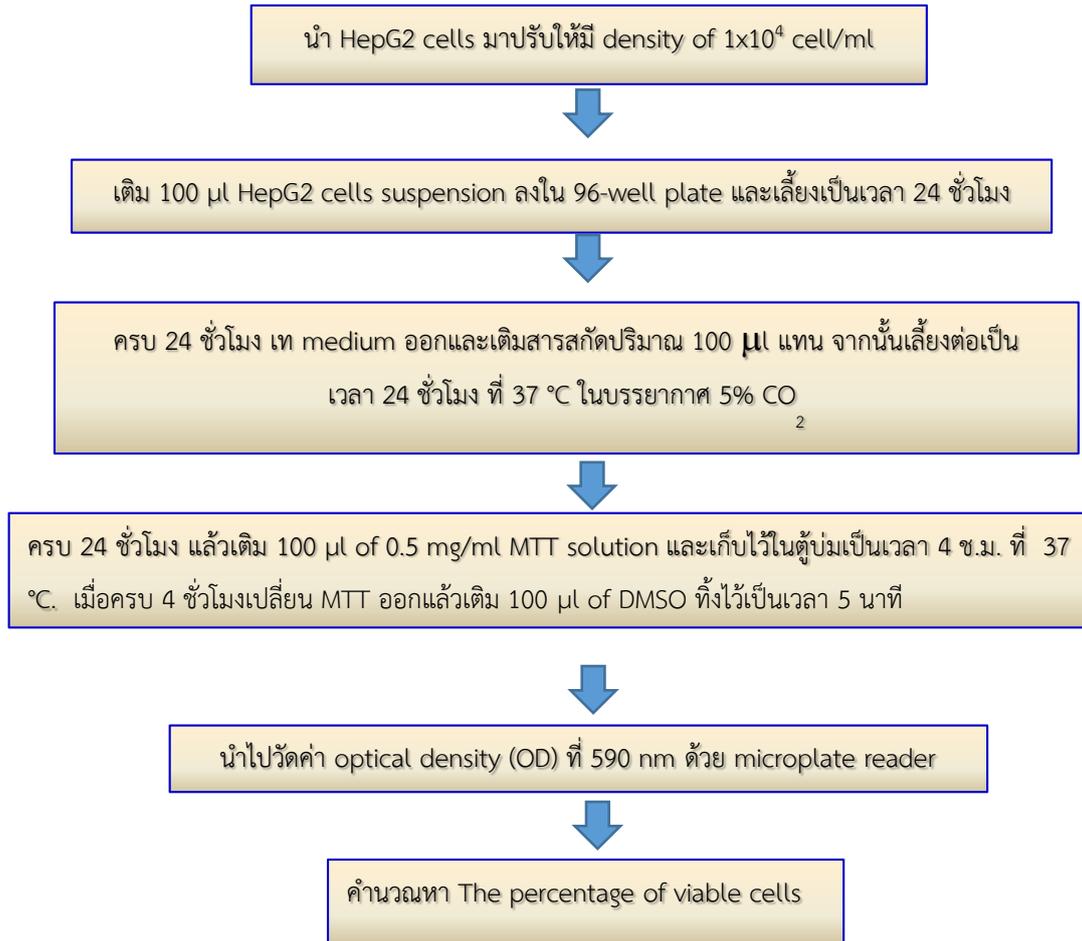
$$\% \text{ Cell viability} = 100 - \% \text{ Cell Inhibition} \quad (2)$$

เมื่อ O.D. Value (Control cell) คือ ค่า optical density ของ เซลล์ control

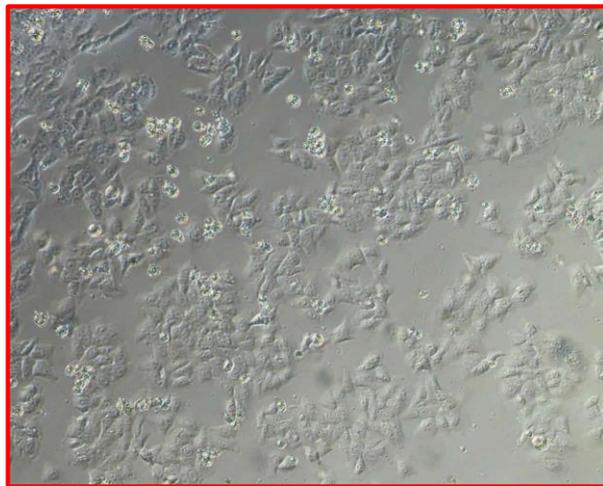
O.D. value (treated cells) คือ ค่า optical density ของเซลล์ที่มีตัวอย่าง



รูปที่ 5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ MTT Assay



รูป 5.2 การทดสอบ MTT assay



รูป 5.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ HepG2 cell

### 5.3 ผลการทดสอบ

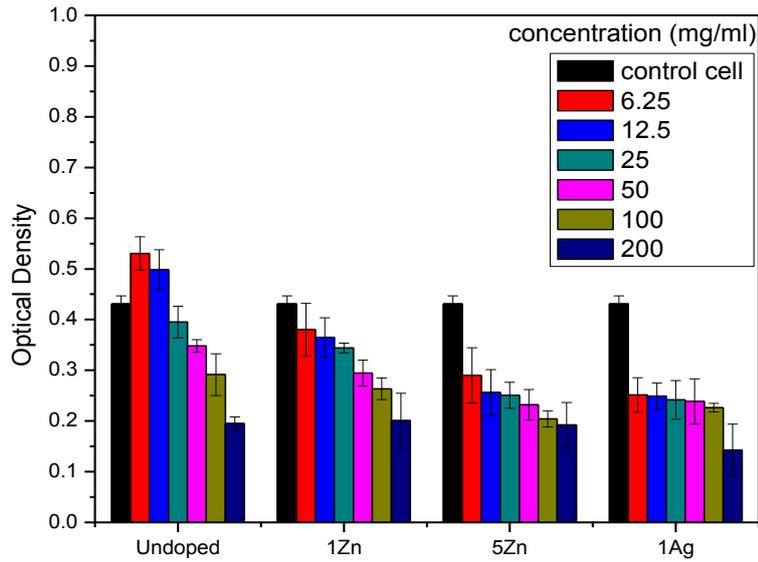
ผลการทดสอบพบว่าเมื่อวัดค่า O.D. และคำนวณค่า cell inhibition และ Cell viability ของตัวอย่างพบว่าเมื่อความเข้มข้นของผงตัวอย่างต่อสารละลาย medium สูงขึ้น ค่าความเป็นพิษจะมีค่าสูงขึ้น ดังตาราง 5.2 แสดงค่าดัชนีสำหรับการวิเคราะห์ Cytotoxicity test โดยดูจากค่า Confluency ซึ่งเป็นค่าที่บอก % cell viability และจากค่า % cell viability สามารถเทียบเป็นค่าทดสอบความเป็นพิษได้ดังตารางที่ 5.3

ตาราง 5.2 มาตรฐานผลการทดสอบ cytotoxicity [Gomes M.E. et al, 2001]

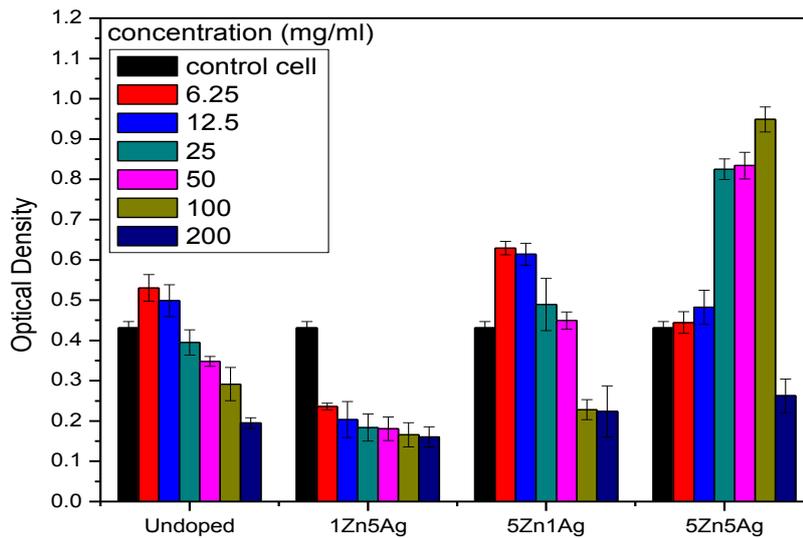
Quantitative and qualitative scores used in the cytotoxicity tests.				
Score	Confluency	Floating cells	Change of cellular morphology	Inhibition of cell growth
0	100%	0%	No changes during test period	0-10%
1	90-100%	0-5%	Slight changes, few cells affected	10-30%
2	60-90%	5-10%	Mild changes, some cells round/spindle shaped	30-50%
3	30-60%	10-20%	Moderate changes, many cells round/spindle shaped	50-70%
4	0-30%	> 20%	Severe changes, about all cells show morphological changes	70-100%

ตาราง 5.3 ค่า Cytotoxicity index [Gomes M.E. et al, 2001]

Cytotoxicity index	Reactivity
0-1	none
1-3	slightly toxic
3-5	mildly toxic
5-7	moderately toxic
7-8	severely toxic



รูปที่ 5.4 อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) ของ AW-GC และ AW-GC ที่เจือด้วย 1Zn, 5Zn และ 1Ag โดย HepG2 cell ด้วยวิธี MTT assay



รูปที่ 5.5 อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) ของ AW-GC และ AW-GC ที่เจือด้วย 1Zn5Ag, 5Zn1Ag และ 5Zn5Ag โดย HepG2 cell ด้วยวิธี MTT assay

จากรูป 5.4 แสดงค่า O.D. ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับ Control cell พบว่าตัวอย่าง AW-GC ที่ปราศจากสารเจือมีการเกิดเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 6.25 และ 12.5 mg/ml และเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 12.5 mg/ml เริ่มแสดงความเป็นพิษ อย่างไรก็ตามค่า O.D. ของตัวอย่างที่เจือ 1 mol% Zn, 5 mol% Zn และ 1 mol% Ag แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเซลล์มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

จากรูป 5.5 แสดงค่า O.D. ของตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย 1 mol% Zn 5 mol% Ag, 5 mol% Zn 1 mol% Ag และ 5 mol% Zn 5 mol% Ag เปรียบเทียบกับ control ซึ่งพบว่าตัวอย่าง AW-GC เจือด้วย 1 mol% Zn 5 mol% Ag มีการลดจำนวนของเซลล์ แต่ผลการทดลองของตัวอย่าง 5 mol% Zn 1 mol% Ag และ 5 mol% Zn 5 mol% Ag พบว่าเซลล์มีจำนวนมากขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับ AW-GC ที่ปราศจากสารเจือและตัว Control อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงถึง 200 mg/ml จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

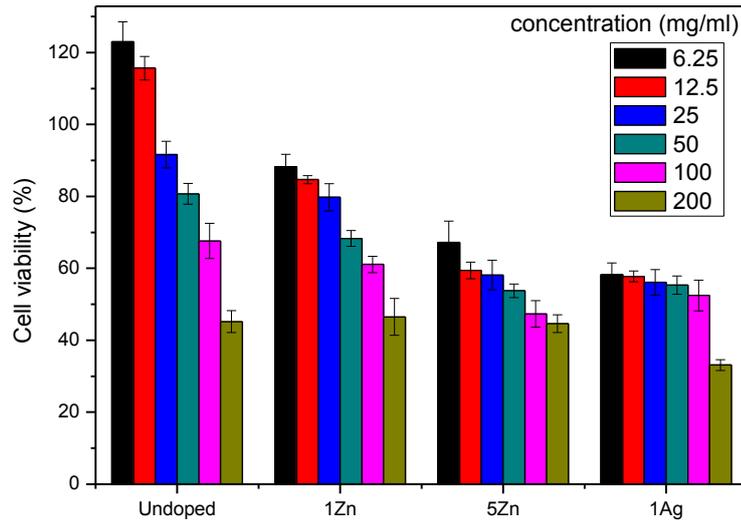
ในการทดสอบ Cytotoxicity พบว่า ตัวอย่าง AW-GC ที่ไม่เติมสารเจือ ไม่มีความเป็นพิษในระดับความเข้มข้น 6.25 และ 12.5 mg/ml และพบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Cell proliferation) แต่เมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไป จะเริ่มมีความเป็นพิษระดับ 2 และ 3 จัดได้ว่าเป็นพิษเล็กน้อยถึงปานกลาง ดังรูป 5.6

ตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย 1 mol% Zn พบว่ามีความเป็นพิษในระดับ 2 ด้วยระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 mg/ml จัดได้ว่ามีความเป็นพิษเล็กน้อย (รูป 5.6)

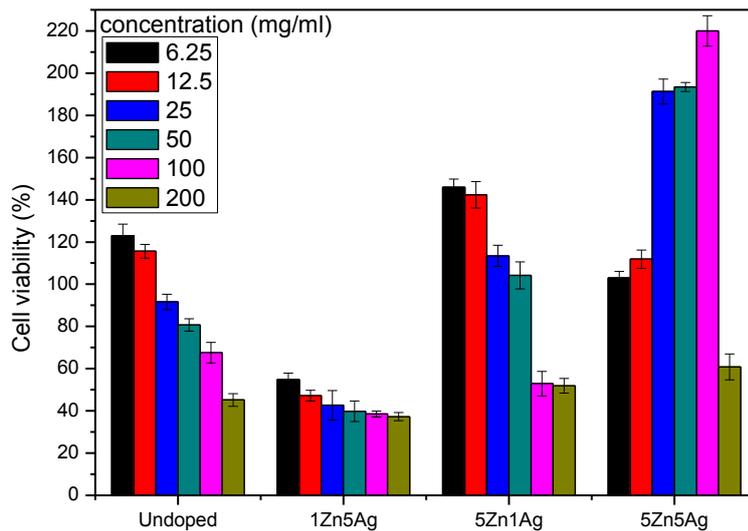
ตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย 5 mol% Zn และ 1 mol% Ag พบว่า มีความเป็นพิษในระดับ 3 จัดได้ว่ามีความเป็นพิษปานกลางในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 mg/ml ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ด้วย XRD ในบทที่ 4 พบว่ามีการเกิดเฟสของ ZnO และ Silver oxide ซึ่งอาจทำให้มีการสลายตัวของ Zn และ Ag ions ในระดับที่สูงและเป็นพิษต่อเซลล์ (รูป 5.6)

ตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย 5 mol% Zn 1 mol% Ag พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และ Cell proliferation ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50 mg/ml แต่เริ่มพบความเป็นพิษระดับ 2 ในระดับความเข้มข้นของสาร 100 และ 200 mg/ml ดังรูป 5.7

ตัวอย่าง AW-GC ที่เจือด้วย 5 mol% Zn 5 mol% Ag พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และ Cell proliferation ซึ่งเซลล์มีการเจริญและเพิ่มจำนวนมาก แต่เมื่อความเข้มข้นสูงถึง 200 mg/ml พบว่าเริ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังรูป 5.7



รูปที่ 5.6 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ของ AW-GC และ AW-GC ที่เจือด้วย 1Zn, 5Zn และ 1Ag โดย HepG2 cell ด้วยวิธี MTT assay



รูปที่ 5.7 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ของ AW-GC และ AW-GC ที่เจือด้วย 1Zn5Ag, 5Zn1Ag และ 5Zn5Ag โดย HepG2 cell ด้วยวิธี MTT assay

จากผลการทดสอบนี้สามารถบ่งบอกว่า การเจือด้วย Zn หรือ Ag ใน AW-GC ในปริมาณ 1 mol% ขึ้นไป จะพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังงานวิจัย V. Aina และคณะ ปี 2007 รายงานว่าการเติม Zn ใน 45S5

ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ MG-63 osteoblasts แต่เมื่อเติมสารเจือร่วมระหว่าง Zn และ Ag ใน AW-GC พบว่ามีเฟสที่ปรากฏคือ  $Zn_3(PO_4)_2$  หรือ Zinc phosphate ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ในการทำซีเมนต์สำหรับงานทันตกรรม และมีผลการวิจัยที่พบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และมีสมบัติด้าน bioactivity ที่ดีกว่า AW-GC ที่ปราศจากสารเจือ ดังที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 4

#### 5.4 บทสรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและทดลองเตรียม AW-GC scaffold ที่ปราศจากสารเจือ และเติมสารเจือ Zn และ Ag ในปริมาณความเข้มข้น 1 และ 5 mol% นอกจากนี้ยังเจือร่วมระหว่าง Zn และ Ag โดยวิธีการเตรียมด้วยกระบวนการโซลเจล และขึ้นรูปเป็นโครงสร้างยึดเกาะ (scaffold) ด้วยการชุบโพลีเมอร์ต้นแบบและการเทหล่อ ซึ่งในการทดลองนี้ได้พัฒนาการทดลอง 4 การทดลอง โดยหาสภาวะในการเตรียมเจลให้มีความเหมาะสมในการขึ้นรูปโดยการชุบโพลีเมอร์ จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงความหนืดและการเกิดเจลของสารโซลเจล โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเจลคือ ที่  $35^{\circ}C$  และควรชุบโพลีเมอร์โดยจุ่มแช่โพลีเมอร์ต้นแบบไว้ในเจลให้นานพอ เพื่อให้เจลเข้าติดกับโพลีเมอร์ต้นแบบอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นบีบเจลที่เหลือออก แล้วนำไปตากที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะเริ่มชุบโพลีเมอร์ซ้ำใหม่ จำนวนการชุบซ้ำมีผลต่อความแข็งแรงของชิ้นตัวอย่างหลังเผา จากผลการทดสอบสมบัติด้านชีวภาพของ AW-GC ที่เติมสารเจือ Zn และ Ag พบว่า Zn ส่งผลต่อความว่องไวทางชีวภาพได้ดีกว่า Ag นอกจากนี้การเติมสารเจือร่วมระหว่าง Zn และ Ag จะส่งผลต่อความว่องไวทางชีวภาพได้ดีที่สุดคือ 5Zn1Ag, 5Zn5Ag จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า การเติมสารเจือ Zn หรือ Ag ใน AW-GC จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาก เมื่อเปรียบเทียบกับ AW-GC ที่ปราศจากสารเจือ อย่างไรก็ตาม AW-GC ที่เจือร่วมระหว่าง Zn และ Ag ในตัวอย่าง 5Zn1Ag และ 5Zn5Ag จะไม่ส่งผลที่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่กลับทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่า AW-GC ที่ปราศจากสารเจืออีกด้วย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้ คือ การพัฒนาต่อยอดโดยการศึกษาเพิ่มเติมในการสลายตัว (Biodegradation) ของ AW-GC scaffold ที่เติมสารเจือ Zn และ Ag และการเจือร่วมระหว่าง Zn และ Ag และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อื่นๆ เช่น Osteoblast cell, เซลล์หนู หรือ Stem cells เพื่อต่อยอดในการนำไปทดสอบ in vivo ต่อไป