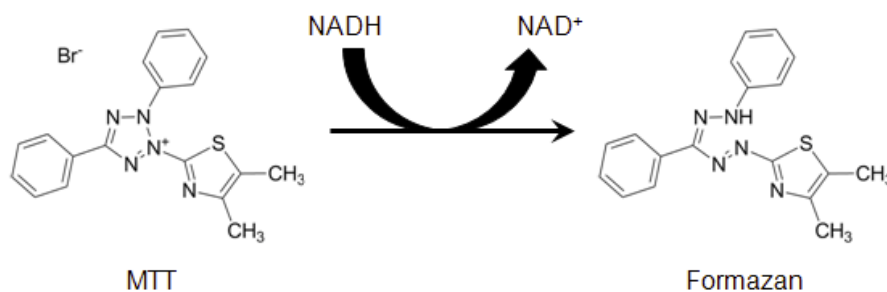


การตรวจวิเคราะห์การมีชีวิตรอดและเจริญได้ของเซลล์ (cell viability) เป็นพื้นฐานสำคัญอย่างหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ การมีชีวิตรอดและเจริญได้ของเซลล์นี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ จึงสามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์สำหรับประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังคงชีวิตและอยู่ในสภาวะที่สมบูรณ์ได้ [1-3] โดยเทคนิควิเคราะห์การมีชีวิตรอดและเจริญได้ของเซลล์แบบต่าง ๆ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจอ้างอิงจากขบวนการย่อยและเผาผลาญภายในเซลล์ (tetrazolium reduction, reazurin reduction) การทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ (protease markers, ATP detection) ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ (trypan blue, LDH, Live-Dead) และการย่อยสลายของดีเอ็นเอ (TUNEL) [1-3] ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคที่อ้างอิงการมีชีวิตรอดและเจริญได้ของเซลล์กับขบวนการย่อยและเผาผลาญภายในเซลล์นั้นได้รับความนิยมใช้อย่างแพร่หลาย และได้ถูกพัฒนาให้สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว (high-throughput analysis) บนภาตหลุมแบบ 96 หลุม (96-well plate) ด้วยเครื่องอ่านภาต (plate reader) [1-3]

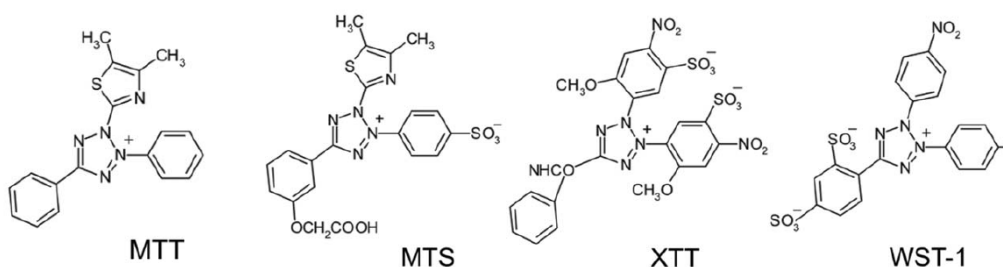
สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารหรือตัวอย่างที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์จำพวกที่ต้องยึดเกาะบนพื้นผิว (adherent cells) โดยอ้างอิงจากขบวนการย่อยและเผาผลาญภายในเซลล์เพื่อใช้คำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% viability) นั้น ปัจจุบันนิยมใช้สารจำพวกเกลือ tetrazolium ในการทดสอบ ซึ่งเกลือ tetrazolium มีจุดเด่นทางเคมี คือ หมู่ฟังก์ชัน tetrazole ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมจำนวน 4 อะตอม และถูกล้อมรอบด้วยกลุ่มวงแหวนอะโรมาติก 3 กลุ่ม เมื่อถูกรีดิวซ์ภายในไมโทคอนเดรียด้วย mitochondria dehydrogenase รวมถึงภายใน เอนโดไซม/ไลโซไซม หรือไซโทพลาซึม ด้วย pyridine coenzyme cofactor NADH วงแหวนไนโตรเจนจะถูกเปิดออกเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ formazan (ภาพที่ 1) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีดังกล่าวจะปรากฏให้เห็นด้วยสีที่เปลี่ยนไปจากเดิมสีอ่อน ๆ หรือไม่มีสีไปเป็นสีม่วงอมน้ำเงินเข้ม และความเข้มของสีม่วงอมน้ำเงินที่เกิดขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านภาต โดยความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหรือจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดนั่นเอง



ภาพที่ 1 : ปฏิกิริยารีดักชันของเกลือ tetrazolium (MTT) เกิดเป็น formazan [2]

ตัวอย่างชนิดเกลือ tetrazolium (ภาพที่ 2) มีดังนี้

1. MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
2. XTT: sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium
3. MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
4. WST-1: sodium 5-(2,4-disulphophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium inner salt



ภาพที่ 2 : ตัวอย่างเกลือ tetrazolium ชนิดต่าง ๆ [4]

ทั้งนี้ผลึก formazan ที่เกิดขึ้นจากสารตั้งต้น MTT จะละลายในสารละลายอินทรีย์แบบมีขี้ว เช่น isopropanol ในขณะที่เกลือ formazan ชนิด XTT, MTS และ WST-1 ถูกสังเคราะห์ขึ้นให้ละลายได้ในน้ำ

ในการทดสอบความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นจากเครื่องมือแพทย์ ชีววัสดุ รวมไปถึงสารสกัดจากธรรมชาติ เกลือ tetrazolium ชนิด MTT ได้รับความนิยมอย่างมากและใช้ทั่วไปอย่างแพร่หลายและมีมาตรฐานการทดสอบ ISO 10993-5:2009 (E) รับรองไว้ ในส่วนของการตรวจและรับรองคุณภาพของการทดสอบ ประกอบด้วยการใช้ตัวอย่างอ้างอิง (positive control และ negative control) และความแม่นยำของผลการทดสอบในแต่ละครั้งเพื่อที่จะสามารถนำไปรับรองผลการทดสอบและวิเคราะห์การอยู่รอดและมีชีวิตของเซลล์ได้ ในเอกสาร ISO 10993-5:2009 (E) ได้ระบุให้ใช้ ZDEC และ ZDBC ซึ่งเป็นพลาสติกจำพวกพอลิยูรีเทนที่ถูกทำให้เสถียรด้วยสาร organotin เป็นตัวอย่างอ้างอิงแบบ positive control สำหรับของแข็งและ extract ที่ได้จากการบ่มของแข็ง และสารละลายอินทรีย์จำพวกฟีนอลสำหรับ extract เพื่อให้ได้ค่าการตอบสนองที่เป็นพิษ ส่วนตัวอย่างอ้างอิงแบบ negative control จะถูกใช้เป็นการยืนยันผลการตอบสนองแบบไม่เป็นพิษ ตัวอย่างที่เคยใช้ทดสอบมาก่อนตามที่ระบุในเอกสาร ISO 10993-5:2009 (E) ได้แก่ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (high density polyethylene) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของพอลิเมอร์สังเคราะห์ และแท่งอะลูมิเนียมออกไซด์ (aluminum oxide) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุทางด้านทันตกรรม

## References

1. Stoddart, Martin S. *Mammalian Cell Viability-Methods and Protocols*. London: Human Press, 2011. (ISBN 978-1-61779-107-9)
2. Riss, Terry L. *et al.* (2013). Cell Viability Assays. In G. Sitta Sittampalam *et al.* (Eds.), *Assay Guidance Manual*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>
3. Biological evaluation of medical devices- Part5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. International Standard ISO10993-5 3<sup>rd</sup> edition.
4. Berridge, MV *et al.* Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotech Ann Rev* 2005;11:127-152.