

Chulalongkorn University

Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2022

การวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ

วรชัน เจริญไกรสร
คณะวิศวกรรมศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>



Part of the [Applied Mechanics Commons](#), and the [Engineering Mechanics Commons](#)

Recommended Citation

เจริญไกรสร, วรชัน, "การวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ" (2022). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 6525.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/6525>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดแบบ2มิติและ3มิติ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Impedance measurement of 2D and 3D cancer cells treated with a
chemotherapeutic drug



Mr. Vorratun Jadsadakraisorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Mechanical Engineering
Department of Mechanical Engineering
FACULTY OF ENGINEERING
Chulalongkorn University
Academic Year 2022
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดแบบ2มิติและ3มิติ
โดย	นายวรันต์ เจษฎาไกรสร
สาขาวิชา	วิศวกรรมเครื่องกล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา วัฒนสุโขประสิทธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ

โดย

นายวรัน เจษฎาไกรสร

สาขาวิชา

วิศวกรรมเครื่องกล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา วัฒนสุโกประสิทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ

----- คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

----- ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิระยุทธ ศรีธีระวานิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา วัฒนสุโขะประสิทธิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ ธาราปานิต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรเมธ เฉลิมวิสต์มภ์)

วรัน เจษฎาไกรสร : การวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ. (Impedance measurement of 2D and 3D cancer cells treated with a chemotherapeutic drug) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.วิทยา วัฒนสุโก ประสิทธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ

การวัดอิมพีแดนซ์ถูกนำไปใช้ในงานทางวิศวกรรมชีวภาพและการแพทย์ในหลากหลายรูปแบบ ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ การรวมตัวของกลุ่มเซลล์ การเคลื่อนตัวของกลุ่มเซลล์ รวมทั้งการตอบสนองต่อการรักษาโรคของกลุ่มเซลล์ต่างๆ ข้อดีของวิธีการวัดสัญญาณไฟฟ้าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางชีววิทยา คือ วิธีการไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อย และความสามารถในการวัดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งแตกต่างจากวิธีการวัดแบบเดิม เช่น การย้อมสีเซลล์ทำให้เกิดความเสียหายหรือทำลายตัวอย่างเซลล์ในการทดลอง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างระบบการวัด ไมโครอิเล็กโทรด และกระบวนการทำงาน สำหรับวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT-29 ในรูปทรงสองมิติและสามมิติ ระบบที่ใช้ประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงชนิดกันหลุมแบนและครึ่งทรงกลม ชุดจับไมโครอิเล็กโทรด และเครื่องวัดสัญญาณอิมพีแดนซ์ ในตอนเริ่มต้น เซลล์มะเร็งจำนวน 5000 เซลล์ในของเหลวปริมาตร 200 ไมโครลิตรถูกบรรจุในหลุมเพาะเลี้ยง และปล่อยให้เซลล์รวมตัวเป็นก้อนสามมิติเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไมโครอิเล็กโทรดที่ใช้วัดสัญญาณมีขนาด 200 ไมโครเมตร ถูกใส่เข้าไปในท่อซิลิโคนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร ยาว 20 มิลลิเมตร โดยอิเล็กโทรดมีระยะห่างกัน 2.5 มิลลิเมตร ในการทดลองจะทำการบันทึกค่าอิมพีแดนซ์และบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงของก้อนเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยยาที่มีความเข้มข้น 2.5 , 5 , 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ทดลองในแต่ละวันมีค่าอิมพีแดนซ์ที่ต่างกัน และเซลล์ที่ไม่ได้รับยามีค่าอิมพีแดนซ์ที่ต่างจากเซลล์ที่ได้รับยา โดยสัญญาณอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งแบบสองมิติและสามมิติจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อบอกความแตกต่างของอิมพีแดนซ์จากการเรียงตัวของเซลล์

สาขาวิชา วิศวกรรมเครื่องกล

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6170483721 : MAJOR MECHANICAL ENGINEERING

KEYWORD: Impedance, 3-dimensional, Microelectrode, Colorectal cancer,
chemotherapeutic

Vorratun Jadsadakraisorn : Impedance measurement of 2D and 3D cancer cells treated with a chemotherapeutic drug. Advisor: Assoc. Prof. WITAYA WANNASUPHOPRASIT, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. ALONGKORN PIMPIN, Ph.D.

Impedance measurement has been widely used in bioengineering which is currently employed in monitoring several cellular processes such as cell growth, cell adhesion, cell migration and effect of drugs on cells. Impedance measurements are become more popular due to their remarkable advantages, including label free, non-invasive, non-destructive and quantitative. However, the main advantage of cell impedance measurement is to perform long term monitoring that improve from conventional methods such as cell staining that often effects cell destruction. In this work, we developed a measurement system and microelectrode for characterize an impedance of colon cancer cells type HT-29 in 2D and 3D forms. Five thousand cells of human HT-29 colon were seeded at densities to yield 200 μm for 72 hr. in both Round Bottom and Flat Bottom 96-well plate. The electrodes diameter of 200 μm was inserted to 20 mm. long silicone tube that have diameter of 2.5 mm. with 2.5 mm length between each other. The trial values were saved every 24 hr. for 72 hr. to shown the difference of impedance between each day of experiment and difference between non-treated cells and treated cells.

Field of Study: Mechanical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.วิทยา วัฒนสุโขประสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิน ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษาวิจัย ถ่ายทอดประสบการณ์ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ แนวคิด ชี้แนะจุดบกพร่องและวิธีแก้ไข และให้คำแนะนำในทุก ๆ ด้านที่มีคุณค่ายิ่ง ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.วีระยุทธ ศรีธรรมาภิบาล และ ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราษานิต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความรู้และแนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัย ทำให้ผู้วิจัยนำมาปรับปรุงแก้ไขจนบรรลุผลสำเร็จ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุรเมธ เฉลิมวิสุตม์กุล Mr.Thet Pai Oo จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ คุณเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคคำ และ คุณประภาพรพรณ สอนฤทธิ์ นิสิตคณะวิศวกรรมเครื่องกล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้คำแนะนำ ด้านเทคนิค แนวคิดที่สำคัญ และการหาเครื่องมือที่จำเป็นในการวิจัย รวมถึงเพื่อน พี่ น้อง ทุก ๆ คน ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

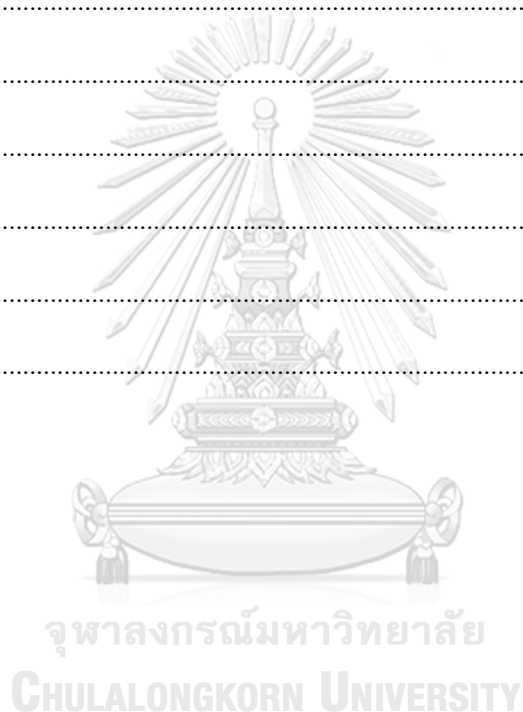
สุดท้ายขอขอบคุณครอบครัว เจษฎาไกรสร ที่ให้คำแนะนำ และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

วรัน เจษฎาไกรสร

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่1.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานของวิทยานิพนธ์.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2.....	4
2.1 การเรียงตัวของเซลล์.....	4
2.2 อิมพีแดนซ์ (impedance).....	5
2.3 การย้อมสีเซลล์ (Cell staining).....	9
2.4 ยา Fluorouracil (5-FU).....	10
บทที่3.....	11
3.1 impedance sensor.....	12
3.2 การ calibrate sensor.....	12
3.3 การทดสอบชุดควบคุม.....	13

3.4 การเลี้ยงเซลล์.....	15
3.5 ชุดทดลองวัด viability	16
3.6 การวัดค่าอิมพิแดนซ์	18
บทที่4	19
4.2 เซลล์สองมิติ ในถาดเพาะเลี้ยงแบบ Flat Bottom	19
4.3 เซลล์สองมิติ ในถาดเพาะเลี้ยงแบบ Round Bottom.....	22
4.4 เซลล์สามมิติ	25
บทที่5	29
5.1สรุปผลการวิจัย.....	29
5.2ข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31
ประวัติผู้เขียน	37



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของวิทยานิพนธ์

มะเร็ง คือ กลุ่มเซลล์ของร่างกายที่มีเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติและควบคุมไม่ได้ นอกจากนั้นยังสามารถที่จะรุกรามไปยังอวัยวะส่วนอื่นของร่างกายได้ โดยนอกจากการเจริญเติบโตที่ผิดปกติแล้วนั้นเซลล์มะเร็งอาจมีข้อแตกต่างจากเซลล์ปกติได้เช่น ไม่ตอบสนองต่อสัญญาณที่สั่งให้เซลล์ทำลายตัวเอง สร้างหลอดเลือดเชื่อมต่อกับกลุ่มเซลล์เพื่อลำเลียงสารอาหารและออกซิเจนสู่กลุ่มเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด H-29 ถูกค้นพบในปี 1964 ในร่างของหญิงวัย 44 ปี โดยมะเร็งลำไส้ชิ้นนั้นจัดเป็น 1 ใน 3 ของมะเร็งที่มีอัตราการเสียชีวิตมากที่สุด โดยนับเป็น 10% ของผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งทั้งหมด มีรายงานพบว่ามีผู้ป่วยใหม่กว่าหนึ่งล้านคนต่อปีทั้งในผู้ชายและผู้หญิง (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015) ซึ่งพบมากในผู้ที่มีอายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป โดยปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งมีดังนี้ พฤติกรรมการบริโภค การออกกำลังกายน้อย พฤติกรรมการสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นมะเร็งทั้งในบุคคลและในครอบครัว อาทิเช่น ประวัติการเป็นมะเร็งรังไข่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม และอาจพบในผู้ป่วยที่เคยมีประวัติการเป็นโรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) หรือโรคเบาหวานมาก่อน (Deng, Gui et al. 2012, De Bruijn, Arends et al. 2013, Arvelo, Sojo et al. 2015) การรักษา มะเร็งลำไส้ใหญ่ยังได้ผลค่อนข้างน้อย เนื่องจากผู้ป่วย ที่เข้ารับการรักษายู่ในระยะสุดท้ายของโรค โดยการรักษา มะเร็งลำไส้ใหญ่มี 3 วิธีหลักๆ คือ การผ่าตัด การฉายรังสีและ การใช้ยาเคมีบำบัด

ในการศึกษาการตอบสนองต่อยาของเซลล์มะเร็งนั้นเดิมทีใช้การทดสอบกับเซลล์ที่เรียงตัวกันในแนวนาบ ซึ่งมีความต่างกับเซลล์ในร่างกาย เพื่อจำลองลักษณะของเซลล์ในร่างกายหรืออวัยวะนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีในการจำลองเซลล์เป็นทรงกลม (spheroid) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับร่างกายของสิ่งมีชีวิตมากกว่า

วิธีการวัดความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับยานั้นเดิมทีใช้ค่าใช้จ่ายและทรัพยากรบุคคลในการดำเนินการแต่สูง (Nam, Smith et al. 2014) ทำให้เกิดวิธีการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยการวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์ ซึ่งมีข้อได้เปรียบในหลายประการเช่น มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า ใช้

ทรัพยากรบุคคลน้อยกว่า ไม่จำเป็นต้องทำลายเซลล์ตัวอย่างเพื่อวัดค่าและสามารถตรวจสอบการตอบสนองต่อเวลาได้ในทันที ซึ่งทำให้เข้าใจในพฤติกรรมของเซลล์ได้มากกว่า

การวัดอิมพีแดนซ์นั้นถูกนำไปใช้ในหลากหลายกระบวนการ ไม่ว่าจะเป็นการเจริญเติบโตของเซลล์ การรวมตัวของกลุ่มเซลล์(Cell adhesion) การเคลื่อนตัวของกลุ่มเซลล์ และการตอบสนองต่อการรักษาโรคของกลุ่มเซลล์ต่างๆ ซึ่งข้อได้เปรียบหลักของวิธีการวัดความเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าคือ สามารถวัดความเปลี่ยนแปลงได้อย่างต่อเนื่อง จึงทำให้สามารถศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นชั่วคราวและความเปลี่ยนแปลงระหว่างการทดลองได้ ซึ่งแตกต่างจากวิธีการวัดผลแบบดั้งเดิมที่วัดผลเมื่อสิ้นสุดการทดลองและการวัดผลนั้นทำให้เกิดความเสียหายหรือทำลายตัวอย่างการทดลอง

วิธีการวัดผลโดยใช้ค่าอิมพีแดนซ์นั้นอาจแบ่งได้เป็นหลายวิธีการ เช่น impedance flow cytometry(IFC) electrochemical impedance spectroscopy(EIS) และ electric cell-substrate impedance sensing(ECIS) โดยวิธีการแบบ IFC ถูกใช้ในการนับจำนวนเซลล์เดี่ยวที่ลอยอยู่ในสารละลาย(Chen, Xue et al. 2015) ส่วนวิธีการ EIS ใช้ในการวัดค่าอิมพีแดนซ์ในหลายความถี่ของกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้มีการขยายตัวแล้ว(Sheng-Yi, Dai-Chian et al. 2012) และวิธีการ ECIS เป็นวิธีการวัดค่าอิมพีแดนซ์ของกลุ่มเซลล์ที่ติดกับขั้วอิเล็กโทรดที่อยู่บริเวณด้านล่างของหลุมทดลอง(Xu, Xie et al. 2016) โดยค่าอิมพีแดนซ์อาจจะขึ้นอยู่กับ จำนวนของเซลล์ ขนาดของเซลล์หรือการรวมตัวของเซลล์(Hamidi, Lilja et al. 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ออกแบบชุดทดลองในการวัดค่าอิมพีแดนซ์(impedance)ของเซลล์มะเร็งชนิดH-29ได้
2. เปรียบเทียบค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์H-29และเซลล์H-29ที่ได้รับยา5-FU

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สามารถวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งชนิดH-29ได้
2. เปรียบเทียบความแตกต่างของอิมพีแดนซ์ของเซลล์ที่ได้รับยา5-FUกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาได้

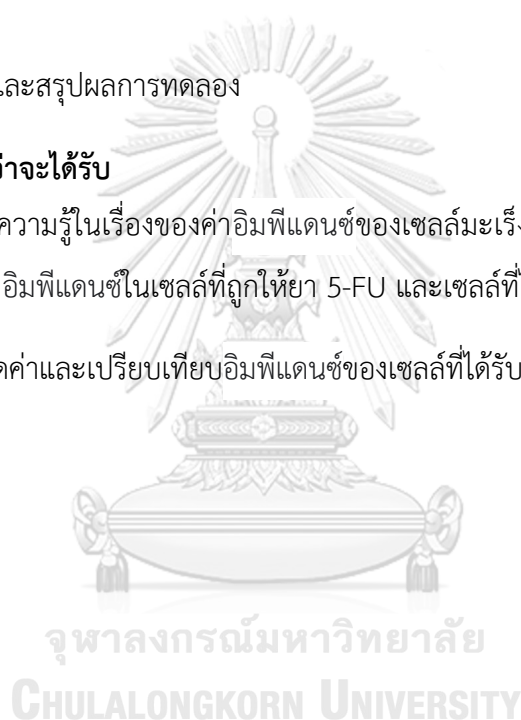
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานของวิทยานิพนธ์

1. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. ออกแบบและสร้างอุปกรณ์วัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งชนิด H-29
3. เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะเป็นระนาบชั้นเดียว (monolayer) และทรงกลม (spheroid) แล้วทำการวัดอิมพีแดนซ์
4. ทำซ้ำในข้อที่ 3. โดยให้ยา 5-FU ในความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แล้วทำการวัดค่าอิมพีแดนซ์ ทั้ง 3 ชุดทดลองเปรียบเทียบกับชุดทดลองในข้อที่ 3.
5. วัดค่าอิมพีแดนซ์ของของเหลวเลี้ยงเซลล์และยารักษามะเร็งชนิด 5-FU ในความเข้มข้นตามขั้นตอนที่ 4.
6. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับองค์ความรู้ในเรื่องของค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งชนิด H-29 การเพาะเลี้ยงเซลล์และความแตกต่างของอิมพีแดนซ์ในเซลล์ที่ถูกให้ยา 5-FU และเซลล์ที่ไม่ได้รับยา
2. สามารถวัดค่าและเปรียบเทียบอิมพีแดนซ์ของเซลล์ที่ได้รับยา 5-FU และไม่ได้รับยา 5-FU



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

บทนี้จะทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Electric cell-substrate impedance sensing - ECIS) ซึ่งประกอบด้วยหัวข้อหลักๆดังนี้

2.1 การเรียงตัวของเซลล์

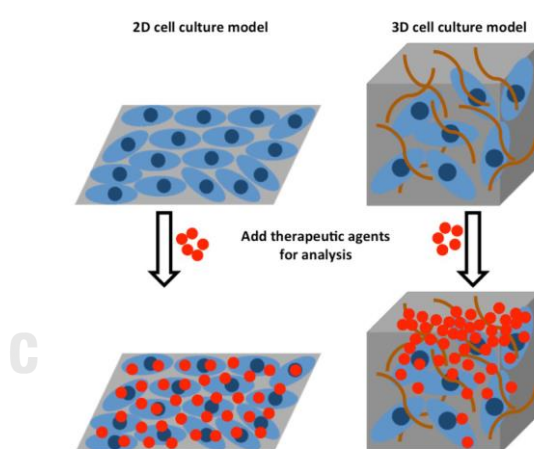
โดยทั่วไปแล้วการเพาะเลี้ยงเซลล์ 2D จะอาศัยการยึดเกาะกับพื้นผิวเรียบ เช่นจานเพาะเชื้อที่ทำจากแก้วหรือโพลีสไตรีน เพื่อให้การสนับสนุนทางกลแก่เซลล์ การเติบโตของเซลล์ในชั้นโมโนเลเยอร์ 2 มิติช่วยให้สามารถเข้าถึงสารอาหารและปัจจัยการเจริญเติบโตในปริมาณที่ใกล้เคียงกันซึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเติบโตและการเพิ่มจำนวนที่เป็นเนื้อเดียวกัน คุณลักษณะนี้ทำให้แพลตฟอร์ม 2D น่าสนใจสำหรับนักชีววิทยาและผู้ใช้ทางคลินิกเนื่องจากความเรียบง่ายและมีประสิทธิภาพ แต่วิธีการ 2D เหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่สามารถควบคุมรูปร่างของเซลล์ ซึ่งกำหนดตัวชี้ทางชีวฟิสิกส์ที่ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเซลล์ในร่างกาย เพื่อควบคุมรูปร่างของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ได้มีการสร้างซับสเตรตที่มีรูปแบบไมโคร เช่น เกาะยึดติดเซลล์ (Dupont, Morsut et al. 2011) หลุมขนาดเล็ก (Yang, Yin et al. 2010) และเสาขนาดเล็ก (Fu, Wang et al. 2010) เพื่อปรับแต่งรูปร่าง 2 มิติ (Edmondson, Broglie et al. 2014)

เซลล์ในร่างกายของเราทำงานทางชีวภาพเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อม 3 มิติที่มีความซับซ้อนสูง และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ซึ่งเชื่อมโยงกับการทำงานของอวัยวะทั้งหมดสำหรับระบบการเพาะเลี้ยง 3 มิติในกลุ่มเซลล์ จะมีความแตกต่างในระดับการเข้าถึงสารอาหารและการสะสมของเสีย ตัวอย่างเช่น พื้นผิวของสเฟียร์อยด์จะมีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด ในขณะที่ภายในของกลุ่มเซลล์ 3 มิติจะมีจำนวนเซลล์ที่นิ่งหรือเซลล์ตายสูงกว่า การแนะนำวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มุ่งสร้างแบบจำลองปฏิสัมพันธ์ภายในร่างกายของเนื้อเยื่อและอวัยวะได้เปิดโอกาสใหม่ในการศึกษาสัญญาณทางชีวเคมีและชีวกลศาสตร์พื้นฐาน สภาพแวดล้อมจุลภาคที่ออกแบบมาอย่างดีในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและเซลล์สามารถนำมาใช้เพื่อส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การย้ายถิ่น การผลิตเมทริกซ์ และการสร้างความแตกต่างของเซลล์ต้นกำเนิด ส่วนย่อยต่อไปนี้จะกล่าวถึงเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3 มิติต่างๆ ที่ได้รับการจัดตั้งขึ้นเพื่อพยายามสร้างสภาวะในร่างกายเพื่อการพัฒนาเซลล์ (Scadden 2006, Underhill and Bhatia 2007, Burdick and Vunjak-Novakovic 2009)

เดิมทีการทดลองปฏิกิริยาตอบสนองของเซลล์จะถูกทดลองในแผ่นเลี้ยงเซลล์แบบระนาบ (Planer cultured cells) ซึ่งมักจะให้ผลที่คลาดเคลื่อนจากปฏิกิริยาตอบสนองจากร่างกายสิ่งมีชีวิตอยู่มาก จึงได้เกิดวิธีการทดลองกับเซลล์ที่เรียงตัวในลักษณะทรงกลม (Spheroids) ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกว่ามาก (Bierwolf, Lutgehetmann et al. 2011)

เนื่องจากเซลล์ที่เรียงตัวเป็นทรงกลมนั้นได้มีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อตัวเซลล์มากกว่าการเรียงตัวแบบแผ่นระนาบ เช่นการได้รับออกซิเจนและสารอาหารที่น้อยกว่าของเซลล์บริเวณตรงกลางของทรงกลม และมีการแลกเปลี่ยนสารระหว่างเซลล์ที่มากกว่า นอกจากนี้ยังแสดงการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า (Pampaloni, Reynaud et al. 2007, Myungjin Lee, Mhawech- Fauceglia et al. 2013, Duval, Grover et al. 2017)

โดยในการทดลองทดสอบปฏิกิริยาของเซลล์มะเร็งกับยารักษา ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งที่มีการเรียงตัวเป็นทรงกลมนั้นสามารถต้านทานยารักษาได้มากกว่าเซลล์ที่เรียงตัวเป็นแผ่นระนาบมาก



ภาพที่ 1 การให้ยาในเซลล์แบบระนาบและทรงกลม

2.2 อิมพีแดนซ์ (impedance)

อิมพีแดนซ์ (impedance) หมายถึง ค่าความต้านทานรวมทั้งหมดในวงจรไฟฟ้ากระแสสลับ โดยเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ z และมีหน่วยเป็นโอห์ม (Ω) ค่าอิมพีแดนซ์มีความซับซ้อนกว่าค่าความต้านทานตรงที่ค่าอิมพีแดนซ์เปลี่ยนแปลงตามความถี่

รีแอกแตนซ์(Reactance) หมายถึง ค่าตัวที่ต้านกระแสของความจุและความเหนี่ยวนำ เขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ X ค่ารีแอกแตนซ์เปลี่ยนแปลงตามความถี่ของสัญญาณไฟฟ้า และมีหน่วยการวัดเป็นโอห์ม(Ω)

รีแอกแตนซ์มีสองชนิดคือ: รีแอกแตนซ์ความจุ (X_C) และรีแอกแตนซ์ความเหนี่ยวนำ (X_L)

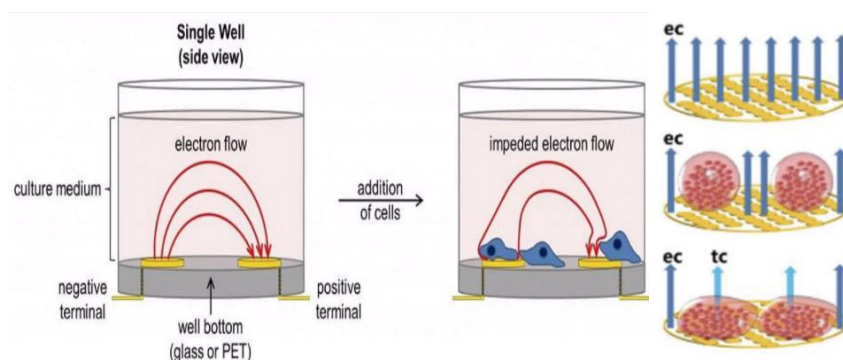
โดย $X = X_L - X_C$



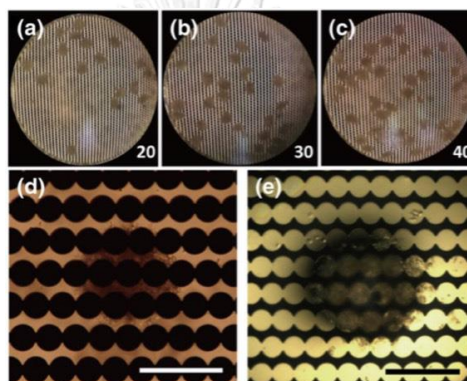
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง impedance resistance และ reactance

โครงสร้างที่ทำให้เซลล์มีค่ารีแอกแตนซ์คือ เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งอยู่คั่นกลางระหว่างน้ำในเซลล์กับน้ำนอกเซลล์ โดยเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้าเนื่องจากมีไขมันประกอบหลักในขณะที่น้ำในเซลล์และน้ำนอกเซลล์มีคุณสมบัติเป็นนำไฟฟ้าเพราะมีสารละลายอิเล็กโทรไลต์ประกอบ ทำให้โครงสร้างของเซลล์กับน้ำในเซลล์และน้ำนอกเซลล์จึงมีลักษณะคล้ายโครงสร้างของอุปกรณ์ไฟฟ้าที่มีรีแอกแตนซ์ (Research 1994, BAUMGARTNER 1996, Ellis 2000)

เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมันซึ่งสามารถขัดขวางการวิ่งของอิเล็กตรอนได้ทำให้มีค่าความต้านทานทางไฟฟ้าที่สูงกว่าของเหลวเลี้ยงเซลล์และของเหลวภายในเซลล์ นอกจากนั้นค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์นั้นจะขึ้นอยู่กับขนาด จำนวน รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ นอกจากนั้นตำแหน่งของกลุ่มเซลล์ในหลุมทดลองก็ส่งผลต่อค่าอิมพีแดนซ์ที่วัดได้เช่นกัน(Xu, Xie et al. 2016)

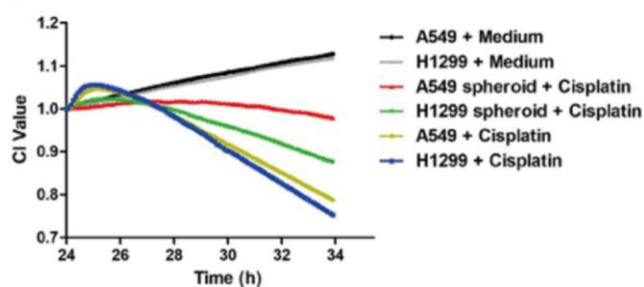


ภาพที่ 3 การไหลของอิเล็กตรอนในหลุมตัวอย่างที่ไม่มีกลุ่มเซลล์และมีกลุ่มเซลล์
(No 2017, Wu, Wei et al. 2018)



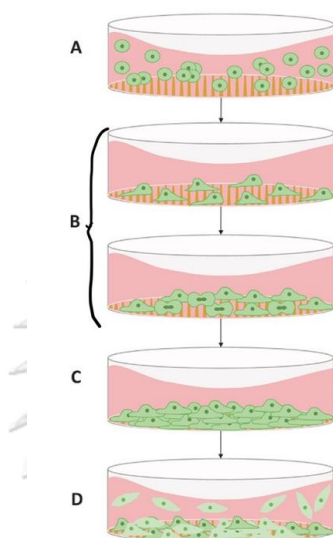
ภาพที่ 4 รูปถ่ายกลุ่มเซลล์ตัวอย่างบนขั้วอิเล็กโทรด (Wu, Wei et al. 2018)

ในการทดลองให้ยาเคมีบำบัดกับเซลล์ตัวอย่างทดลองนั้น ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด ในลักษณะ 2 มิติ และ 3 มิติ แล้วทิ้งให้พักตัวในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการให้ยา Cisplatin กับกลุ่มทดลอง เก็บค่าอิมพิแดนซ์เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากภาพที่ 5 จะสังเกตได้ว่า ในกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับยานั้นมีค่าอิมพิแดนซ์ที่สูงขึ้นเรื่อยๆ แต่กลุ่มที่ได้รับยานั้นมีค่าอิมพิแดนซ์ที่ต่ำลง



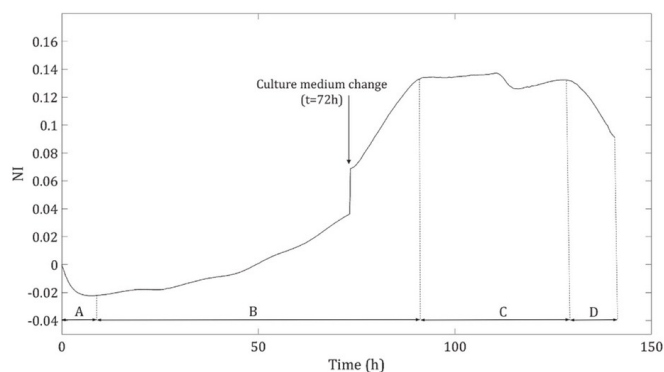
ภาพที่ 5 ค่าอิมพิแดนซ์ของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกกระตุ้นด้วยยา

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เซลล์H-29ที่ยังไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยยานั้นอาจมีความแตกต่างกันในการจัดเรียงตัวของกลุ่มเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา โดยอาจจะแบ่งออกเป็น4ช่วงหลักๆได้ดังนี้ 1.ช่วงเริ่มต้น 2.ช่วงการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว 3.ช่วงคงที่ 4.ช่วงแตกตัวและตาย(W. Aruni A 2011, Banfalvi 2014)



ภาพที่ 6 ช่วงต่างๆของเซลล์ทั้ง 4ช่วง โดย A.)ช่วงเริ่มต้น B.)ช่วงการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว C.)ช่วงคงที่ D.)ช่วงแตกตัวและตาย(Fuentes-Vélez, Fagoonet et al. 2021)

ในแต่ละช่วงของการเรียงตัวของเซลล์นั้นอาจให้ค่าอิมพิแดนซ์ที่ต่างกันอันเป็นผลมาจากปัจจัยหลายอย่างดังนี้ จำนวนของเซลล์ที่ต่างกัน การเรียงตัวที่ต่างกันและตำแหน่งที่เซลล์เรียงตัวอยู่ภายในภาชนะ(Wu, Wei et al. 2018)

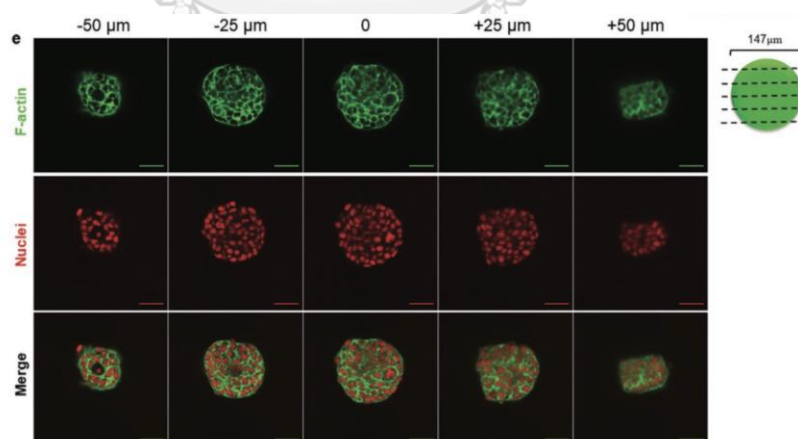


ภาพที่ 7 ค่าอิมพิแดนซ์ที่วัดได้ในช่วงต่างๆของเซลล์ตัวอย่าง ในเวลา140ชั่วโมง (Fuentes-Vélez, Fagoonet et al. 2021)

Author	Year	Cell type	system	Study of
1.) Wu, Wei et al.	2018	Multiple spheroids	Directly contact to spheroid with flow thorough media	Drug test
2.) Fuentes-Vélez, Fagoonee et al	2021	Monolayer cells	Electrode under static condition wells	Cell growth

2.3 การย้อมสีเซลล์ (Cell staining)

เนื่องจากเซลล์มีขนาดเล็กและมีองค์ประกอบที่หลากหลายซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์นอกจากนั้นเซลล์มักจะมีลักษณะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม จึงทำให้การสังเกตและศึกษานั้นเป็นไปได้ยากไม่ว่าจะเป็นการศึกษารูปร่าง ส่วนประกอบของเซลล์หรือการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ การย้อมสีเซลล์ (Cell staining) เป็นเทคนิคที่ทำให้เห็นรายละเอียดและความแตกต่างของเซลล์ได้มากขึ้น ไม่ว่าจะย้อมสีเพื่อสังเกตองค์ประกอบต่างๆของเซลล์หรือย้อมสีเพื่อตรวจสอบว่าเซลล์นั้นมีชีวิตอยู่หรือไม่ ซึ่งสามารถทำได้หลากหลายวิธี



ภาพที่ 8 การย้อมสีตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์(Järvinen, Bonabi et al. 2020)

MTT assay เป็นวิธีบอกจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสี จากสีเหลือง เป็นสีม่วง อันเกิดจากผลึก formazan ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จากไมโทคอนเดรีย (mitochondrial reductase) กับ MTT ที่เดิมที่เป็นสีเหลือง แล้วจึงเกิดผลึกสีม่วง

2.4 ยา Fluorouracil (5-FU)

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งนั้นแบ่งเป็นหลายชนิดขึ้นกับลักษณะการทำงานของตัวยาไม่ว่าจะเป็นการทำงานโดยหยุดการเจริญเติบโตของมะเร็ง ชัดขวางการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งหรือทำลายตัวเซลล์มะเร็งโดยตรง ซึ่งตัวยาที่ทำงานในลักษณะที่ต่างกันทำให้มีผลต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดต่างกัน โดยอาจแบ่งตัวยาได้ดังนี้

Antimetabolites คือตัวยาที่ทำงานโดยเข้าไปรวมตัวกับ DNA(deoxyribonucleic acid) และRNA(ribonucleic acid) เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และถูกทำลายในที่สุด

Vinca Alkaloids คือตัวยาที่ทำงานโดยการยับยั้งการสร้างหรือทำลายเส้นใยที่ใช้ในกระบวนการแบ่งเซลล์ (mitotic spindle) ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้

Steroid Hormones ในมะเร็งหลายชนิดเกิดขึ้นจากระดับฮอร์โมนที่ผิดปกติหรือในเซลล์มะเร็งหลายชนิดการได้รับฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งได้

L-asparaginase คือยาที่ทำงานโดย ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโนและสารสื่อประสาทของเซลล์มะเร็งเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งตาย

ตัวยาFluorouracil(5-FU) มีโครงสร้างทางโมเลกุลคือ $C_4H_3FN_2O_2$ จัดเป็นยาในกลุ่ม Antimetabolites โดยมีกลไกการออกฤทธิ์หลายอย่าง แต่โดยหลักนั้นจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase ที่ถูกควบคุมโดย cell cycle proteins และยายังมีความจำเพาะต่อเซลล์ในระยะ S phase นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ 5-fluorouracil ยังเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptosis จากการควบคุมยีนต่างๆที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง (Manmuan and Manmuan 2019)

บทที่ 3

แนวทางการออกแบบ

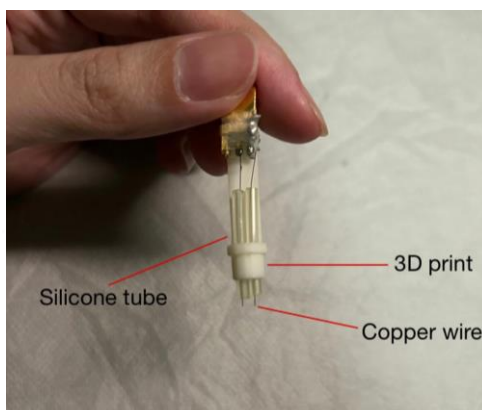
บทนี้จะกล่าวถึงแนวทางการออกแบบอุปกรณ์ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ตัวอย่างชนิด H-29 ณ เวลาต่างๆหลังจากให้ยารักษามะเร็งชนิด 5-FU ชุดการทดลองเป็น 3 ชุดทดลองหลักคือ 1.) การทดลองเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ(3D) 2.) การทดลองเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom(2D-F) และ 3.) การทดลองเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ Round bottom(2D-U) โดยในการทดลองทั้ง 3 ชุดทดลองนั้นแบ่งย่อยเป็น 4 กลุ่ม เริ่มจากกลุ่มที่ไม่ได้รับยา 5-FU เลยกับกลุ่มที่ได้รับยา 5-FU ผสมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ด้วยความเข้มข้น 2.5 ,5 ,10 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ใช้วิธีวัดค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ ผ่านเครื่อง DG8SAQ Vector Network Analyzer ในการแสดงผลความแตกต่างเปรียบเทียบ



ภาพที่ 9 เครื่องวัดค่าความต้านทานที่ติดเข้ากับถาดเลี้ยงเซลล์

3.1 impedance sensor

ขั้วอิเล็กโทรด(electrodes) จำเป็นจะต้องมีขนาดเล็กเนื่องจากเซลล์ตัวอย่างมีขนาดเล็กมาก และต้องสามารถเข้าใกล้เซลล์ตัวอย่างให้ได้มากที่สุดเพื่อสามารถวัดความต้านทานของเซลล์ตัวอย่างได้ โดยได้เลือกอิเล็กโทรดเป็นสายทองแดงขนาดเล็กเนื่องจากมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี



ภาพที่ 10 ขั้วอิเล็กโทรด

ไมโครอิเล็กโทรดที่ใช้วัดสัญญาณมีขนาด 200 ไมโครเมตร โดยอิเล็กโทรดแต่ละเส้นนั้นถูกสอดเข้าไปในท่อซิลิโคนความยาว 20 มิลลิเมตร โดยอิเล็กโทรดมีระยะห่างกัน 2.5 มิลลิเมตร

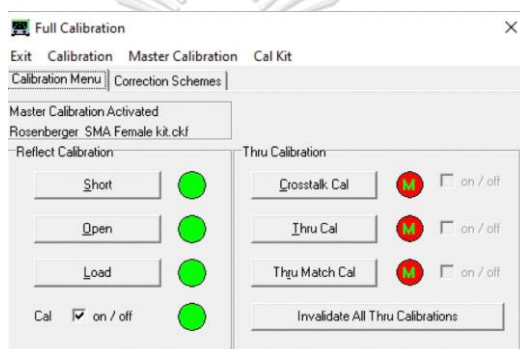
เนื่องจากขั้วอิเล็กโทรดมีขนาดเล็กและเสียหายได้ง่ายจึงต้องมีอุปกรณ์ยึดติดให้ไม่เคลื่อนไหว จึงได้เลือกใช้วิธีพิมพ์ 3 มิติ ในการสร้างอุปกรณ์ยึดเนื่องจากมีน้ำหนักที่เบาและสามารถกำหนดขนาดได้อย่างละเอียด โดยอุปกรณ์นี้แบ่งเป็น 3 ส่วน มีส่วนแรกลักษณะเป็นทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.92 มิลลิเมตร สูง 7 มิลลิเมตร ต่อกับส่วนที่ 2 ที่เป็นทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 มิลลิเมตร สูง 2 มิลลิเมตร และส่วนสุดท้ายที่เป็นแผ่นบาง สูง 25 มิลลิเมตร โดยมีการเจาะช่องสำหรับอิเล็กโทรดและท่อซิลิโคนที่มีขนาดช่องวงกลม 2.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 ช่อง ที่เชื่อมต่อกัน

3.2 การ calibrate sensor

การ calibrate เซนเซอร์นั้นมีความสำคัญในการทดสอบความแม่นยำของเซนเซอร์ ว่าสามารถวัดค่าความต้านทานของการทดลองได้จริงหรือไม่ และมีค่าความคลาดเคลื่อนมากน้อยแค่ไหน โดยทำการทดสอบด้วยการวัดค่าอิมพีแดนซ์ด้วยการใช้อุปกรณ์ในภาพที่ 11 ในการปรับค่าในช่วงที่ 0.01-10 MHz ผ่านสายเคเบิลที่มีความต้านทาน 50 โอห์ม โดยทำการทดสอบในโปรแกรม VNWA 3 วิธี 1.)0 โอห์ม (Short) 2.)เปิดวงจร (Open) 3.)ความต้านทาน 50 โอห์ม (Load) ดังภาพที่ 12

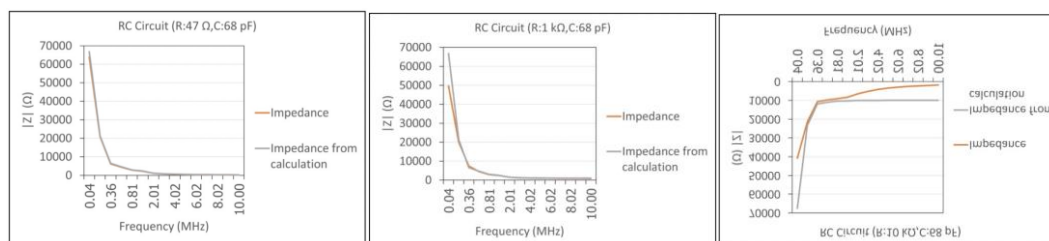


ภาพที่ 11 Calibration Element



ภาพที่ 12 ผล Calibration

จากนั้นจึงทำการวัดผลเทียบกับอุปกรณ์ RC circuit ของ VNWA ที่ประกอบด้วย ตัวเก็บประจุขนาด 68 พิโกฟารัด และ ตัวต้านทานขนาด 47 โอห์ม 1 กิโลโอห์ม และ 10 กิโลโอห์ม จะได้ค่าจากโปรแกรม VNWA ที่แสดงขนาดของอิมพีแดนซ์ ตั้งแต่ความถี่ 0.01-10 MHz ดังที่แสดงในภาพที่ 14 ที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่าที่วัดได้มีความใกล้เคียงกับการคำนวณโดยโปรแกรม

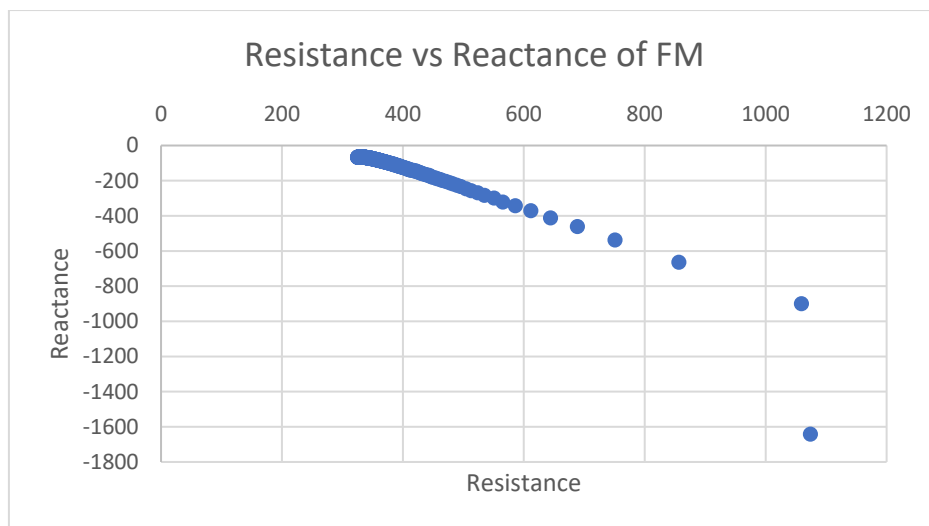


ภาพที่ 13 ค่าอิมพีแดนซ์ที่ได้จากการวัดและการคำนวณ

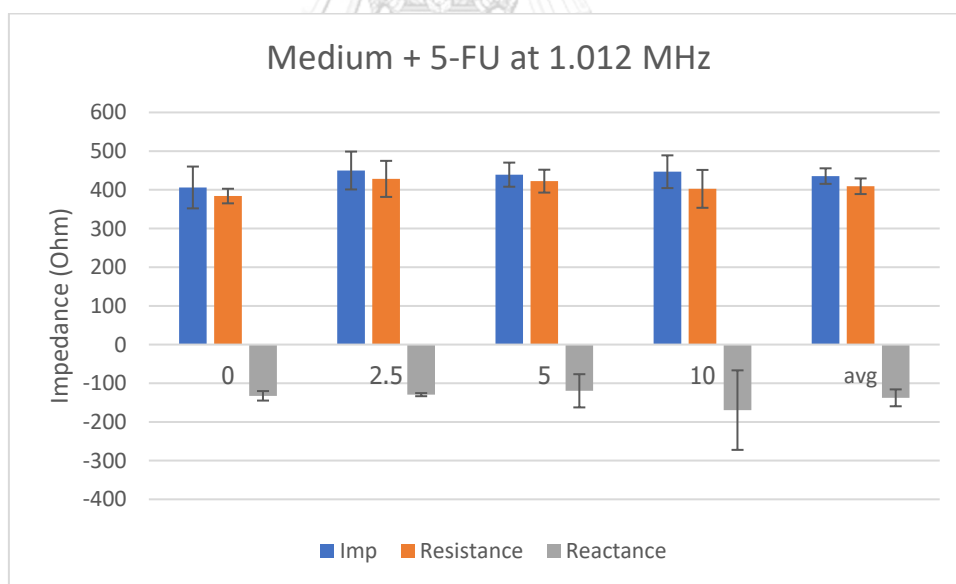
3.3 การทดสอบชุดควบคุม

ทดสอบโดยจุ่มอิเล็กโทรดลงไปในปลายของอิเล็กโทรดสัมผัสกันของหลุมทดลองพอดิ ในหลุมทดลองทั้งแบบ Flat bottom และ Round bottom ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี

ยาFluorouracil (5-FU) ในความเข้มข้น 2.5, 5, 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ด้วยอิเล็กโทรดจำนวน 5 ตัว โดยทำการวัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จะได้ผลดังภาพที่ 13



ภาพที่ 14 ความต้านทานและความต้านทานจินตภาพของชุดควบคุม



ภาพที่ 15 ค่าอิมพีแดนซ์ ความต้านทานและค่าความต้านทางเชิงจินตภาพ ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ยาในความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10 ไมโครโมลาร์

เมื่อทำการพิจารณาที่ความถี่ 1.012 MHz จากภาพที่ 14 แสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ทั้ง 5 ตัว นั้นสามารถวัดค่า อิมพีแดนซ์ ค่าความต้านทานและค่าความต้านทางเชิงจินตภาพได้ใกล้เคียงกัน และ

แสดงให้เห็นว่ายา Fluorouracil นั้นไม่ได้ส่งผลต่อความต้านทานทางไฟฟ้าของอาหารเลี้ยงเซลล์มากนัก

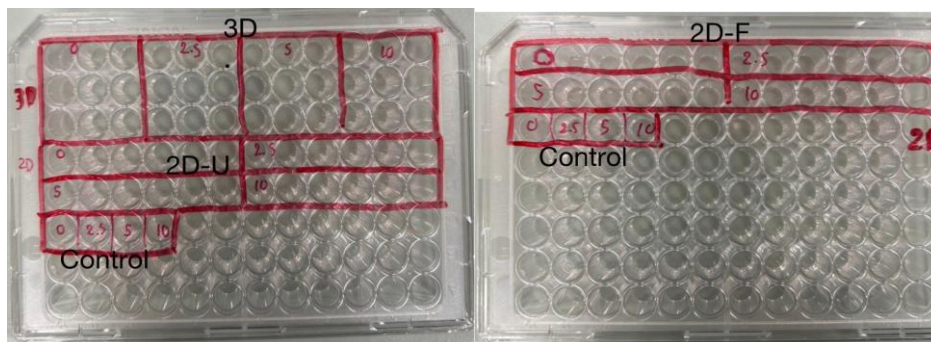
3.4 การเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งสามารถทำได้โดย เก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งและนำมาเพาะเลี้ยงใน ภาดหลุม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีส่วนประกอบเป็น DMEM (High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) ที่มีเซรัมตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco) ร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร, ยาปฏิชีวนะและ ยาต้านเชื้อรา (antibiotics and antimycotics, Gibco) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และกรดอะมิโนแอล-กลูตามีน (L-glutamine, Gibco) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เปลี่ยนถ่ายอาหาร เพาะเลี้ยงทุก 2 วัน

การเพาะเลี้ยงในภาดชนิด 96 หลุม ที่เพาะเลี้ยงแบบสามมิติเพื่อให้ได้สเฟียร์รอยขนาด ประมาณ 300 ไมครอน นั้นได้ใส่เซลล์ลงในแต่ละหลุมจำนวน 5,000 เซลล์ โดยเริ่มจากการทำการ เคลือบภาดเพาะชนิด 96 หลุม แบบ Round Bottom ที่มีความกว้าง 6.92 มิลลิเมตร และลึก 12 มิลลิเมตร ด้วย pHEMA ที่งัดขั้วขึ้นแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 36 หลุม โดย แบ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10 อย่างละ 9 หลุม สำหรับ เซลล์ 3 มิติ ดังที่แสดงในภาพที่12 นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่ม ทดลอง

สำหรับชุดทดลองแบบ 2 มิติ จะไม่ทำการเคลือบภาดเพาะ และใช้ภาดทดลองแบบ Flat Bottom และภาดเพาะแบบ Round bottom ชนิด 96 หลุม จำนวน 24 หลุม โดยแบ่งเป็นอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่ผสมยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10 อย่างละ 6 หลุม สำหรับ เซลล์ 2 มิติ โดย ทำการเลี้ยงเซลล์โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในแต่ละหลุม 5,000 เซลล์ ดังที่แสดงในภาพที่12 นำเข้า ตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทดลอง

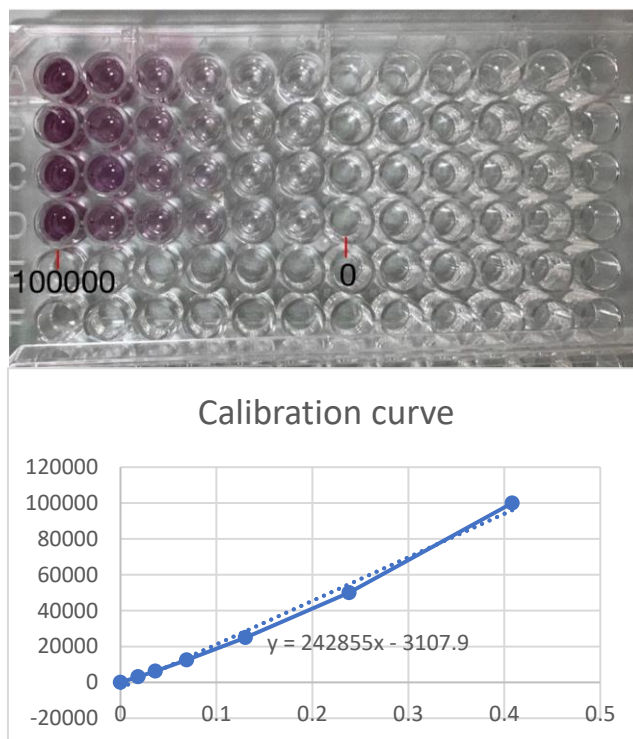
ชุดควบคุม จำนวน 8 หลุม โดยแยกเป็นround bottom และ flat bottom อย่างละ 4 หลุม ที่มีความเข้มข้นของยา 5-FU 0, 2.5, 5, 10 ตามลำดับ จึงนำทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมเข้า ตู้อบเพาะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่ม นำมาทำการทดลอง



ภาพที่ 16 เซลล์ H-29 และเซลล์ H-29 ที่ได้รับยา 5-FU

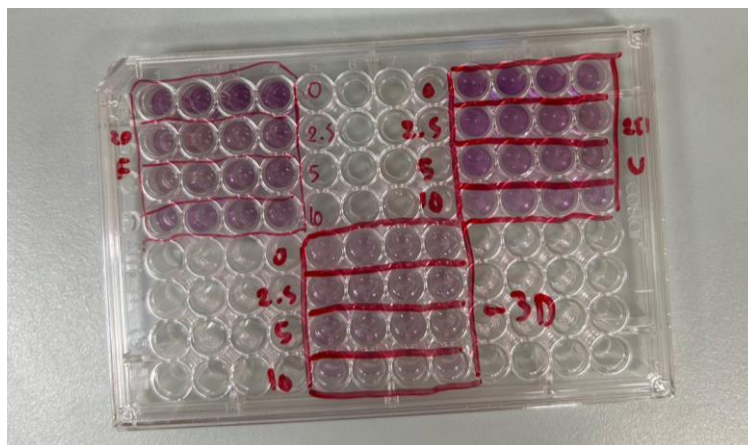
3.5 ชุดทดลองวัด viability

การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay ในการทดลองครั้งนี้ เริ่มจากการทำ calibration curve โดย เตรียมเซลล์จำนวน 200,000 เซลล์ โดยทำการแบ่งลดทอนลงชนิด 96 หลุม โดยแบ่งครึ่งใส่ในแต่ละหลุมเป็นจำนวน 100,000 ,50,000 ,25,000 ,12,500 ,6,250 ,3,125 เซลล์ ตามลำดับ แล้วจึงนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จึงนำค่าที่วัดได้มาพล็อตเป็นกราฟเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ จะสามารถหาสมการความสัมพันธ์ของความเข้มสีที่เกิดขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้ ทำโดยดูดอาหารเดิมออก แล้วเติมสาร MTT เข้าไปแทนที่ น้ำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำออกมาจากตู้อบ ดูด MTT ออกแล้วเติมสาร DMSO เข้าไปแทนที่ แล้วจึงนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



ภาพที่ 17 Calibration curve

ในการวัด MTT ของการทดลองครั้งนี้ ทำโดยเตรียมเซลล์ทดลองในภาชนะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ทั้งแบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ round bottom และ flat bottom รวมถึงในการทดลองแบบ 3 มิติ อย่างละ 16 หลุม โดยแบ่งเป็น ความเข้มข้นของยา 5-FU 0 ,2.5 ,5 ,10 อย่างละ 4 หลุม ตามลำดับ โดยทำการเตรียมชุดทดลองข้างต้นเป็นจำนวน 3 ชุด เพื่อใช้ในการวัดค่า viability ในเวลา 3 วัน โดยใช้วันละ 1 ชุด ทำโดยนำเซลล์ตัวอย่างที่ได้เตรียมไว้ข้างต้นมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะทดลอง ใส่น้ำยา MTT ลงไปแล้วนำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำออกมาจากตู้อบ ดูดน้ำยา MTT ออกแล้วใส่น้ำยา DMSO เข้าไปแทนที่ 07' นำค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากกลุ่มทดลองไปแทนค่าในสมการที่หาได้จาก calibration curve เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

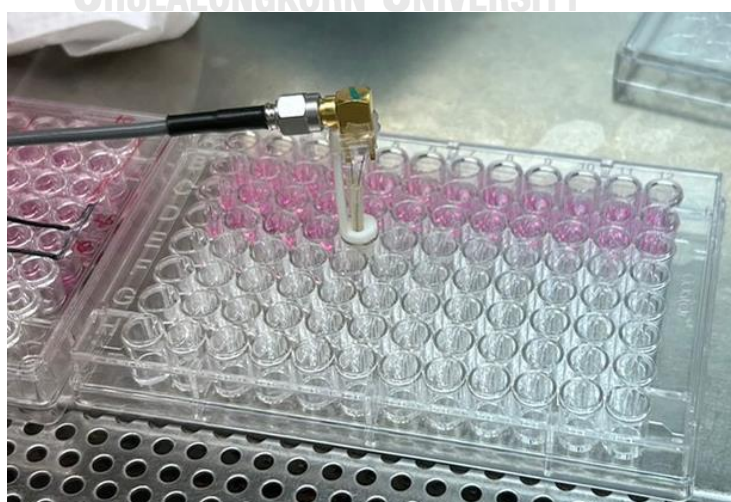


ภาพที่ 18 ชุดทดลอง MTT

3.6 การวัดค่าอิมพิแดนซ์

เริ่มการวัดโดยการทำความสะอาดหัวอิเล็กโทรดด้วยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ นำขึ้นมาซับ และทิ้งไว้ให้แห้งและอบแสงยูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการวัดค่าโดย อิเล็กโทรดจำนวน 5 ตัว ทำการเก็บค่าตัวละ 3 ครั้ง ในทั้ง 4 ความเข้มข้น นับจากวันที่ 1 โดยเก็บค่าทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เก็บค่าตั้งแต่ 0.01-10 MHz โดยเก็บค่าทุก 0.025 MHz รวมทั้งหมด 400 ค่าต่อการวัด 1 ครั้ง และเลือกพรอตกราฟแสดงค่าที่ 1.012 MHz เนื่องจากเป็นช่วงที่การกระจายตัวของข้อมูลค่อนข้างน้อย และทำการถ่ายรูปในแต่ละวันเพื่อเปรียบเทียบ

นำค่าที่ได้ในแต่ละวันมาหาค่าเฉลี่ยและหาค่าเฉลี่ยของอิเล็กโทรดแต่ละตัว เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของอิเล็กโทรด แต่ละตัวจากค่าควบคุม หรือหลุมทดลองที่มีเพียงสารเลี้ยงเซลล์แต่ไม่ได้ใส่เซลล์ลงไป



ภาพที่ 19 การทดลองวัดค่าอิมพิแดนซ์

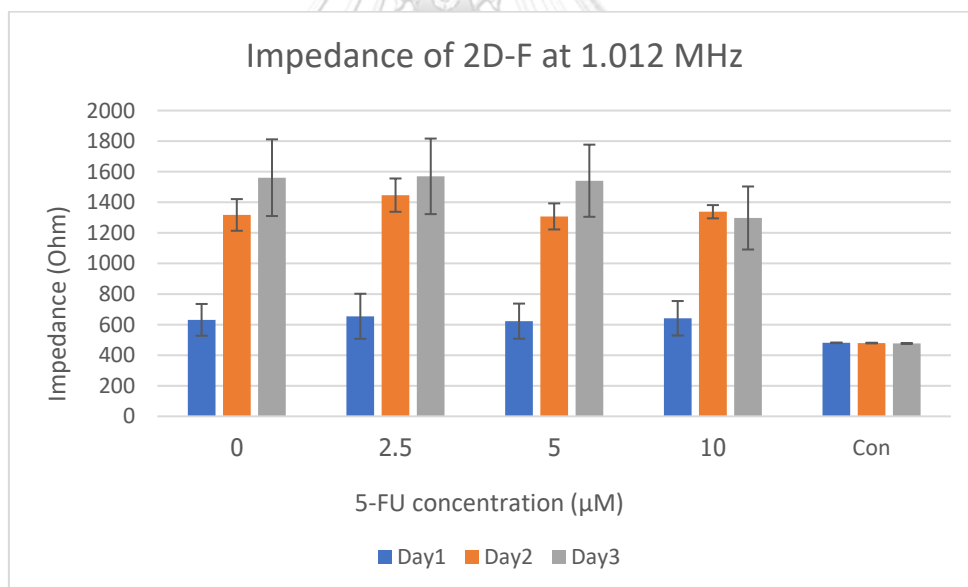
บทที่ 4

ผลการทดลอง

เนื้อหาบทนี้อธิบายการทดลองวัดค่าอิมพีแดนซ์แบบ 2 มิติ ทั้งในภาชนะชนิด Flat bottom และ Round bottom รวมถึงการทดลองแบบ 3 มิติ โดยในการเลี้ยงเซลล์แต่ละแบบนี้ยังมีการให้ยา 5-FU ในความเข้มข้นที่ต่างกัน ในช่วง 0-10 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 3 วัน โดยนำผลมาเปรียบเทียบกับ การวัด viability ด้วยวิธี MTT assay และทำซ้ำ 3 ครั้ง จะได้ผลลัพธ์แบ่งตามการทดลองดังนี้

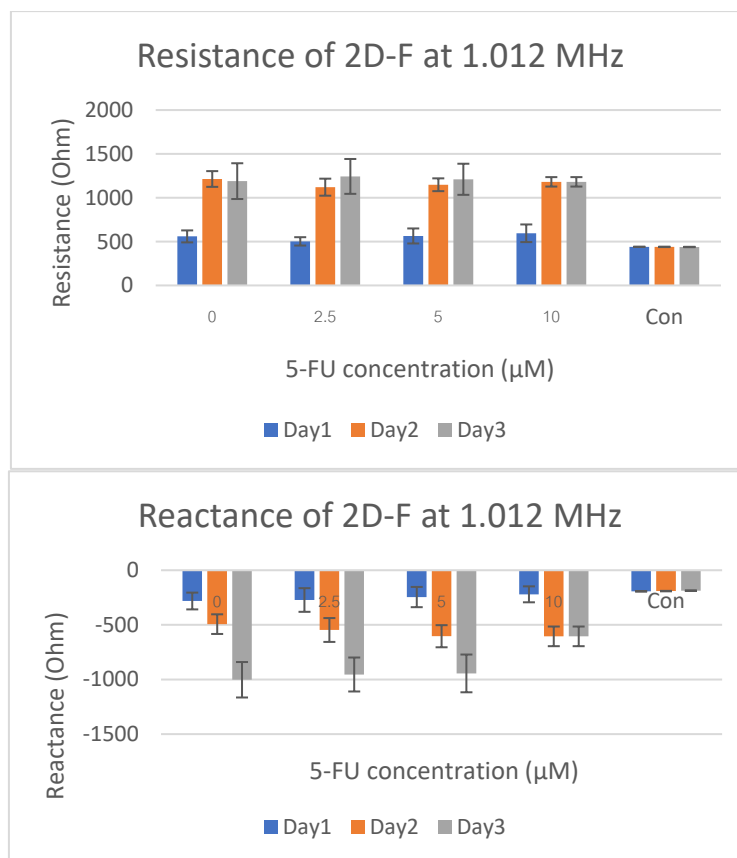
4.2 เซลล์สองมิติ ในภาวะเพาะเลี้ยงแบบ Flat Bottom

ค่าอิมพีแดนซ์ที่ได้จากการทดลองแบบ 2 มิติ ที่เพาะเลี้ยงในภาวะเพาะเซลล์แบบ Flat Bottom ในความถี่ 1.012 MHz แสดงให้เห็นว่าค่าอิมพีแดนซ์เฉลี่ยที่วัดได้มีค่ามากกว่าชุดควบคุมในทุกความเข้มข้นของยา 5-FU แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดสามารถวัดความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง และชุดควบคุมได้ ดังที่แสดงใน ภาพที่ 16 และ 17



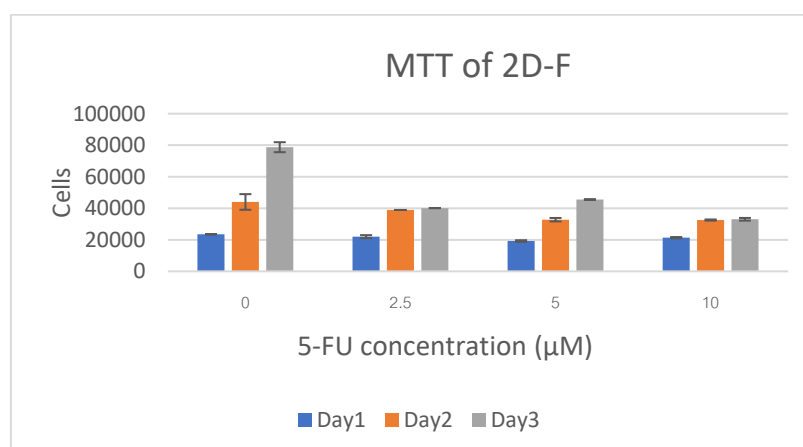
ภาพที่ 20 ค่าอิมพีแดนซ์ของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Flat bottom

เมื่อทำการพิจารณา ค่าความต้านทาน และ ค่าความต้านทานทางจินตภาพ ก็แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่าอิมพีแดนซ์ที่วัดได้ จะได้ผลดังภาพที่ 19



ภาพที่ 21 ความต้านและความต้านทานเชิงจินตภาพของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Flat bottom

รวมถึงเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากวิธี MTT assay จะแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องของจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอดกับสมบัติทางไฟฟ้า โดยเฉพาะค่าความต้านทานเชิงจินตภาพ ดังที่แสดงภาพที่ 17 และภาพที่ 18



ภาพที่ 22 จำนวนเซลล์ของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Flat bottom

เมื่อพิจารณาจากรูปถ่ายของชุดทดลองทั้ง 3 วัน ที่ได้แสดงในภาพที่ 19-22



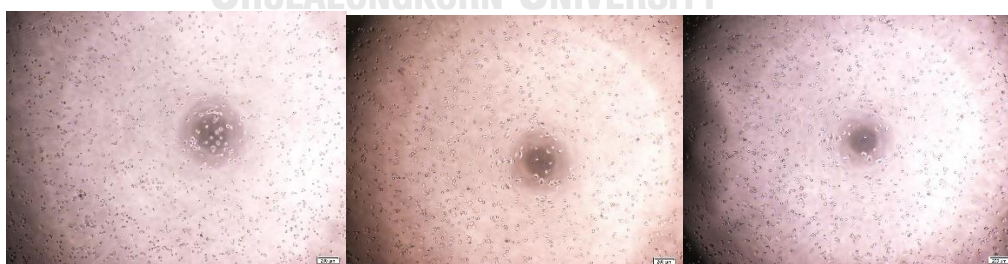
ภาพที่ 23 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 24 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 25 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

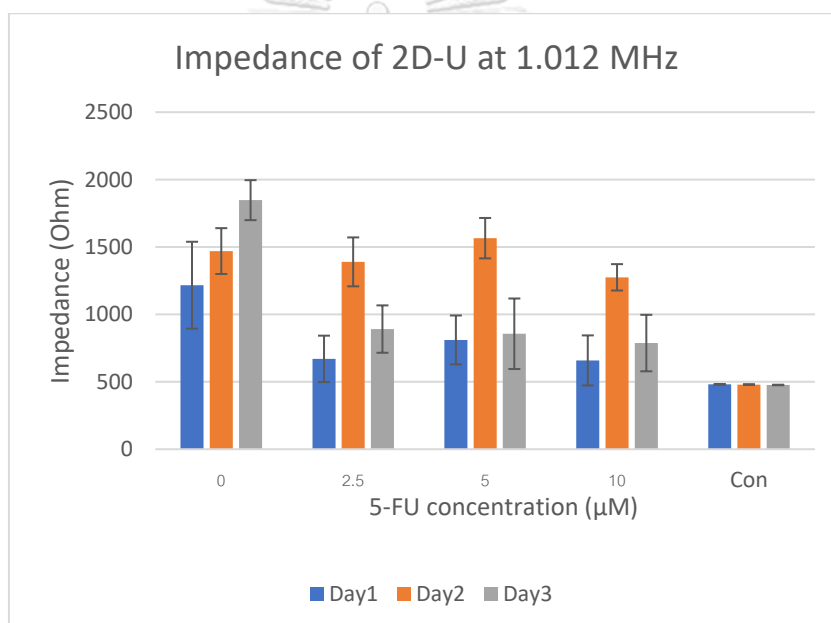


ภาพที่ 26 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่าการแยกความแตกต่างด้วยการถ่ายภาพนั้นทำได้ยากเนื่องจากภาพแต่ละภาพนั้นมีความใกล้เคียงกันอยู่มาก

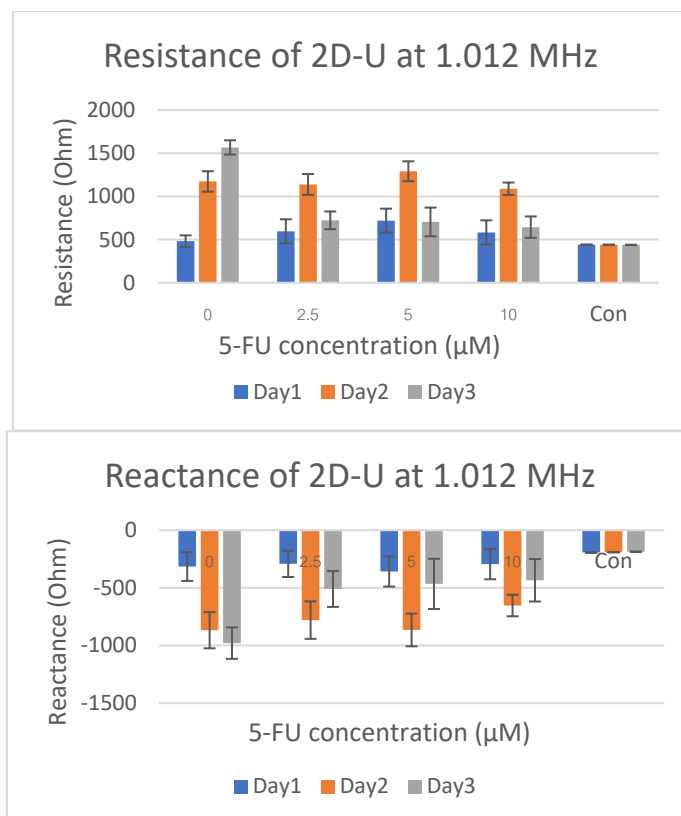
4.3 เซลล์สองมิติ ในสภาพเพาะเลี้ยงแบบ Round Bottom

การทดลองแบบ 2 มิติ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเซลล์แบบ Round Bottom นั้นทำขึ้นเนื่องจากในการทดลองแบบ 2 มิติ โดยทั่วไปนั้นจะทำในหลุมทดลองชนิด Flat bottom จากการที่มีหลุมทดลองที่ต่างชนิดกันและรูปทรงที่ต่างจากหลุมทดลองแบบ 3 มิติที่มักจะทำในหลุมทดลองแบบ Round bottom เพื่อหาว่ารูปทรงของหลุมทดลองนั้นมีผลต่อค่าอิมพีแดนซ์หรือไม่จึงทำการทดลองแบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ Round bottom ทำให้ได้ผลว่าค่าอิมพีแดนซ์ที่ได้ในความถี่ 1.012 MHz มีความใกล้เคียงกับการทดลองแบบ Flat bottom คืออิมพีแดนซ์เฉลี่ยที่วัดได้มีค่ามากกว่าชุดควบคุมในทุกความเข้มข้นของยา 5-FU แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดสามารถวัดความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมได้ ดังภาพที่ 23



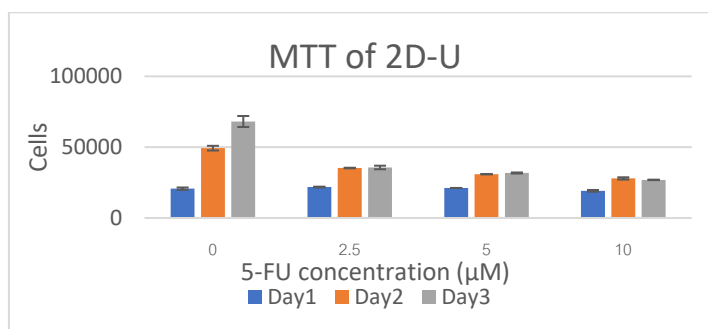
ภาพที่ 27 ค่าอิมพีแดนซ์ของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Round bottom

เมื่อทำการพิจารณา ค่าความต้านทาน และ ค่าความต้านทานทางจินตภาพ ก็แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่าอิมพีแดนซ์ที่วัดได้ จะได้ผลดังภาพที่ 24



ภาพที่ 28 ความต้านและความต้านทานเชิงจินตภาพของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Round bottom

รวมถึงเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากวิธี MTT assay จะแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องของจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอดกับสมบัติทางไฟฟ้า โดยเฉพาะค่าความต้านทานเชิงจินตภาพ แต่อาจมีค่าในวันที่ 2 ที่สูงกว่าที่คาดไว้ โดยอาจจะเกิดจากการที่อาหารเลี้ยงเซลล์มีการระเหย จนทำให้มีค่าอิมพีแดนซ์ของอากาศมากขึ้นจนทำให้ความต้านทานและความต้านทานเชิงจินตภาพมีค่าสูงขึ้นดังที่แสดงภาพที่ 24 และภาพที่ 25



ภาพที่ 29 จำนวนเซลล์ของชุดทดลอง 2 มิติ แบบ Round bottom

เมื่อพิจารณาจากรูปถ่ายของชุดทดลองทั้ง 3 วัน ที่ได้แสดงในภาพที่ 26-29



ภาพที่ 30 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Round bottom ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 31 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Round bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 32 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Round bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

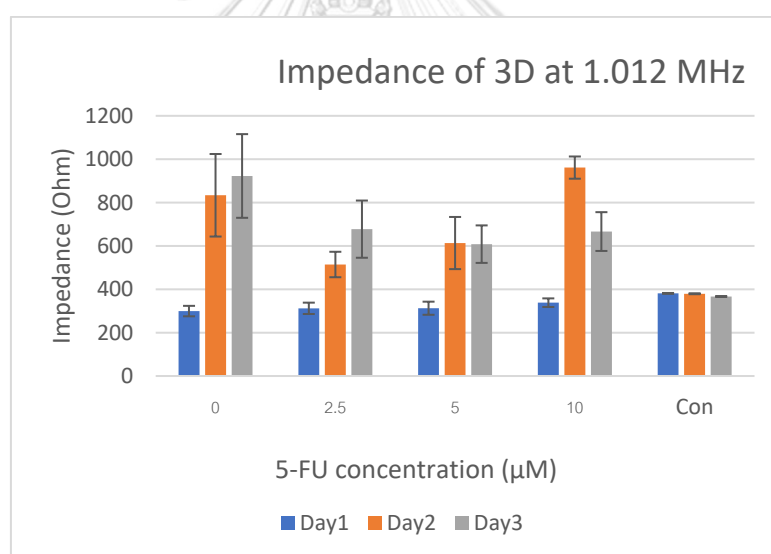


ภาพที่ 33 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ Round bottom ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าจะเห็นความแตกต่างได้ง่ายกว่าการทดลองใน Flat bottom แต่การแยกความแตกต่างด้วยการถ่ายภาพนั้นก็ยังทำได้ยากเนื่องจากภาพแต่ละภาพนั้นยังมีความใกล้เคียงกันอยู่

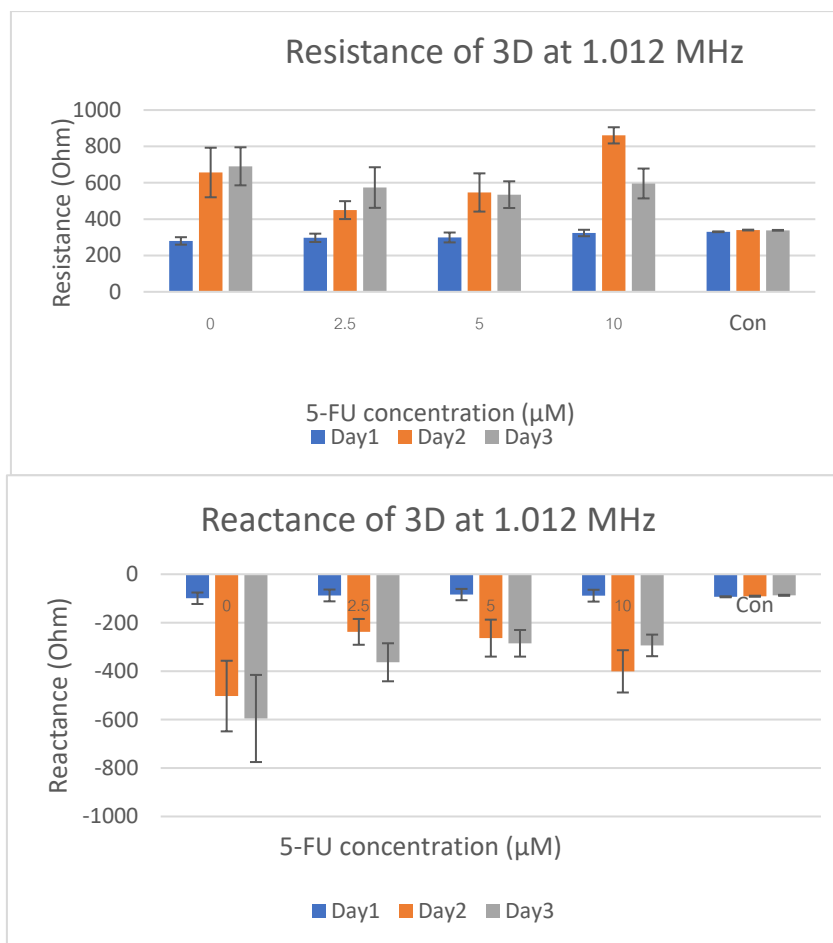
4.4 เซลล์สามมิติ

การทดลองแบบ 3 มิติ ที่มีขนาดสเฟียร์รอยอยู่ที่ 200-300 ไมครอน ค่าอิมพีแดนซ์ที่ได้ในความถี่ 1.012 MHz แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าอิมพีแดนซ์เฉลี่ยที่วัดได้มีค่ามากกว่าชุดควบคุมในทุกความเข้มข้นของยา 5-FU ในวันที่ 2 และ 3 แต่ในวันแรกนั้นจะได้ค่าที่มีความใกล้เคียงกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดสามารถวัดความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมได้เมื่อมีจำนวนเซลล์ที่มากพอและนอกจากนี้ในชุดทดลองแบบ 3 มิติ ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนที่สูงกว่าอีก 2 ชุดทดลอง ดังภาพที่ 30



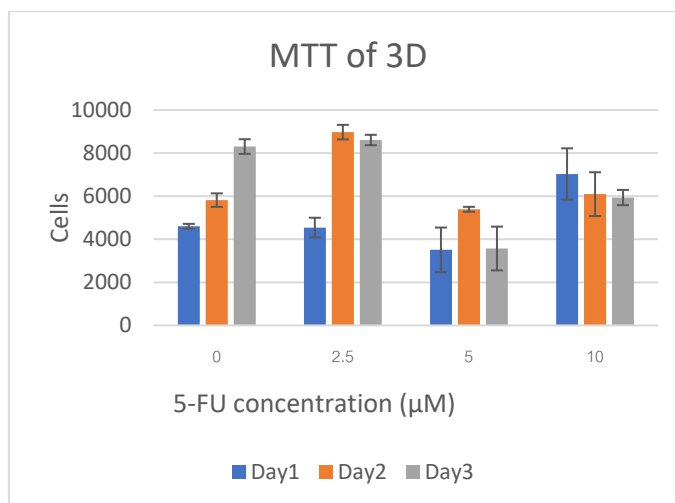
ภาพที่ 34 ค่าอิมพีแดนซ์ของชุดทดลอง 3 มิติ

เมื่อทำการพิจารณา ค่าความต้านทาน และ ค่าความต้านทานทางจินตภาพ ก็แสดงให้เห็นว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมในวันแรกเช่นเดียวกับกับค่าอิมพีแดนซ์ที่วัดได้ จะได้ผลดังภาพที่ 31



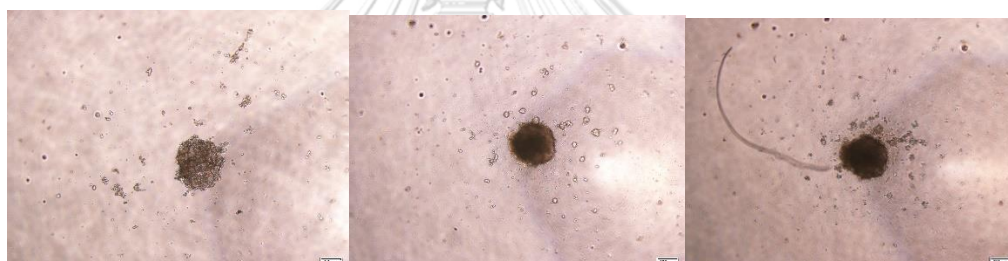
ภาพที่ 35 ความต้านและความต้านทานเชิงจินตภาพของชุดทดลอง 3 มิติ

เมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากวิธี MTT assay จากชุดทดลองแบบ 3 มิติ นั้นจะเห็นว่ามีความคลาดเคลื่อนกับสมบัติทางไฟฟ้าที่วัดได้มากที่สุดในทุกชุดทดลอง และค่า MTT ในวันแรกของชุดทดลองที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ นั้นยังมีค่าสูงกว่าชุดทดลองอื่นในวันเดียวกัน ดังที่แสดงภาพที่ 30-32



ภาพที่ 36 จำนวนเซลล์ของชุดทดลอง 3 มิติ

เมื่อพิจารณาจากรูปถ่ายของชุดทดลองทั้ง 3 วัน ที่ได้แสดงในภาพที่ 33-36



ภาพที่ 37 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในรูปทรง 3 มิติ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

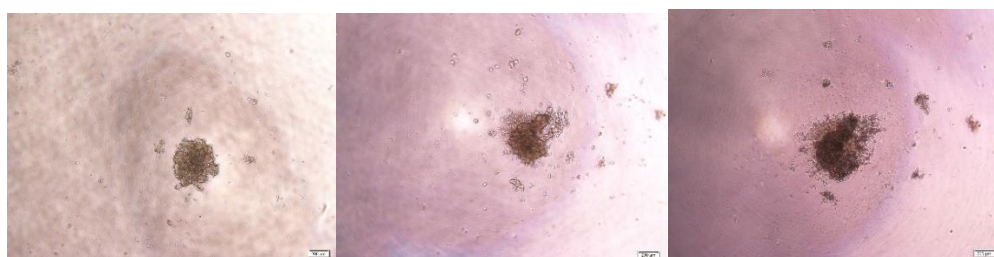
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 38 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ 3 มิติ ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 39 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ 3 มิติ ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ



ภาพที่ 40 เซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ในหลุมทดลองแบบ 3 มิติ ที่ได้รับยา 5-FU ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1-3 ตามลำดับ

ภาพในการทดลองแบบ 3 มิติ นั้นจะมองเห็นความแตกต่างได้ง่ายที่สุดในทุกการทดลอง ไม่ว่าจะเป็นขนาดของสเฟียร์ลอยที่แตกต่างกัน รูปทรงของสเฟียร์ลอยรวมถึงการแตกตัวออกจากกันของกลุ่มเซลล์

บทที่ 5

บทสรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองสรุปได้ว่า ชุดทดลองนั้นมีค่าเฉลี่ยของอิมพีแดนซ์สูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนั้นทั้งค่าเฉลี่ยของคาร์ชีสแทนซ์และค่าเฉลี่ยของคาร์แอคแทนซ์ในชุดทดลองยังมีค่าที่มากกว่าชุดควบคุม ซึ่งอาจจะสรุปได้ว่าอิเล็กโทรดนั้นสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชุดทดลองที่มีเซลล์และชุดควบคุมที่ไม่มีเซลล์ได้

ค่าที่ได้จากการวัดด้วยวิธี MTT assay ค่าที่วัดได้นั้นแสดงความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละวันได้ โดยค่าที่ได้จากการวัดนั้นแสดงให้เห็นว่าค่าในวันแรกของการทดลองที่เซลล์มะเร็งไม่ได้รับยา 5-FU นั้นจะมีค่าต่ำกว่าค่าในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองทำให้บอกได้ว่าจำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นจากวันแรกซึ่งตรงตามสมมุติฐานว่าเซลล์ในการทดลองจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นในทุกวันของการทดลอง แต่ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับยา 5-FU นั้นก็มีค่าในวันที่ 2 และวันที่ 3 มากกว่าค่าเฉลี่ยในวันแรกเช่นกัน แต่โดยเฉลี่ยแล้วมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่น้อยกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้รับยาในทุกความเข้มข้น ซึ่งอาจจะทำให้บอกได้ว่าความเข้มข้นของยาที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งนั้นลดลงได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งทั้งหมดหรือหยุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีความสอดคล้องกับรูปถ่ายที่บันทึกภาพเซลล์ในแต่ละวันที่แสดงให้เห็นว่า ยังมีเซลล์อยู่ในหลุมทดลองทุกหลุมทดลองในทั้ง 3 วันที่ได้ทำการทดลองเปลี่ยนยา 5-FU ในความเข้มข้นที่ได้ใส่ลงไปใน การทดลองครั้งนี้ไม่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งทั้งหมดได้ แต่ในการทดลองกลุ่มเซลล์ 3 มิติ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ นั้นรูปถ่ายแสดงให้เห็นว่ารูปทรงสเฟียร์รายนั้นมีกลุ่มเซลล์ที่ไม่สามารถรวมตัวเป็นทรงกลมที่สมบูรณ์เท่าชุดทดลองที่ไม่ได้รับยา 5-FU และค่าที่ได้นั้นก็มีความสอดคล้องกับสมบัติทางไฟฟ้าที่วัดได้จากการทดลองไม่ว่าจะเป็นค่าอิมพีแดนซ์ ริชีสแทนซ์ หรือรีแอคแทนซ์ โดยเฉพาะคาร์แอคแทนซ์ที่มีความสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่วัดได้จากวิธี MTT Assay ทำให้สามารถบอกได้ว่าอิเล็กโทรดนั้นสามารถบอกถึงจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันได้

จากการถ่ายรูปเก็บค่าในแต่ละวันนั้น แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแต่ละชุดทดลอง เช่น ในการทดลองแบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ Round bottom นั้นจะมีลักษณะของการเรียงตัวของเซลล์ในบริเวณกลางหลุมทดลองหนาแน่นกว่าบริเวณด้านข้าง ต่างกับแบบ 2 มิติ ในหลุมทดลองแบบ Flat bottom ที่จะมีการกระจายตัวของเซลล์ที่สม่ำเสมอทั่วหลุมทดลอง

แต่ค่าเฉลี่ยในการทดลองยังมีความคลาดเคลื่อนโดยเฉพาะในการทดลองแบบ 3 มิติ ที่มีความคลาดเคลื่อนมากที่สุดทั้งในการวัดอิมพีแดนซ์และการวัด MTT ซึ่งอาจเกิดจากการที่ก้อนสเฟียร์ลอยนั้นสามารถขยับได้ระหว่างการทดลองทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดอิมพีแดนซ์จากตำแหน่งที่ต่างกันของกลุ่มเซลล์ได้และนอกจากนี้ในการวัดค่า MTT นั้นลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เป็นสเฟียร์ลอยนั้นอาจทำให้กลุ่มเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับน้ำยาครบทุกเซลล์และในการทดลองการดูดน้ำยาออกจากหลุมทดลองนั้นสามารถทำได้ยาก จนอาจจะเหลืออาหารเลี้ยงเซลล์ น้ำยา MTT ตกค้างอยู่จนทำให้ค่าที่ได้ไม่ตรงกับจำนวนเซลล์จริง

นอกจากนั้นยังอาจจะมีสาเหตุอื่นที่มีผลต่อการทดลอง เช่น การที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระเหยแห้งไปทำให้มีอากาศเข้ามาในการวัดทำให้ค่าสมบัติทางไฟฟ้ามีค่าสูงขึ้นกว่าปกติ และการชำรุดเสียหายของอิเล็กทรอนิกส์ในการทดลองที่ทำให้มีจำนวนอิเล็กทรอนิกส์ที่น้อยลงในการทำการทดลองอาจทำให้ผลการทดลองนั้นคลาดเคลื่อนไปจากเดิมได้เช่นกัน ซึ่งทำให้ต้องทำการทดลองซ้ำหลายรอบเพื่อหาลดความคลาดเคลื่อนเหล่านี้อย่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ใช้การพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์ทดลองในบอร์ดแล้วเชื่อมปลายบอร์ดกับลวดที่ยาวเพียงแค่ส่วนที่ยื่นลงไปบนของเหลว เพื่อลดการเปลี่ยนช่วงของค่าอิมพีแดนซ์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ท่อซิลิโคน อากาศ ให้เหลือเพียงบอร์ดที่อิเล็กทรอนิกส์ยึดติดกับตัวอย่างทดลองเท่านั้น

2. ทำการ Calibration จนถึงปลายของหัวอิเล็กทรอนิกส์เพื่อเป็นการลดสัญญาณรบกวนจากภายในของระบบ เช่นความต้านทานของสายไฟ กาว และตะกั่วที่ใช้ในการเชื่อมยึดอิเล็กทรอนิกส์

3. เพิ่มความเข้มข้นของยา 5-FU จนถึงจุดที่สามารถทำให้เซลล์ตัวอย่างทดลองตายได้ทั้งหมด เพื่อแสดงผลว่าเซลล์ที่ตายมีผลต่อค่าอิมพีแดนซ์หรือไม่ โดยเปรียบเทียบ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์ กลุ่มทดลองที่มีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และกลุ่มที่เซลล์ทดลองตายหมดแล้ว

4. ทดลองด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากขึ้น เพื่อหาความแตกต่างที่ชัดเจนมากขึ้นจากกลุ่มควบคุม

บรรณานุกรม

- Arvelo, F., et al. (2015). "Biology of colorectal cancer." Ecancermedicalsecience 9: 520-520.
- Banfalvi, G. (2014). Cell Cultures. Homeostasis Tumor Metastasis. Hungary, Springer: 93-132.
- BAUMGARTNER, R. N. J. H. B. C. C. I. H. K. (1996). "Electrical impedance and total body electrical conductivity." 79-107.
- Bierwolf, J., et al. (2011). "Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research." 108(1): 141-150.
- Burdick, J. A. and G. J. T. E. P. A. Vunjak-Novakovic (2009). "Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation." 15(2): 205-219.
- Chen, J., et al. (2015). "Microfluidic Impedance Flow Cytometry Enabling High-Throughput Single-Cell Electrical Property Characterization." 16(5): 9804-9830.
- De Bruijn, K. M. J., et al. (2013). "Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer." British Journal of Surgery 100(11): 1421-1429.
- Deng, L., et al. (2012). "Diabetes Mellitus and the Incidence of Colorectal Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis." Digestive Diseases and Sciences 57(6): 1576-1585.
- Dupont, S., et al. (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." 474(7350): 179-183.

Duval, K., et al. (2017). "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture." Physiology 32(4): 266-277.

Edmondson, R., et al. (2014). "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors." ASSAY and Drug Development Technologies 12(4): 207-218.

Ellis, K. J. (2000). "Human Body Composition: In Vivo Methods." 80(2): 649-680.

Ferlay, J., et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." 136(5): E359-E386.

Fu, J., et al. (2010). "Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates." 7(9): 733-736.

Fuentes-Vélez, S., et al. (2021). "Impedance-based drug-resistance characterization of colon cancer cells through real-time cell culture monitoring." Talanta 222: 121441.

Hamidi, H., et al. (2017). "Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion." Bio-protocol 7(24): e2646.

Irifuku, R., et al. (2017). "Impedance-Based Living Cell Analysis for Clinical Diagnosis of Type I Allergy." Sensors 17(11).

Järvinen, P., et al. (2020). "Simultaneous Culturing of Cell Monolayers and Spheroids on a Single Microfluidic Device for Bridging the Gap between 2D and 3D Cell Assays in Drug Research." 30(19): 2000479.

Krinke, D., et al. (2009). "A microelectrode-based sensor for label-free in vitro detection of ischemic effects on cardiomyocytes." Biosensors and Bioelectronics 24(9): 2798-2803.

Manmuan, S. and P. J. J. o. A. P. S. Manmuan (2019). "Fucoxanthin enhances 5-FU chemotherapeutic efficacy in colorectal cancer cells by affecting MMP-9 invasive proteins." 9(12): 007-014.

Myungjin Lee, J., et al. (2013). "A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro." Laboratory Investigation 93(5): 528-542.

Nam, K.-H., et al. (2014). "Biomimetic 3D Tissue Models for Advanced High-Throughput Drug Screening." Journal of Laboratory Automation 20(3): 201-215.

No, A. N. (2017). "xCELLigence® Real-Time Cell Analyzers."

Noguchi, T., et al. (2017). "Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape." Cancer Immunology Research 5(2): 106.

Olejniczak-Kęder, A., et al. (2019). "Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines." Int J Oncol 55(1): 223-242.

Pampaloni, F., et al. (2007). "Most of the cell-based data-harvesting efforts that drive the integration of cell biology." 8(10): 839-845.

Research, N. I. o. H. O. o. M. A. o. (1994). Bioelectrical impedance analysis in body composition measurement: National Institutes of Health Technology Assessment

Conference Statement, December 12-14, 1994, NIH Office of Medical Applications of Research.

Scadden, D. T. (2006). "The stem-cell niche as an entity of action." Nature 441(7097): 1075-1079.

Sheng-Yi, H., et al. (2012). "Chemical-Free and Reusable Cellular Analysis: Electrochemical Impedance Spectroscopy with a Transparent ITO Culture Chip." International Journal of Technology and Human Interaction (IJTHI) 8(3): 1-9.

Srinivasaraghavan, V., et al. (2015). "Microelectrode bioimpedance analysis distinguishes basal and claudin-low subtypes of triple negative breast cancer cells." 17(4): 1-11.

Szaryńska, M., et al. (2017). "Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (Review)." Oncol Lett 14(6): 7653-7668.

Tatsanee Phermthai, S. W., Sasiprapa Tongbopit, Athisek Reaugpracha, (2020). "Human Amniotic Fluid Stem Cell In Vitro Inhibits Colon Cancer Cell Growth." Thai J Toxicol vol. 28.

Underhill, G. H. and S. N. Bhatia (2007). "High-throughput analysis of signals regulating stem cell fate and function." Current Opinion in Chemical Biology 11(4): 357-366.

W. Aruni A, P. R. (2011). Growth of Cell in Culture. Animal Tissue Culture India, MJp Publishers: 21-32.

Wang, L., et al. (2010). "Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip." Biosensors and Bioelectronics 25(5): 990-995.

Wu, Q., et al. (2018). "Bionic 3D spheroids biosensor chips for high-throughput and dynamic drug screening." Biomedical Microdevices 20(4): 82.

Xu, Y., et al. (2016). "A review of impedance measurements of whole cells." Biosensors and Bioelectronics 77: 824-836.

Yang, B., et al. (2010). "In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold." 5(4): 045003.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

วัน เดือน ปี เกิด

สถานที่เกิด

วุฒิการศึกษา

ที่อยู่ปัจจุบัน

21 สิงหาคม 2538

โรงพยาบาลหัวเฉียว กรุงเทพฯ

ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

144/188 หมู่บ้านนนทวัน แขวงท่าแร้ง เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10220



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY