

การประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์กับการตรวจสอบสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Application of impedance measurement to the examination of cell membrane
permeability



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Electrical Engineering

Department of Electrical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์กับการตรวจสอบสภาพให้ ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์
โดย	นายพัชรพล กังวาลโชคชัย
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ ธีรมงคลศรีศรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.นพดล นันทวงศ์)

.....
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พีชพล กังวาลโชคชัย : การประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์กับการตรวจสอบสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์. (Application of impedance measurement to the examination of cell membrane permeability) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาการตรวจสอบสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากอิเล็กโตรพอเรชัน ด้วยการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์อิมพีแดนซ์. วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อทดลองวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์โดยอาศัยระบบของไหลจุลภาคเพื่อควบคุมทิศทางของสนามไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าในการวัด และเพื่อประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์เพื่อตรวจสอบพฤติกรรมอิเล็กโตรพอเรชันของเซลล์. เซลล์ทั้งหมด 3 ชนิด ถูกใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ เซลล์ดอกอัญชัน, เซลล์มาโครฟาจ J774 และเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์. การวัดค่าอิมพีแดนซ์ใช้ความถี่อยู่ในช่วง 10 kHz ถึง 100 kHz. การประยุกต์ใช้ระบบของไหลจุลภาค ทำให้สามารถกระตุ้นให้เกิดอิเล็กโตรพอเรชัน ได้ด้วยแรงดันต่ำในช่วงตั้งแต่ 2 V_p ถึง 4 V_p. Corrected total cell fluorescence (CTCF) ถูกพิจารณาประกอบในการตรวจสอบสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการวัดอิมพีแดนซ์. เงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการทำอิเล็กโตรพอเรชันแบบชั่วคราวกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ คือ 2.5 V_p, ความถี่ 20 kHz และจำนวนลูกคลื่น 50 cycles (ทั้งหมด 15 ครั้ง) ซึ่งให้ประสิทธิภาพ 50%. การแยกความแตกต่างเซลล์ที่เกิดอิเล็กโตรพอเรชันแบบชั่วคราวและแบบถาวร กระทำโดยใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Yo-Pro-1 และ Propidium iodide (PI) ร่วมกัน. สภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถตรวจสอบได้ผ่านการวัดค่าความนำไฟฟ้า. ขนาดของการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถตรวจสอบได้ในเชิงปริมาณ จากความแตกต่างระหว่างค่าความนำไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด และกรณีหลังบ่อนฟิลส์ไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ (ΔG_c). การคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ตามเวลาไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยกรวัดค่าความนำไฟฟ้าในงานวิจัยนี้ เนื่องจากความนำไฟฟ้าของสารละลายมีค่าสูงขึ้นตามเวลา ซึ่งสวนทางกับค่าการเปลี่ยนแปลงความนำไฟฟ้าที่เกิดจากการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์. นอกจากนี้ แรงดันของพัลส์ที่สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายโดยถาวรได้. ทว่า เมื่อลดขนาดแรงดันไฟฟ้าหรือจำนวนลูกคลื่นลง การเกิดอิเล็กโตรพอเรชันจะไม่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน.

สาขาวิชา วิศวกรรมไฟฟ้า

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

617022221 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEYWORD: Electroporation, Impedance analysis, Microfluidics, Canine MCT cells, J774
macrophage cell, Butterfly pea cell, Dielectrophoretic force

Patcharapon Kangwarnchokchai : Application of impedance measurement to the examination of cell membrane permeability. Advisor: Prof. Boonchai Techaumnat, Ph.D.

This thesis studies the examination of cell-membrane permeability resulting from electroporation by the application of impedance analysis. The objective of the research is to measure impedance of cell by using a microfluidic system to control the direction of electric field and current in the measurement and to apply the impedance measurement to monitor the electroporation behavior of cell. Three types of cells, butterfly pea cells, J774 macrophage cell and Canine MCT cell, were used in this study. The impedance measurement used the frequency in the range of 10 kHz to 100 kHz. The application of microfluidics enabled the electroporation by small voltages ranging from 2 V_p to 4 V_p . The corrected total cell fluorescence (CTCF) was incorporated with the impedance measurement to determine the cell membrane permeability. The appropriate condition for temporary electroporation of canine MCT cell was 15 sets of 2.5 V_p , 20-kHz frequency, and 50 cycles. The condition yielded 50% efficiency. Temporary and permanent electroporation cells was discriminated by using a combination of Yo-Pro-1 and Propidium iodide (PI) fluorescent dyes. The examination of cell-membrane permeability by impedance measurement could be done through conductance measurement. The size of the membrane opening could be quantitatively examined based on the difference between the conductance in the absence of cell and that in the existence of cell after applying pulse to activate poration (ΔG_c). The cell-membrane recovery with time could not be examined by measuring the conductance due to the temporal increase of the suspending medium, which counteracted the conductance change by cell membrane recovery. In addition, a slight increase of pulse voltage could cause permanent cell-membrane breakdown. Whereas, electroporation could not be clearly observed with reducing the voltage or cycles.

Field of Study: Electrical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไข ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์. ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไชยะสูต รศ.น.สพ.ดร. ธีรวัฒน์ ธาราศานิต และนิสิตในสังกัด (คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่อนุเคราะห์ตัวอย่าง เซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์, ดร.นพดล นันทวงศ์ และนางชิตติมา มธุรส แดเนี่ยลส์ (ศูนย์เทคโนโลยี อิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ) ในการจัดทำชิ้นงานทดลอง และ Showa Denko สำหรับฟิล์ม ใสแสง. นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Kenji Mishima, Assist. Prof. Tanjina Sharmin, Assist. Prof. Taku Michael Aida และนิสิตในสังกัด จากมหาวิทยาลัยฟุกุโอกะ ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้การ สนับสนุนทั้งในด้านการทดลอง และการดูแลความเป็นอยู่เป็นอย่างดี. โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และสำนักงานการวิจัย แห่งชาติ (วช.).



พัชรพล กังวาลโชคชัย

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (Dielectrophoretic force).....	3
2.2 อิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation).....	5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอิเล็กโทรพอเรชันด้วยไฟฟ้าแรงดันต่ำ.....	7
2.4 อิมพีแดนซ์ของเซลล์.....	10
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ในระบบของไหลจุลภาค.....	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอิเล็กโทรพอเรชัน แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก และการวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์การทดลอง.....	20
3.1 ตัวอย่างเซลล์.....	20

3.1.1 เซลล์ดอกอัญชัน	20
3.1.2 เซลล์มาโครฟาจ.....	20
3.1.3 เซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์ (Canine MCT cell)	21
3.2 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์	22
3.2.1 ขั้นตอนการสร้างช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์.....	22
3.2.2 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์ชุดที่ 1	24
3.2.3 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์ชุดที่ 2	25
3.2.4 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์ชุดที่ 3	27
3.3 อุปกรณ์ภายนอกระบบช่องทางไหลจุลภาค.....	28
3.3.1 เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์.....	28
3.3.2 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า.....	29
3.3.3 กล้องจุลทรรศน์.....	29
3.3.4 ปุ่มกระบอกฉีดยา.....	30
บทที่ 4 การทดลอง.....	32
4.1 การทดลองการจับยึดเซลล์ด้วยแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก	32
4.2 การทดลองวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าแบบเซลล์เดี่ยว	33
4.3 การทดลองอิเล็กทรอนิกส์โพเรชันแบบเซลล์เดี่ยวด้วยแรงดันต่ำ	35
4.4 การหาประสิทธิภาพการทำอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม.....	37
4.5 การทดลองวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ก่อนและหลังอิเล็กทรอนิกส์.....	38
4.5.1 การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์.....	39
4.5.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์.....	39
บทที่ 5 ผลการศึกษาและอภิปรายผล.....	40
5.1 ผลการทำให้เซลล์ไม่เคลื่อนที่โดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก.....	40
5.2 ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าแบบเซลล์เดี่ยว	40

5.2.1 ผลการจำลองหาค่าความต้านทานไฟฟ้า	40
5.2.2 ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้า	43
5.3 ผลการทำอิเล็กทรอนิกส์แบบเซลล์เดี่ยวด้วยแรงดันต่ำ	45
5.4 ประสิทธิภาพการทำอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม.....	46
5.5 การวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ก่อนและหลังอิเล็กทรอนิกส์	48
5.5.1 การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์	49
5.5.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์	52
บทที่ 6 สรุป.....	55
ภาคผนวก.....	57
ภาคผนวก ก พิสูจน์ที่มาของตัวประกอบคลอเซียส-มอสซอตติของเซลล์สิ่งมีชีวิต	58
ภาคผนวก ข การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง.....	60
ภาคผนวก ค การเตรียมระบบของไหลจุลภาคเพื่อการทดลอง	63
ภาคผนวก ง การตั้งค่ากล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์สำหรับตรวจสอบสีย้อมที่แพร่เข้าสู่ เซลล์.....	64
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบของผลการทดลอง.....	65
บรรณานุกรม.....	75
ประวัติผู้เขียน.....	77

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) เป็นปรากฏการณ์การเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยการป้อนไฟฟ้าแรงดันสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ. อิเล็กโทรพอเรชันมี 2 แบบ คือ แบบถาวรและแบบชั่วคราว. อิเล็กโทรพอเรชันแบบถาวรใช้สำหรับกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ. อิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวใช้สำหรับเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อให้เราสามารถนำสารที่เป็นตัวยาบางชนิด สารพันธุกรรม (Deoxyribonucleic acid) หรือแบคทีเรียบางชนิด เข้าสู่เซลล์ได้ด้วยการแพร่โดยที่เซลล์ไม่เสียสภาพไปจากเดิม [1].

ของไหลจุลภาค (Microfluidics) นั้นเป็นนวัตกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบการจัดการของไหล ซึ่งในปัจจุบันเริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในหลากหลายศาสตร์สาขา เช่น วิศวกรรมชีวภาพ วิศวกรรมเคมี ชีววิทยา แพทยศาสตร์ กลศาสตร์ และเกษตรศาสตร์ เป็นต้น [2]. เทคโนโลยีของไหลจุลภาคมีลักษณะเด่นโดยทั่วไปคือ ช่วยลดขั้นตอนกระบวนการที่ย่างยากซับซ้อนและลดปริมาณการใช้สารเคมี ต้นทุนสูง. สำหรับด้านวิศวกรรมชีวภาพ งานบางชนิดจำเป็นต้องนำเทคโนโลยีของไหลจุลภาคเข้ามาช่วย เนื่องจากเมื่อดำเนินการในระดับมหภาคแล้วได้ผลผลิตที่ไม่มีประสิทธิภาพ.

การประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์กับเซลล์ เป็นตัวช่วยในการบ่งบอกชนิด รูปร่าง ขนาด และคุณลักษณะทางกายภาพของเซลล์ได้ในเชิงปริมาณ. จนถึงปัจจุบัน ได้มีการนำมาประยุกต์กับวิศวกรรมชีวภาพในระบบของไหลจุลภาคมาแล้วมากมาย ไม่ว่าจะเป็น การวัดค่าความจุไฟฟ้าจำเพาะของผนังเซลล์ [3] การนับและคัดแยกเซลล์กับอนุภาคพอลิเมอร์ [4] สำหรับตรวจจับและวิเคราะห์อนุภาคหรือแบคทีเรีย [5] การวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ติดเชื้อ [6] เป็นต้น.

การทำอิเล็กโทรพอเรชันโดยทั่วไปนั้นมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากการทำอิเล็กโทรพอเรชันโดยทั่วไปขนาดของเซลล์มีผลโดยตรงกับช่องเปิดที่เกิดขึ้น. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะได้รับแรงดันไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์มากเกินไป ทำให้เซลล์ถูกทำลาย. ในทางตรงกันข้าม หากเซลล์มีขนาดเล็กเกินไป แรงดันไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์น้อยจนไม่สามารถทำให้เกิดอิเล็กโทรพอเรชันได้. ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรพอเรชันจำนวนหลายเซลล์พร้อมกันและมีความหนาแน่นเซลล์สูง สนามไฟฟ้าจะเกิดการเลี้ยวเบนจากผลของเซลล์ข้างเคียง ซึ่งทำให้อัตราการเกิดอิเล็กโทรพอเรชันต่ำลง. อีกเหตุผลหนึ่งที่ยัง

บอกว่าการทำอิเล็กทรอนิกส์โดยทั่วไปไม่มีประสิทธิภาพคือ การทำขึ้นอยู่กับรูปทรงของเซลล์เป็นหลัก. การประมาณแรงดันไฟฟ้าที่ควรใช้ทำได้ยาก สำหรับเซลล์ที่มีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม. ด้วยเหตุที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ผู้วิจัยจึงได้นำเทคโนโลยีของไหลจุลภาคมาช่วยปรับปรุงแก้ไขการทำอิเล็กทรอนิกส์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น [7]. นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้นำการวัดอิมพีแดนซ์มาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจสอบการเกิดอิเล็กทรอนิกส์ เพื่อให้เราสามารถทราบสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง หลังได้รับพัลส์กระตุ้นให้เกิดการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ได้จากค่าของอิมพีแดนซ์.

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ทดลองวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์โดยอาศัยระบบของไหลจุลภาคเพื่อควบคุมทิศทางของสนามไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าในการวัด

1.2.2 ประยุกต์ใช้การวัดอิมพีแดนซ์เพื่อตรวจสอบพฤติกรรมอิเล็กทรอนิกส์ของเซลล์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาคุณสมบัติและการตรวจสอบสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์

1.3.2 การวัดอิมพีแดนซ์ทำกับเซลล์ที่อยู่นิ่ง

1.3.3 อาศัยรูปแบบของช่องทางไหลที่มีการรวมเส้นทางกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ผลการวัดมีความแม่นยำและไวต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มากขึ้น

1.3.4 เปิดช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยอิเล็กทรอนิกส์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถประเมินการเกิดช่องของเซลล์ได้ในเชิงปริมาณ ทราบลักษณะสมบัติของกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์ภายใต้เงื่อนไขทางไฟฟ้าต่างๆ และมีแนวทางในการควบคุมการเกิดช่องของเซลล์.

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก (Dielectrophoretic force)

แรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก คือ แรงที่กระทำต่ออนุภาคเมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าไม่สม่ำเสมอ. ขนาดของแรงที่กระทำต่ออนุภาคขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น คุณสมบัติทางไฟฟ้า ขนาด รูปทรง ของอนุภาค และความถี่ของสนามไฟฟ้าด้วยเช่นกัน. ผลจากสนามไฟฟ้าที่ไม่สม่ำเสมอทำให้อนุภาคมีการเคลื่อนตัวเข้าหาหรือออกจากบริเวณที่มีความเข้มของสนามไฟฟ้าสูง. เราเรียกปรากฏการณ์ที่อนุภาคมีการเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณที่มีความเข้มของสนามไฟฟ้าสูงว่า “ไดอิเล็กโตรโฟเรซิสชนิดบวก (Positive dielectrophoresis, pDEP)” และเรียก “ไดอิเล็กโตรโฟเรซิสชนิดลบ (Negative dielectrophoresis, nDEP)” ในกรณีที่อนุภาคเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม [8].

พิจารณากรณีของอนุภาคทรงกลมที่มีรัศมี a อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสตรง. เราได้สมการแรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก (\vec{F}_{DEP}) ที่กระทำต่ออนุภาค ดังนี้

$$\vec{F}_{\text{DEP}} = 2\pi\varepsilon_l a^3 K(\varepsilon_p, \varepsilon_l) \nabla E^2 \quad (2.1)$$

โดยที่ค่า K ซึ่งเป็นตัวประกอบคลอเซียส-มอสซอตติ (Clausius-Mossotti factor) คำนวณได้จากความสัมพันธ์

$$K(\varepsilon_p, \varepsilon_l) = \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_l}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_l} \quad (2.2)$$

เมื่อ ε_p และ ε_l คือ สภาพยอมของอนุภาค และสารละลายตัวกลาง ตามลำดับ.

พิจารณากรณีที่อนุภาคที่มีรัศมี a อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยกำลังสอง เราจะได้สมการแรงไดอิเล็กโตรโฟเรติกเฉลี่ยที่กระทำต่ออนุภาคซึ่งอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าไม่สม่ำเสมอ ดังนี้

$$\langle \vec{F}_{\text{DEP}} \rangle = 2\pi\varepsilon_l a^3 \text{Re}\{\mathbf{K}(\omega)\} \nabla E^2 \quad (2.3)$$

โดยที่ ω คือ ความถี่เชิงมุมของแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับ, ค่า \mathbf{K} หรือตัวประกอบคลอเซียส-มอสซอตติ ซึ่งเป็นจำนวนเชิงซ้อน หาได้จากสมการ

$$\mathbf{K}(\omega) = \frac{\epsilon_p - \epsilon_l}{\epsilon_p + 2\epsilon_l} \quad (2.4)$$

เมื่อ ϵ_p และ ϵ_l คือ สภาพยอมเชิงซ้อนของอนุภาค และสารละลายตัวกลาง ตามลำดับ. สภาพยอมเชิงซ้อนมีนิยามเป็น

$$\epsilon = \epsilon + \frac{\sigma}{j\omega} \quad (2.5)$$

เมื่อ σ คือ สภาพนำไฟฟ้า.

ในกรณีของเซลล์สิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ล้อมรอบ เราสามารถหาค่าของสภาพยอมสมมูล ϵ_{cell} ของเซลล์ได้จาก [9]

$$\epsilon_{cell} = C_m a \left[\frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \right] \quad (2.6)$$

เมื่อ C_m คือ ความจุไฟฟ้าต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์, ϵ_c และ σ_c คือ สภาพยอมและสภาพนำไฟฟ้าของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์, a คือ รัศมีของเซลล์,

$$\tau_c = \frac{\epsilon_c}{\sigma_c} \quad (2.7)$$

และ

$$\tau_m = \frac{C_m a}{\sigma_c} \quad (2.8)$$

จากสมการที่ (2.4) เมื่อแทน ϵ_p ด้วย ϵ_{cell} เราจะได้ตัวประกอบคโลเซียส-มอสซอตติ เป็น

$$\mathbf{K}(\omega) = -\frac{\omega^2(\tau_l\tau_m - \tau_c\tau'_m) + j\omega(\tau'_m - \tau_l - \tau_m) - 1}{\omega^2(\tau_c\tau'_m + 2\tau_l\tau_m) - j\omega(\tau'_m + 2\tau_l + \tau_m) - 2} \quad (2.9)$$

โดยที่

$$\tau_l = \frac{\epsilon_l}{\sigma_l} \quad (2.10)$$

และ

$$\tau'_m = \frac{C_m a}{\sigma_l} \quad (2.11)$$

เมื่อ σ_l คือ สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลางภายนอกเซลล์.

2.2 อิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

อิเล็กโทรพอเรชัน คือ การทำให้เกิดช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยไฟฟ้า โดยอาศัยการเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane breakdown). เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าจะเกิดการอัดประจุขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ก) และทำให้ความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าภายในและภายนอกเซลล์ (V_m) เกิดขึ้น จนสามารถทำให้เกิดช่องดังในรูปที่ 2.1 ข). การทำให้เกิดช่องของเซลล์สัมพันธ์กับระดับแรงดันไฟฟ้า V_b ที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เบรกดาวน์. V_m ที่มีค่ามากกว่าค่า V_b มากจะทำให้เซลล์เกิดการเบรกดาวน์ และไม่สามารถคืนกลับสภาพเดิมได้. โดยปกติแล้ว การทำให้เซลล์เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบคืนสภาพได้จะต้องมี V_m ที่ใกล้เคียงกับ V_b ประมาณ $\pm 15\%$ [10]. อิเล็กโทรพอเรชันแบบคืนสภาพได้อาศัยหลักการดังที่กล่าวมาข้างต้นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น การให้สารบางชนิดแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ หรือสารพันธุกรรม เป็นต้น. ดังนั้นปัจจัยหลักที่จำเป็นต้องควบคุมให้เหมาะสมคือ V_m ซึ่งสำหรับเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม ภายใต้สนามไฟฟ้า E_0 สามารถคำนวณได้จาก [11]

$$V_m = 1.5aE_0 \cos \theta [1 - \exp(-t / \tau_m)] \quad (2.12)$$

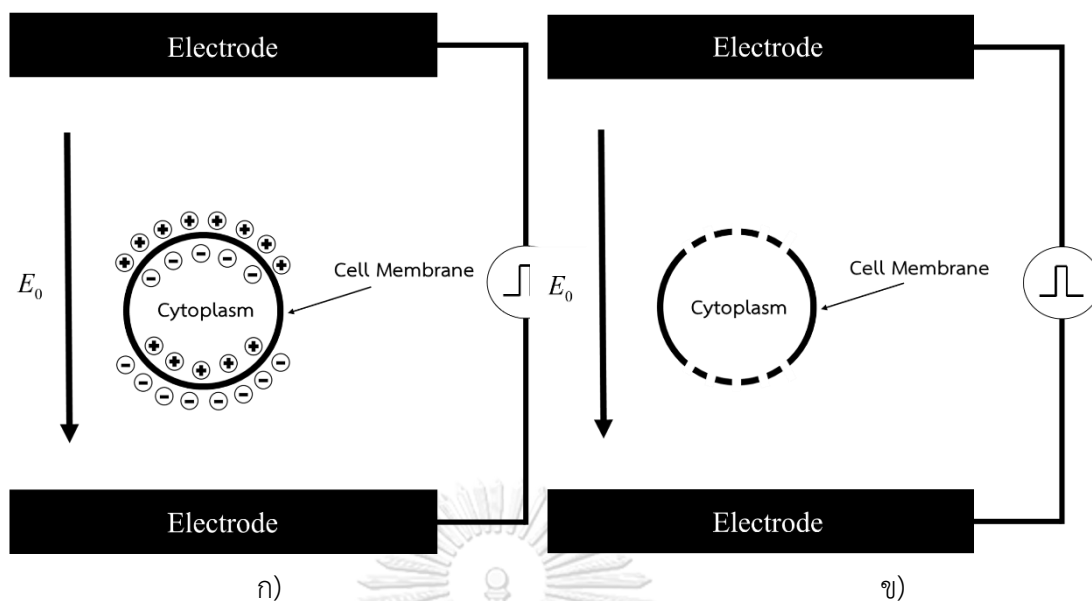
เมื่อ θ คือ มุมที่เกิดจากเวกเตอร์ของรัศมีของเซลล์ทำกับสนามไฟฟ้าในแนวแกน z ดังในรูปที่ 2.2, E_0 คือ สนามไฟฟ้าภายนอกที่เซลล์ได้รับ, t คือ เวลาที่ถูกการอัดประจุ, a คือ รัศมีของเซลล์ และ τ_m คือ ค่าคงที่ของเวลาในการอัดประจุเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งหาได้ดังนี้

$$\tau_m = aC_m \left(\frac{1}{\sigma_c} + \frac{1}{2\sigma_l} \right) \quad (2.13)$$

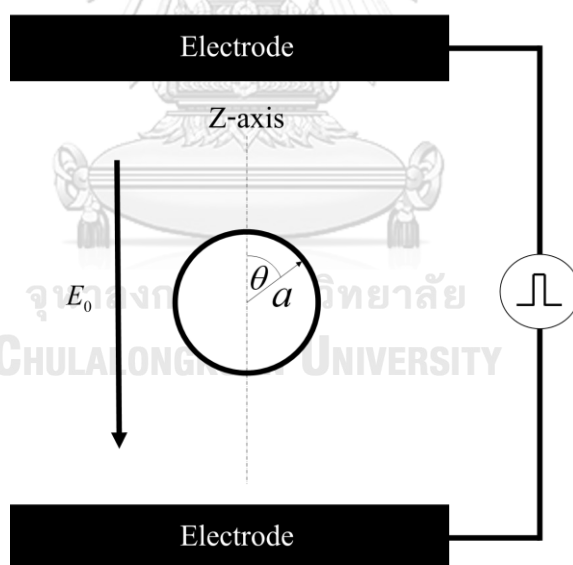
เมื่อ C_m คือ ความจุไฟฟ้าต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ และ σ_c กับ σ_l คือ สภาพนำไฟฟ้าภายในและภายนอกเซลล์ ตามลำดับ. เมื่อการอัดประจุเข้าสู่สภาวะคงตัว

$$V_m(\theta) = 1.5aE_0 \cos \theta \quad (2.14)$$

สมการที่ (2.12) และ (2.14) แสดงให้เห็นว่า ขนาดของเซลล์ที่ใช้มีผลต่อค่า V_m . ดังนั้นขนาดของเซลล์ที่นำมาใช้นั้นก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่จะต้องคำนึงสำหรับการป้อนแรงดัน V_m . นอกจากนี้ หากประชากรของเซลล์มีการกระจายของขนาดในช่วงกว้าง จะมีเซลล์ที่สามารถเกิดอิเล็กโทรพอเรชันด้วยแรงดันค่าหนึ่งๆ ได้เพียงจำนวนน้อย.



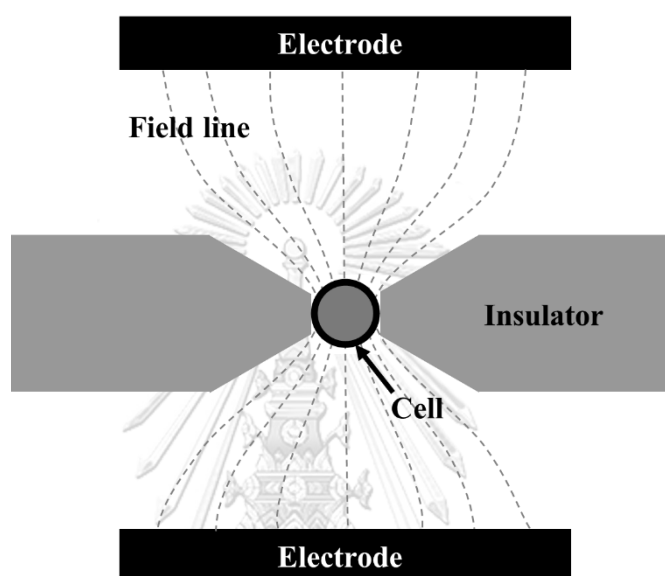
รูปที่ 2.1 การเกิดอิเล็กโตรพอเรชันของเซลล์. ก) ประจุมุมเสถียรบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อสนามไฟฟ้าไหลผ่าน. ข) ช่องบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เปิดออก.



รูปที่ 2.2 ลักษณะของมุมระหว่างเวกเตอร์ของรัศมีของเซลล์กับสนามไฟฟ้าในแนวแกน z.

วิธีการข้างต้นเป็นการทำอิเล็กโตรพอเรชันแบบทั่วไปซึ่งจะต้องใช้แรงดันไฟฟ้าของแหล่งกำเนิดไฟฟ้าที่ค่อนข้างสูง ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ และต้องคำนึงถึงขนาดของเซลล์ที่ใช้. ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกนำอุปกรณ์ที่มีลักษณะดังในรูปที่ 2.3 [12] มาใช้. จากรูป เราจะเห็นได้ว่ามีช่องแถบกันฉนวนขนาดเล็กอยู่ ซึ่งใช้สำหรับบีบสนามไฟฟ้าให้วิ่งผ่านเฉพาะบริเวณช่อง เพื่อให้เกิดสนามไฟฟ้าที่มี

ความเข้มสูงบริเวณช่องจับเซลล์. เมื่อเราได้สนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูง ทำให้แรงดันไฟฟ้าบริเวณช่องจับเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับความต่างศักย์ระหว่างอิเล็กโทรด ดังนั้นเราจึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงรูปร่างหรือขนาดของเซลล์ และสามารถใช้แรงดันไฟฟ้าของแหล่งจ่ายที่ต่ำลงได้. อุปกรณ์ดังกล่าวถูกออกแบบมาให้ทำอิเล็กโทรดโพเรชันในรูปแบบเซลล์เดี่ยว. ปัญหาของสนามไฟฟ้าที่เลี้ยวเบนจากเซลล์ข้างเคียงซึ่งกระทบต่อผลผลิตในการทำอิเล็กโทรดโพเรชันจึงหมดไปเช่นเดียวกัน.



รูปที่ 2.3 ลักษณะสนามไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในการทดลอง [12].

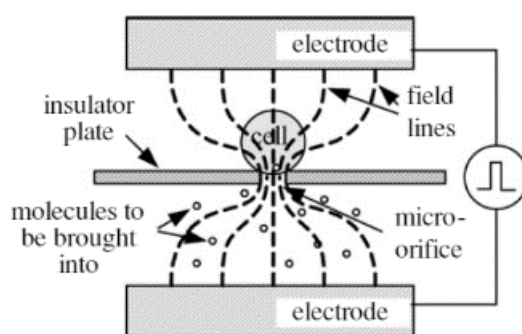
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอิเล็กโทรดโพเรชันด้วยไฟฟ้าแรงดันต่ำ

O. Kurosawa และคณะได้พัฒนาอุปกรณ์เพื่อให้สามารถทำอิเล็กโทรดโพเรชันที่แรงดันไฟฟ้าต่ำได้ [13]. อุปกรณ์ถูกพัฒนาให้สามารถบีบสนามไฟฟ้าผ่านช่องขนาดเล็ก เพื่อให้เกิดสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงเฉพาะบริเวณที่ช่องนั้น ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.4. เมื่อทำให้เกิดสนามไฟฟ้าความเข้มสูงที่บริเวณช่องขนาดเล็กได้ เราสามารถลดแรงดันไฟฟ้าลงได้เป็นอย่างมากในการทำให้เกิดอิเล็กโทรดโพเรชัน.

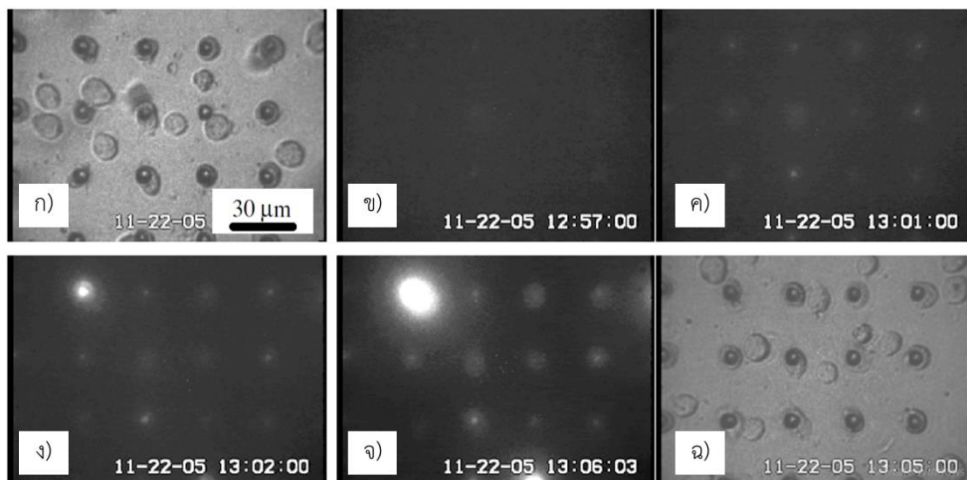
นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้นำอุปกรณ์ที่ได้ออกแบบมาทดสอบอิเล็กโทรดโพเรชัน. เซลล์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งโมโนไซต์ (Monocyte) U-937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดประมาณ $12\ \mu\text{m}$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ RPMI 1640 และเซลล์ไมโอไซต์ (Myocyte) จากหนูตะเภา. เซลล์ไมโอไซต์จากหนูตะเภา มีลักษณะไม่เป็นทรงกลมขนาดประมาณ $8 \times 20 \times 100\ \mu\text{m}^3$ ใช้กับสารละลายบัฟเฟอร์ Ca^{2+} -free (25 mM KCl, 70 mM glutamic acid, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM

taurine, 0.5 mM EGTA, 11 mM glucose, 10 mM HEPES, pH7.2) เพื่อหลีกเลี่ยงการเต้นที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติของไมโอไซต์. สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ใช้เป็นสีที่ติดกับสารพันธุกรรม YO-PRO-1 ซึ่งผสมลงในบัฟเฟอร์ 10 μ M ถูกป้อนเข้าไปบริเวณด้านล่าง ซึ่งดังแสดงในรูปที่ 2.4.

รูปที่ 2.5 เป็นการทดลองกับเซลล์มะเร็งโมโนไซต์ ซึ่งแสดงสภาพของเซลล์และสีย้อมที่เข้าสู่เซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป. ในเริ่มแรก คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบสภาพของเซลล์ก่อนป้อนพัลส์ในโหมดไบรท์ฟิลด์ ดังในรูปที่ 2.5 ก). ในการทดลองป้อนพัลส์ที่มีแรงดันไฟฟ้าขนาด 1.5 V เป็นเวลา 10 ms. การทดลองกับเซลล์โมโนไซต์ เมื่อได้ป้อนพัลส์แรกเข้าไป คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบสีย้อมที่เวลา 0.5 และ 4.5 นาที ดังในรูปที่ 2.5 ข) และ ค). เราจะเห็นได้ว่า ฟลูออเรสเซนต์เริ่มปรากฏให้เห็นเมื่อเวลาผ่านไป 4.5 นาที. จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ป้อนพัลส์ที่สองที่เวลา 5 นาที จะสังเกตได้ว่าฟลูออเรสเซนต์ชัดขึ้น ดังในรูปที่ 2.5 ง) และ จ). ผลที่ได้คือ เซลล์โมโนไซต์เกิดอิเล็กโทรพอเรชันทั้งหมด 100%. รูปที่ 2.5 ฉ) แสดงสภาพเซลล์ในโหมดไบรท์ฟิลด์หลังจากป้อนพัลส์ไปแล้ว 8.5 นาที

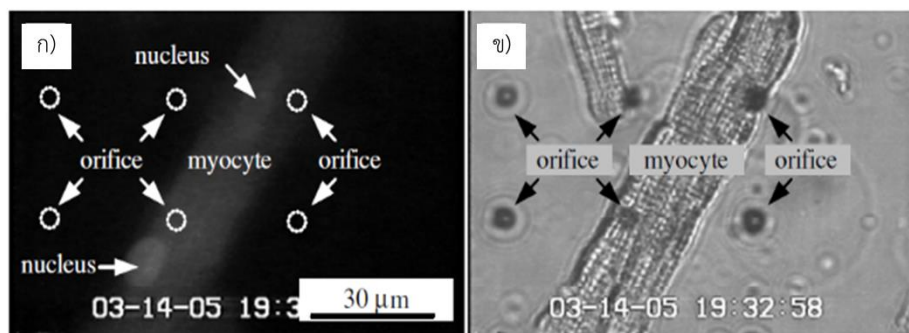


รูปที่ 2.4 ลักษณะของอุปกรณ์แบบที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ [13].



รูปที่ 2.5 การเกิดอิเล็กโตรพอเรชันของการแพร่สารฟลูออเรสเซนต์เข้าไปภายในเซลล์ไมโอไซต์ทรงกลม. ก) ภาพถ่ายสภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์. พัลส์แรกป้อนที่ $t = 0$ min. ข), ค) ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ที่ $t = 0.5$ และ 4.5 min. พัลส์ที่สองป้อนที่ $t = 5$ min. ง), จ) ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ที่ $t = 5.5$ และ 9.5 min. ฉ) ภาพถ่ายสภาพเซลล์ที่ $t = 8.5$ min [13].

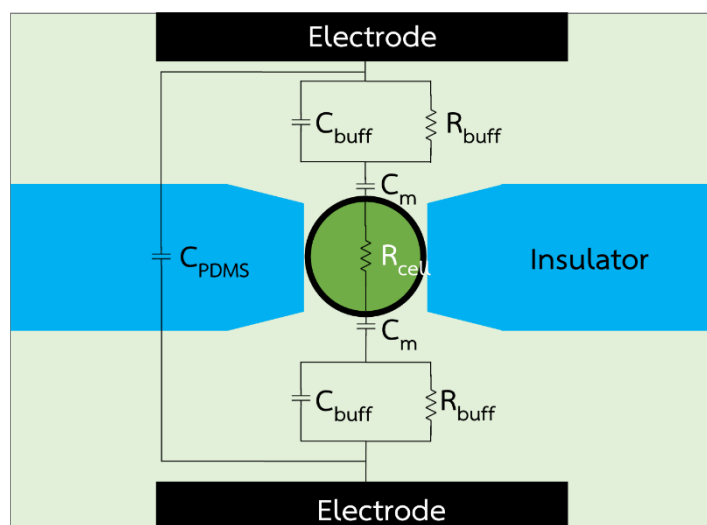
การทดลองกับเซลล์ไมโอไซต์ ได้ป้อนพัลส์ขนาด 1.5 V 10 ms ทั้งหมด 60 พัลส์. ในรูปที่ 2.6 ก) จะเห็นฟลูออเรสเซนต์ได้ชัดบริเวณที่มีนิวเคลียสซึ่งมีสารพันธุกรรมโครโมโซมอยู่ แต่บริเวณอื่นๆ เจือจางมาก. ฟลูออเรสเซนต์ส่วนอื่นๆ ทัวทั้งเซลล์นี้ เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีเป็นจำนวนมากในไมโอไซต์ หรืออาจจะเป็นเพราะการดูดซับสีฟลูออเรสเซนต์บนโครงสร้างอื่นๆ ภายในเซลล์. รูปที่ 2.6 ข) แสดงสภาพเซลล์ไมโอไซต์หลังป้อนพัลส์ในโหมดไบรท์ฟิลด์. คณะผู้วิจัยสรุปว่า การทำอิเล็กโตรพอเรชันในการทดลองนี้ให้ผลที่ดีเยี่ยม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์ไมโอไซต์ซึ่งมีรูปร่างเป็นทรงกลม.



รูปที่ 2.6 การเกิดอิเล็กโทรพอเรชันของการแพร่สารฟลูออเรสเซนต์เข้าไปภายในเซลล์ไมโอไซต์. ก) ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์หลังจากป้อนพัลส์ทั้งหมด 60 พัลส์. ข) ภาพถ่ายสภาพเซลล์หลังจากการป้อนพัลส์ [13].

2.4 อิมพีแดนซ์ของเซลล์

ในระบบของไหลจุลภาคที่ผู้วิจัยได้ศึกษาทดลอง ค่าอิมพีแดนซ์ที่วัดได้ประกอบไปด้วยอิมพีแดนซ์ของส่วนต่างๆ เช่น Polydimethylsiloxane (PDMS) สารละลายบัฟเฟอร์ และเซลล์ เป็นต้น. องค์ประกอบทั้งหมดนี้ต้องนำมาวิเคราะห์หาค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์. อิมพีแดนซ์ของเซลล์จะนำมาใช้ในการระบุสภาพและระยะเวลาของช่องที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ในเชิงปริมาณ. การวัดค่าด้วยเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ (Impedance analyzer) จะได้ผลการวัดออกมาเป็นอิมพีแดนซ์รวมของทั้งระบบ. งานวิจัยนี้ได้วางจรรยาบรรณมาใช้ ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.7 โดยแยกส่วนประกอบภายในระบบที่จะส่งผลต่อค่าที่ได้จากการวัดอิมพีแดนซ์มาจำลองในรูปแบบของวงจรมุมูล เพื่อให้สามารถคำนวณหาค่าอิมพีแดนซ์ขององค์ประกอบแบบเฉพาะเจาะจง ที่เกี่ยวข้องกับภายในระบบได้โดยง่าย. นอกจากนี้ การใช้จรรยาบรรณยังสามารถทำให้นำมาเทียบได้โดยตรงกับผลการจำลองค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์ภายในช่องทางไหลได้อีกด้วย.

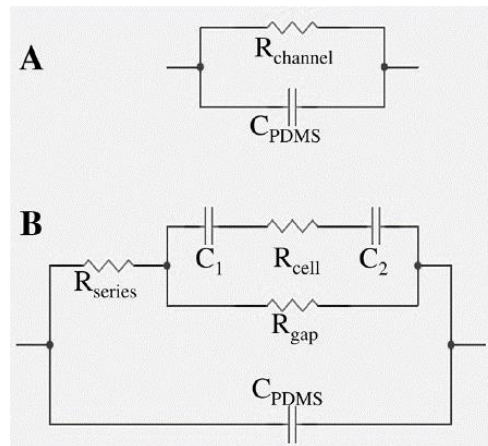


รูปที่ 2.7 วงจรสมมูลโดยประมาณของส่วนประกอบต่างๆ ขณะเซลล์อยู่ที่บริเวณช่องจับเซลล์.

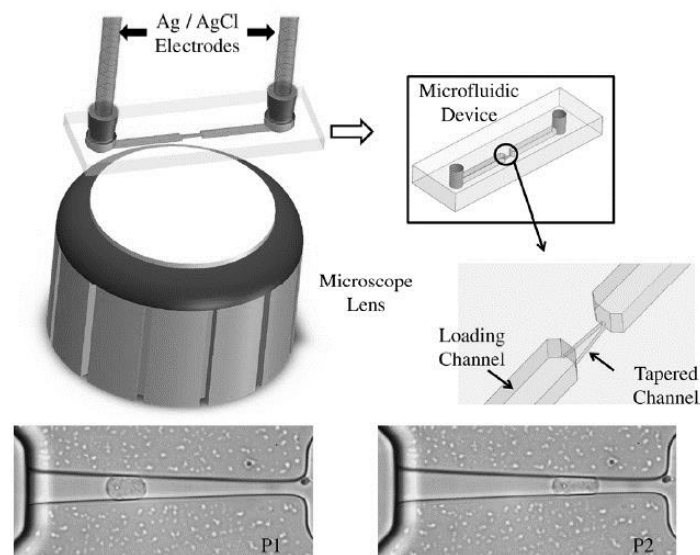
ในรูปที่ 2.7 R_{buff} คือ ความต้านทานไฟฟ้าของบัฟเฟอร์ในขอบเขตที่สนามไฟฟ้าผ่าน, R_{cell} คือ ความต้านทานไฟฟ้าของเซลล์, C_{buff} คือ ความจุไฟฟ้าของบัฟเฟอร์ในขอบเขตที่สนามไฟฟ้าผ่าน, C_m คือ ความจุไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ และ C_{pdms} คือ ความจุไฟฟ้าของ PDMS.

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ในระบบของไหลจุลภาค

Q. Tan และคณะได้พัฒนาอุปกรณ์ของไหลจุลภาคเพื่อใช้วัดอิมพีแดนซ์ของค่าความจุไฟฟ้าจำเพาะของผนังเซลล์ (Specific membrane capacitance, SMC) [3]. งานวิจัยนี้ใช้อิมพีแดนซ์สเปกโตรสโคปี (Impedance spectroscopy) ที่ความถี่ในช่วง 5 kHz ถึง 1 MHz. จากการทดลองทางคณะผู้วิจัยยืนยันความถูกต้องของค่าที่วัดได้กับค่าที่คำนวณได้จากวงจรสมมูล (Equivalent circuit) ที่แสดงดังในรูปที่ 2.8. คณะผู้วิจัยได้ทดลองวัดอิมพีแดนซ์และมุมเฟสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML2 และ NB4 และบ่อนเซลล์เข้าไปในช่องทางไหล ที่มีลักษณะดังในรูปที่ 2.9. ช่องทางไหลมีส่วนที่ใช้สำหรับโพลดเซลล์และช่องทางตีบเพื่อไว้ใช้สำหรับจับเซลล์. ส่วนคู่อิเล็กโทรดนั้นใช้แบบ Ag/AgCl ที่ต่อลงไปเป็นอุปกรณ์ของไหลจุลภาค. โดยปกติแล้วเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด NB4 มีศักยภาพในการแพร่กระจายตัวสูงกว่าชนิด AML2 ซึ่งทำให้คณะผู้วิจัยสนใจว่าค่า SMC มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันอย่างไรระหว่างเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้. จากผลการทดลอง คณะผู้วิจัยสามารถแยกแยะเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML2 และ NB4 ได้โดยใช้ค่า SMC ในการแยก. ค่า SMC ของเซลล์ NB4 นั้นมีค่าที่สูงกว่า AML2 ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุอาจเป็นเพราะลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ NB4 ความซับซ้อนมากกว่า.



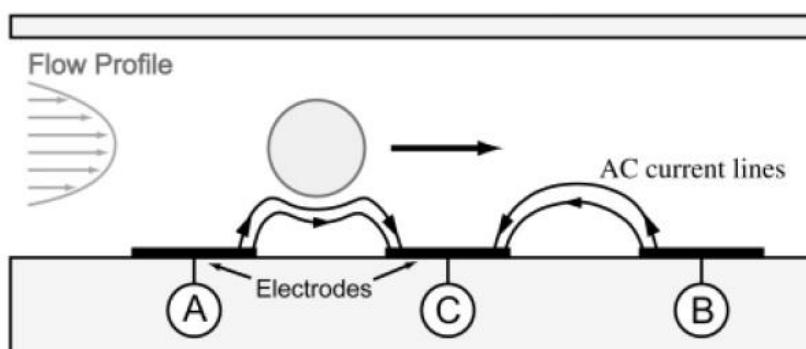
รูปที่ 2.8 วงจรสมมูลของการทดลองวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (A คือ วงจรช่องทางไหลเปล่า, B คือ วงจรขณะจับเซลล์ในช่องทางไหล) [3].



รูปที่ 2.9 รูปแบบของอิเล็กโทรดและช่องทางไหลสำหรับจับเซลล์ [3].

S. Gawad และคณะได้ศึกษาการนับและคัดแยกเซลล์กับอนุภาคพอลิเมอร์ด้วยการวัดอิมพีแดนซ์ [4]. การคัดแยกเซลล์ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่ชนิดของเซลล์ ส่วนการคัดแยกอนุภาคมุ่งเน้นไปที่ขนาด. เซลล์แต่ละชนิดมีอิมพีแดนซ์ที่แตกต่างกัน และขนาดของอนุภาคที่แตกต่างกันมีอิมพีแดนซ์ที่แตกต่างกันเช่นกัน. ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยคาดว่า การวัดอิมพีแดนซ์สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกชนิดและขนาดของเซลล์และอนุภาคได้. สัญญาณที่ใช้ในการวัดอิมพีแดนซ์เป็นไฟฟ้ากระแสสลับ โดยทดสอบที่ความถี่ 1.72 MHz และ 15 MHz. อนุภาคมีขนาด 5 μm และ 8 μm ถูก

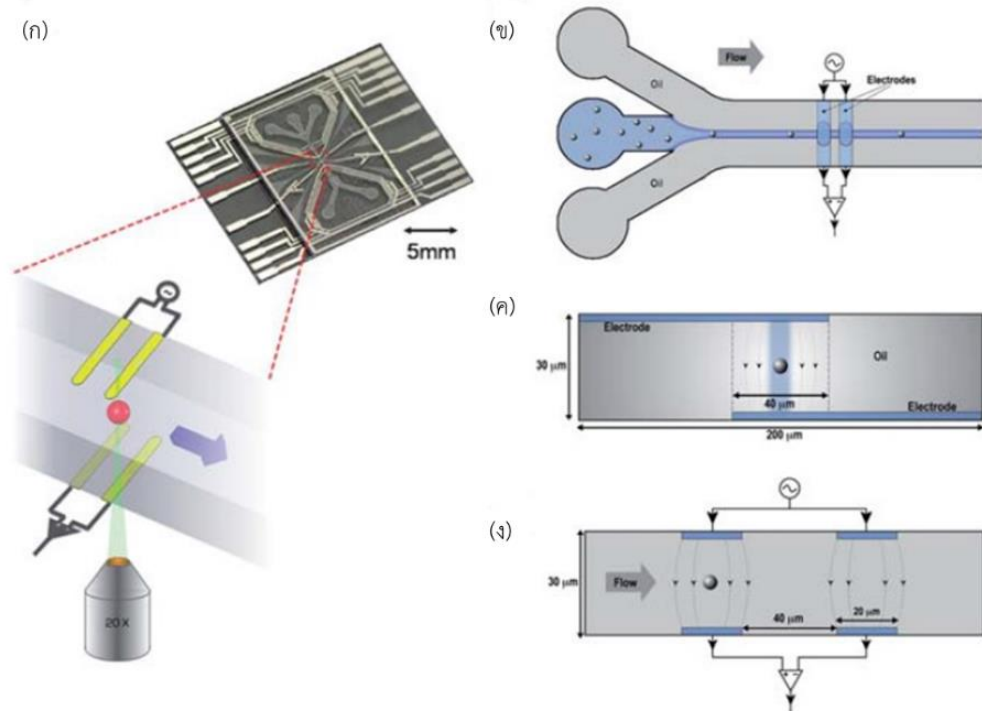
ใช้เพื่อแยกความแตกต่างของอนุภาคทั้ง 2 ขนาด และเซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติกับเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด ghost cell. อนุภาคและเซลล์ที่ใช้ถูกใส่ลงในสารละลาย PBS (Phosphate buffered saline). ในการทดลองกับอนุภาค คณะผู้วิจัยได้ผสมอนุภาคทั้ง 2 ขนาด 5 μm และ 8 μm ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ทั้งหมด 2,000 ตัวอย่าง. คณะผู้วิจัยป้อนอนุภาคให้ไหลเข้าไปในช่องทางไหล ซึ่งมีแผนภูมิเค้าร่างแสดงดังในรูปที่ 2.10. การทดลองกับเซลล์ผสมเซลล์ปกติและ ghost cell ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ทั้งหมด 2,000 ตัวอย่าง. การวัดอิมพีแดนซ์จะเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคอยู่ที่ตำแหน่งระหว่าง A กับ C และระหว่าง C กับ B ดังในรูปที่ 2.10 ซึ่งจะเกิดสัญญาณขณะเซลล์ผ่านขึ้น 2 จุด ทำให้สามารถคำนวณความเร็วของอนุภาคขณะไหลผ่านอิเล็กโทรด และในทำนองเดียวกันทำให้สามารถนับจำนวนตัวอย่างที่ผ่านอิเล็กโทรดได้ด้วย. คณะผู้วิจัยได้นำวิธีไฟไนต์เอลิเมนต์ (Finite Element) แบบ 3 มิติ มาใช้เพื่อเปรียบเทียบให้ทราบว่ารูปร่างของอิเล็กโทรดแต่ละแบบที่ต่างกัน มีอิทธิพลต่อเซลล์อย่างไร. การทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถคัดแยกชนิดของเซลล์ที่ต่างกัน และคัดแยกขนาดของอนุภาคที่มีขนาดแตกต่างกันได้ ซึ่งสามารถทำได้ในอัตราที่มากกว่า 100 ตัวอย่าง/วินาที.



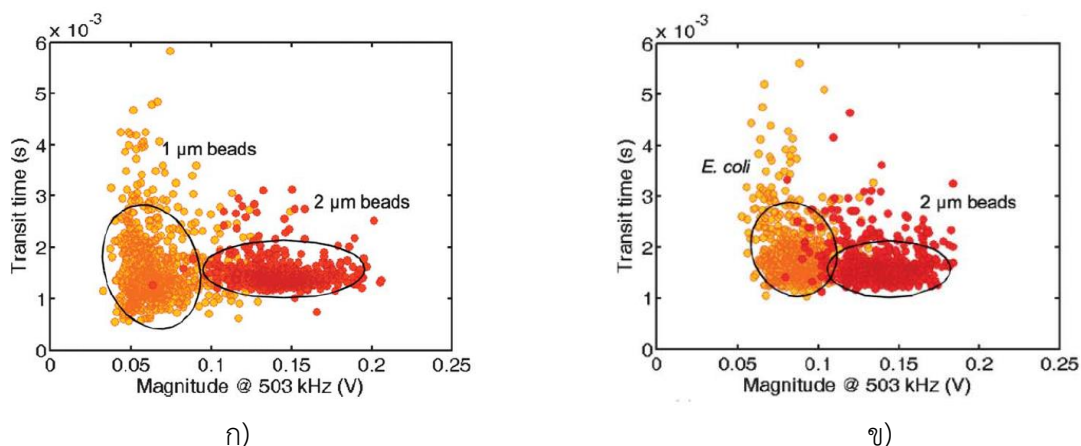
รูปที่ 2.10 ลักษณะการไหลของอนุภาคในช่องทางไหลและตำแหน่งของอิเล็กโทรด A B และ C สำหรับวัดอิมพีแดนซ์และนับเซลล์ [4].

C. Bernabini และคณะได้ศึกษาอิมพีแดนซ์ในระบบของไหลจุลภาคเพื่อใช้สำหรับตรวจจับและวิเคราะห์อนุภาคหรือแบคทีเรียในระดับไมโครเมตร [5]. งานวิจัยนี้ใช้น้ำมันฉนวนป้อนเข้าไปพร้อมกับสารละลาย PBS สภาพนำไฟฟ้า 1.6 S/m ที่มีอนุภาคอยู่ โดยให้อนุภาคอยู่กึ่งกลางช่องทางไหลที่มีความกว้าง 200 μm ลึก 30 μm . น้ำมันฉนวนใช้เพื่อควบคุมสนามไฟฟ้าให้ไหลผ่านบริเวณที่เป็นสารละลาย PBS แคบลง. คู่อิเล็กโทรดขนานอยู่บนด้านบนและล่างของช่องทางไหล ซึ่งมีลักษณะดังในรูปที่ 2.11 ก). รูปแบบการทดลองภายในช่องทางไหล ในมุมด้านบน ด้านข้าง และมุมตัดขวาง

แสดงดังในรูปที่ 2.11 ข) ถึง ง) ตามลำดับ. งานวิจัยนี้ได้วัดอิมพีแดนซ์ของอนุภาคที่มีขนาดแตกต่างกัน ($1\ \mu\text{m}$ และ $2\ \mu\text{m}$) ที่ความถี่ $503\ \text{kHz}$ ทำไปเพื่อนำไปใช้ในการคัดแยกระหว่างอนุภาคทั้ง 2 ขนาดได้. นอกจากนี้ยังมีการวัดความแตกต่างระหว่างอิมพีแดนซ์ของอนุภาคขนาด $2\ \mu\text{m}$ และ *E. coli*. ค่าอิมพีแดนซ์ที่ได้นั้นสามารถแยกความแตกต่างระหว่างอนุภาคทั้งสองขนาด และระหว่าง *E. coli* กับอนุภาคขนาด $2\ \mu\text{m}$ ได้อย่างชัดเจน ดังในรูปที่ 2.12 ก) และ ข) ตามลำดับ. การตรวจสอบความแม่นยำในการตรวจจับและระบุชนิดของอนุภาคทำโดยใช้ฟลูออเรสเซนซ์.



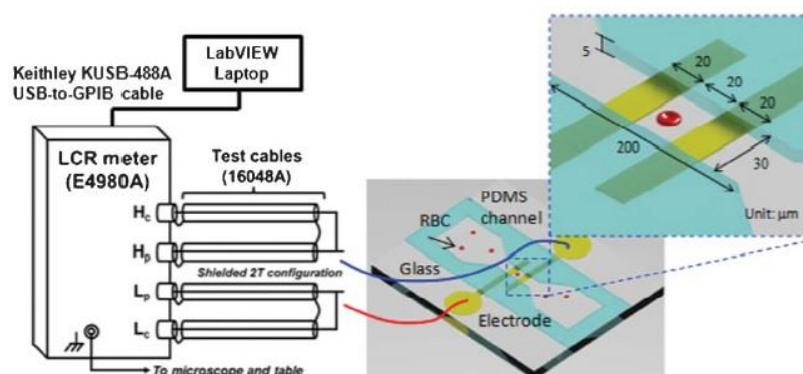
รูปที่ 2.11 แผนภาพรูปแบบหลักการทำงานภายในอุปกรณ์ของไหลจุลภาค [5]. ก) ตำแหน่งของอิเล็กโทรดด้านบนและด้านล่าง. ข) มุมมองด้านบน. ค) มุมมองด้านข้าง. ง) มุมตัดขวาง.



รูปที่ 2.12 ผลของการแยกความแตกต่างของค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์และอนุภาคที่ความถี่ 503 kHz.

ก) ระหว่างอนุภาคขนาด 1 μm และ 2 μm . ข) ระหว่างอนุภาคขนาด 2 μm และ *E. coli* [5].

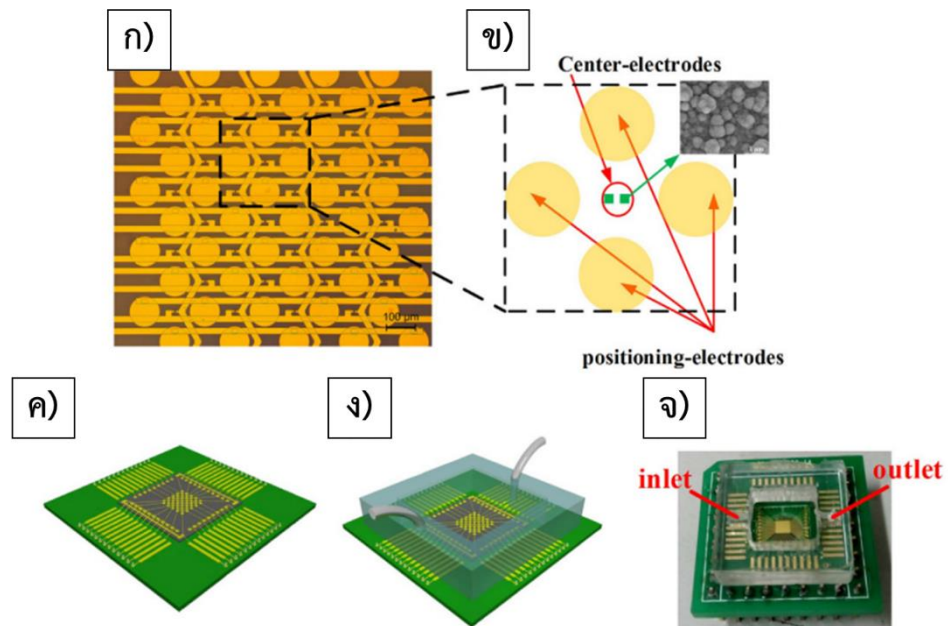
E. Du และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับอิมพีแดนซ์ของเซลล์ติดเชื้อปรสิตมาเลเรียที่มีคุณสมบัติของเซลล์แตกต่างกันไปในการติดเชื้อแต่ละระยะในระบบของไหล [6]. ระบบ EIMC (Electric impedance microflow cytometry) ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.13 ถูกใช้ในการตรวจวัดเซลล์ โดยมีช่องทางไหลที่มีความลึก 5 μm และกว้าง 30 μm . ในระบบ EIMC มีอิเล็กโทรดทั้งหมด 2 คู่ ใช้สำหรับวัดอิมพีแดนซ์ ซึ่งคู่หนึ่งเป็นกราวด์ส่วนอีกคู่หนึ่งเป็นส่วนที่ป้อนแรงดันไฟฟ้า. ในการป้อนเซลล์เข้าสู่ช่องทางไหลเพื่อวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ต้องให้เซลล์ที่ต้องการวัดมีตำแหน่งอยู่ระหว่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 คู่ ดังในรูปที่ 2.13. งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การใช้ขนาดและความต่างเฟสของอิมพีแดนซ์เพื่อแยกแยะเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาลาเรียแต่ละระยะ (เปรียบเทียบระหว่าง เซลล์ไม่ติดเชื้อ ระยะ Ring ระยะ Trophozoite และระยะ Schizont). มิเตอร์แอลซีอาร์ถูกใช้ในการวัดอิมพีแดนซ์ในช่องทางไหลจุลภาคซึ่งทำจากพอลิเมอร์ PDMS เนื่องจากติดกับกระจกได้โดยง่าย. สารละลายที่ใช้ในการลำเลียงเซลล์เข้าไปในช่องทางไหลคือ Phosphate Buffered Saline (PBS) เป็นหลัก ผสมกับ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0.2% 0.5% และ 1% เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีและความไวที่เหมาะสมในการวัดอิมพีแดนซ์. ความถี่ที่ใช้ในการวัดอิมพีแดนซ์เท่ากับ 2 MHz. ผลการวิจัยยืนยันได้ว่า การตรวจเชื่อนั้นไม่เป็นอันตรายต่อผู้ได้รับการตรวจและวิธีการตรวจสามารถเชื่อถือได้. นอกจากนี้ปริมาณ BSA ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.2 % ใน PBS ซึ่งทำให้ได้ความไวในการตรวจจับเพียงพอและทำให้เซลล์ไม่ติดบริเวณด้านในช่องทางไหล.



รูปที่ 2.13 ระบบการทดลอง EIMC สำหรับตรวจจับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตมาเลเรียในอุปกรณ์ของไหลจุลภาค [6].

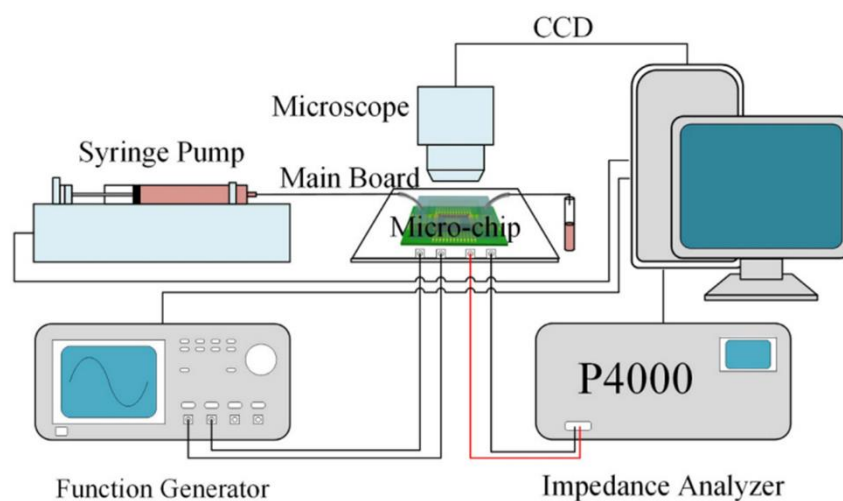
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์ แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก และการวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์

X. Guo และ R. Zhu ได้ออกแบบชิปไมโครอาร์เรย์แบบใหม่สำหรับการทำอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์และเลือกเซลล์แบบเรียลไทม์ รวมไปถึงการจัดวางตำแหน่งเซลล์และการวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ของเซลล์ HeLa [14]. คณะผู้วิจัยได้ออกแบบอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์ที่มีลักษณะเป็นแถวลำดับ (array) สำหรับทดลองกับเซลล์เป็นจำนวนมากพร้อมกัน ดังในรูปที่ 2.14 ก). ในแถวลำดับทั้งหมดจะมีอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์กลุ่มย่อยอยู่หลายชุด ซึ่งใช้สำหรับจัดวางตำแหน่งของเซลล์ และทำอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์. กลุ่มย่อยจะประกอบไปด้วย อิเล็กโตรดรอบนอก 4 ชั้น สำหรับวางตำแหน่งของเซลล์ด้วยแรง nDEP และอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์กึ่งกลาง 2 ชั้น สำหรับทำอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิวเซอร์และวัดอิมพีแดนซ์ ดังในรูปที่ 2.14 ข). ชิปปรับงานสำหรับทดลองเป็นแผ่น PCB. แบบจำลองแสดงดังในรูปที่ 2.14 ค) ซึ่งจะถูกรวมเข้ากับ PDMS ให้มีลักษณะเป็นหลุม เพื่อใช้สำหรับการกักสารละลายที่ผสมกับเซลล์ เมื่อถูกรวมแล้วจะมีลักษณะดังในรูปที่ 2.14 ง). รูปชิ้นงานจริงแสดงดังในรูปที่ 2.14 จ)



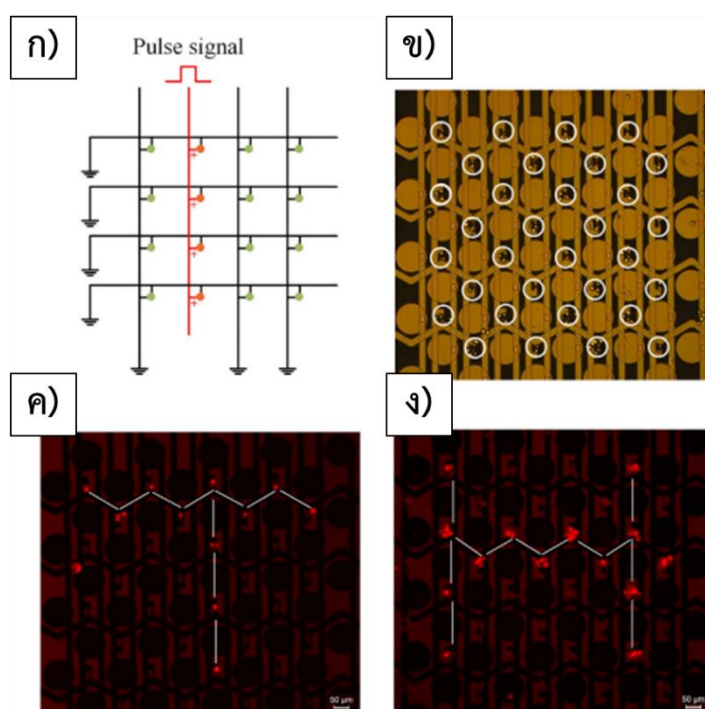
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของอุปกรณ์. ก) กลุ่มอาร์เรย์อิเล็กโทรด. ข) โครงสร้างของกลุ่มย่อยอิเล็กโทรด. ค) แบบชิปจำลองบน PCB. ง) แบบชิปจำลองที่ประกอบเข้ากับ PDMS. จ) ชิ้นงานจริง [14].

ระบบการทดลองประกอบด้วย ชิปสำหรับทดลอง, เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า, เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์, กล้องจุลทรรศน์, เครื่องควบคุมการป้อนสารละลาย และคอมพิวเตอร์สำหรับควบคุมเครื่องกำเนิดสัญญาณและเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์. อุปกรณ์ข้างต้นถูกติดตั้ง ดังในรูปที่ 2.15.



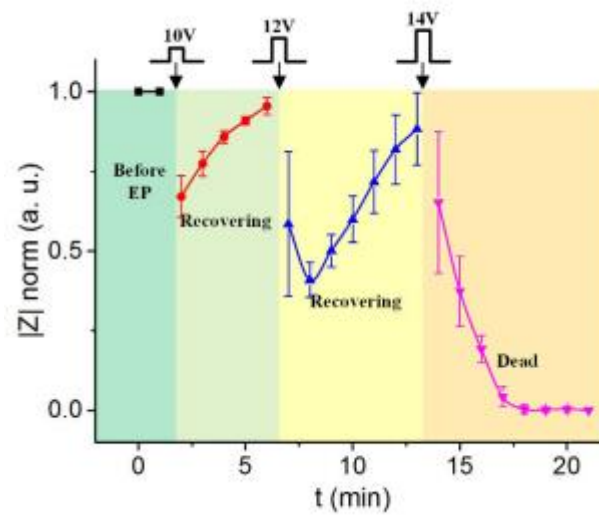
รูปที่ 2.15 ระบบการทดลอง [14].

ในการทดลอง คณะผู้วิจัยได้ป้อนสารละลายที่มีเซลล์ผสมอยู่ เข้าไปบนไมโครชิป และได้ทดลองจัดวางตำแหน่งของเซลล์ด้วยแรง nDEP ลงบนอาร์เรย์อิเล็กโทรดที่มีรูปแบบดังในรูปที่ 2.16 ข) ซึ่งรูปแบบวงจรของชิปเป็นดังในรูป 2.16 ก) ด้วยไฟฟ้ากระแสสลับที่แรงดัน $2.8 V_{pp}$ ความถี่ 2 MHz และความต่างเฟส 180° . คณะผู้วิจัยได้ทดลองทำอิเล็กโทรพอเรชันเป็นรูปแบบรูปแบบหนึ่ง ด้วยแรงดันไฟฟ้า 14 V ความกว้างลูกคลื่น $100 \mu s$ จำนวน 10 พัลส์ ที่คาบ 1 s. เราสามารถสังเกตเห็นผลการทำอิเล็กโทรพอเรชันได้จากสีย้อม PI ที่เข้าสู่เซลล์. ผลของเซลล์ที่มีสีย้อมเข้าไป เป็นไปตามรูปแบบที่คณะผู้วิจัยต้องการ ดังในรูปที่ 2.16 ค) และ ง).



รูปที่ 16 การควบคุมตำแหน่งเซลล์สำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชัน. ก) รูปแบบวงจรของชิป. ข) เซลล์ถูกวางลงบนกึ่งกลางอิเล็กโทรดแต่ละกลุ่มย่อย. ค) และ ง) การสาธิตการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบเลือกตำแหน่ง [14].

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ทดลองวัดอิมพีแดนซ์ที่ความถี่ 100 kHz เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชัน. ในการทดลอง คณะผู้วิจัยได้แบ่งการป้อนพัลส์ออกเป็น 3 ช่วง ที่แรงดันไฟฟ้า 10 V 12 V และ 14 V ซึ่งต่างจากการทดลองในรูปที่ 16 ที่ใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 14 V ค่าเดียว. ที่แต่ละแรงดันถูกป้อนด้วยความกว้างพัลส์เท่ากันที่ $100 \mu s$ จำนวน 10 พัลส์ คาบ 1 s. ผลการทดลองเป็นดังในรูปที่ 2.17.



รูปที่ 2.17 อิมพีแดนซ์ของเซลล์ HeLa ที่ความถี่ 100 kHz ก่อนและหลังการทำอิเล็กโตรพอเรชัน.

จากรูปที่ 2.17 จะเห็นได้ว่าเซลล์มีการคืนสภาพหลังการป้อนพัลส์ที่ 1 และ 2 ซึ่งสังเกตได้จากค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้นตามเวลา. หลังป้อนพัลส์ที่ 3 สังเกตได้ว่าเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายอย่างถาวรเนื่องจากค่าอิมพีแดนซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องตามเวลาโดยไม่มี的增加 [14].

บทที่ 3

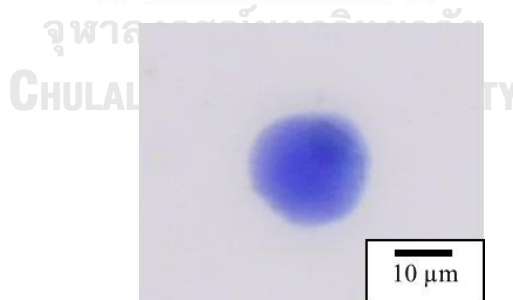
อุปกรณ์การทดลอง

3.1 ตัวอย่างเซลล์

3.1.1 เซลล์ดอกอัญชัน

เซลล์ของดอกอัญชันถูกเตรียมโดยการนำดอกอัญชันมาหั่นให้เป็นเศษฝอยขนาดเล็ก. เซลล์ถูกสกัดโดยการนำดอกที่หั่นได้ไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES นาน 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันอยู่หลุดออกจากกัน และย่อยผนังเซลล์ออก. สารละลายบัฟเฟอร์ MES ประกอบไปด้วย Cellulase R-10 (Yakult Pharmaceutical) 3% โดยมวล, Macerozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical) 0.5% โดยมวล, CaCl_2 0.055%, Mannitol 400 mM และ MES 10 mM. pH ของสารละลายปรับโดยใช้ KOH และ HCl ให้เป็น 5.6. หลังจากครบ 4 ชั่วโมง ผู้วิจัยกรองบัฟเฟอร์และโพรโทพลาสต์ที่แช่ให้เหลือเพียงโพรโทพลาสต์ของดอกอัญชันที่มีขนาดน้อยกว่า $25 \mu\text{m}$ ภายใต้บัฟเฟอร์ MES. ลักษณะของเซลล์ที่ได้เป็นดังในรูปที่ 3.1. จากนั้น ผู้วิจัยนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 rpm และเปลี่ยนถ่ายเป็นสารละลายสำหรับทดลอง.

สารละลายสำหรับทดลองกับเซลล์ดอกอัญชันประกอบไปด้วย Mannitol 400 mM และ CaCl_2 0.0276%. pH และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายปรับโดยใช้ KOH และ HCl ให้เป็น 5.6 และ 0.05 S/m ตามลำดับ.



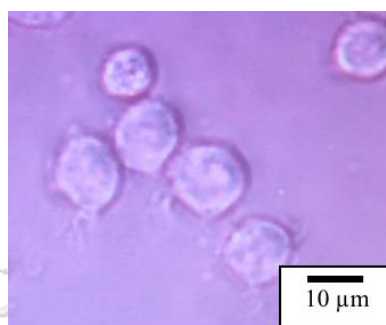
รูปที่ 3.1 ลักษณะของโพรโทพลาสต์ดอกอัญชัน.

3.1.2 เซลล์มาโครฟาจ

เซลล์ไลน์มาโครฟาจ J774 ที่มีขนาดประมาณ $10 \mu\text{m}$ ถูกเลี้ยงภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 โดยมีส่วนประกอบย่อยอื่นเป็น Fetal Bovine Serum 10% และ Penicillin-streptomycin mixed solution (Gibco) 1%. ลักษณะของเซลล์เป็นดังในรูปที่ 3.2. หลังจากเซลล์ขยายจำนวนจน

ได้ตามที่ต้องการ เซลล์จะถูกเปลี่ยนถ่ายมาผสมกับสารละลายสำหรับทดลองให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 1.5×10^6 cells/ml.

สารละลายสำหรับการทดลองกับเซลล์มาโครฟาจประกอบไปด้วย Glucose 11.11 mM และ Sucrose 150 mM โดยมีการเพิ่ม PBS สำหรับปรับสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายไปที่ 0.05 S/m.



รูปที่ 3.2 ลักษณะของเซลล์มาโครฟาจ 774.

3.1.3 เซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์ (Canine MCT cell)

เซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์พันธุ์ LUMC มีขนาดประมาณ 13-15 μm . เซลล์มีลักษณะดังในรูปที่ 3.3. เซลล์ถูกเลี้ยงภายใต้สารละลายกลูโคสความเข้มข้นสูง Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) โดยมีส่วนประกอบย่อยอื่นเป็น Fetal Bovine Serum (Gibco) 10%, GlutaMAX™ (Gibco) 1% และ Antibiotic-Antimycotic (Gibco) 1%. หลังจากเซลล์ขยายจำนวนจนได้ตามที่ต้องการ เซลล์จะถูกเปลี่ยนถ่ายมาผสมกับสารละลายสำหรับทดลองให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^6 cells/ml. ทางคณะสัตวแพทย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นผู้ให้ความอนุเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.



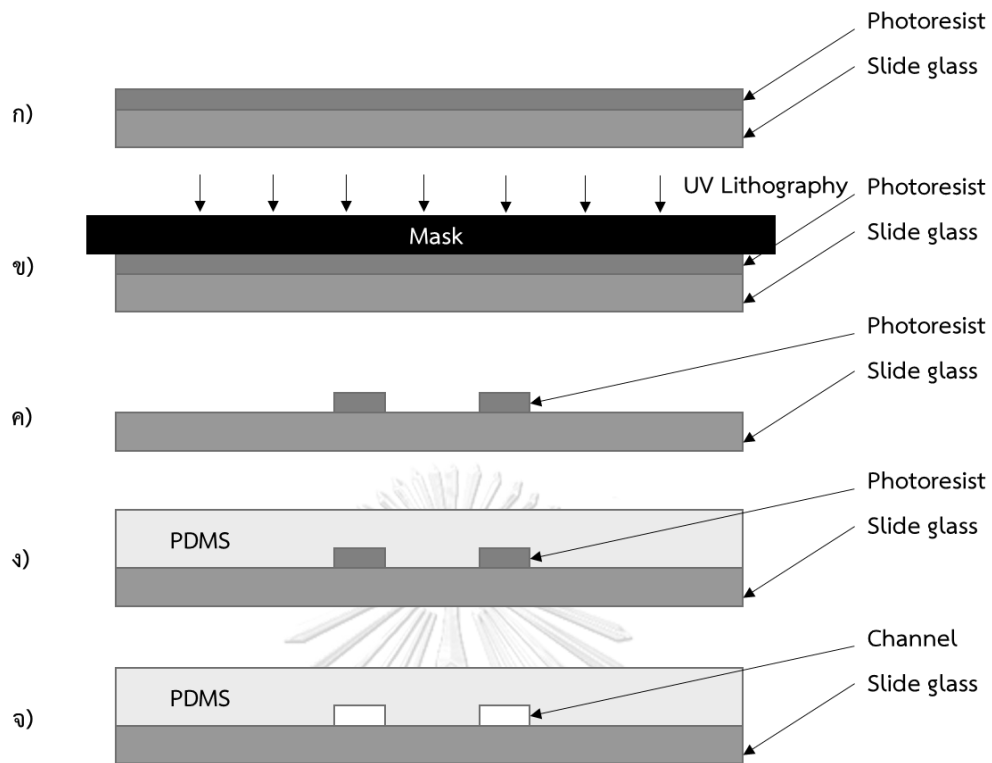
รูปที่ 3.3 ลักษณะของเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์พันธุ์ LUMC.

สารละลายสำหรับทดลองกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ประกอบด้วยกลูโคส 150 หรือ 200 mM โดยมี Bovine Serum Albumin 0.5%, ลีอ้อมฟลูออเรสเซนต์ Yo-Pro (Invitrogen) 1 μ M หรือ 2 μ M สำหรับย้อมนิวเคลียสของเซลล์ และ Phosphate Buffered Saline สำหรับปรับสภาพนำไฟฟ้าไปที่ 0.05 S/m. ในการทดลองที่ต้องการตรวจสอบความเสียหายของเซลล์เนื่องจากพัลส์ไฟฟ้า ผู้วิจัยผสม Propidium iodide (PI, Invitrogen) 3 μ M ลงไปด้วย สำหรับระบุเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายอย่างถาวร.

3.2 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์

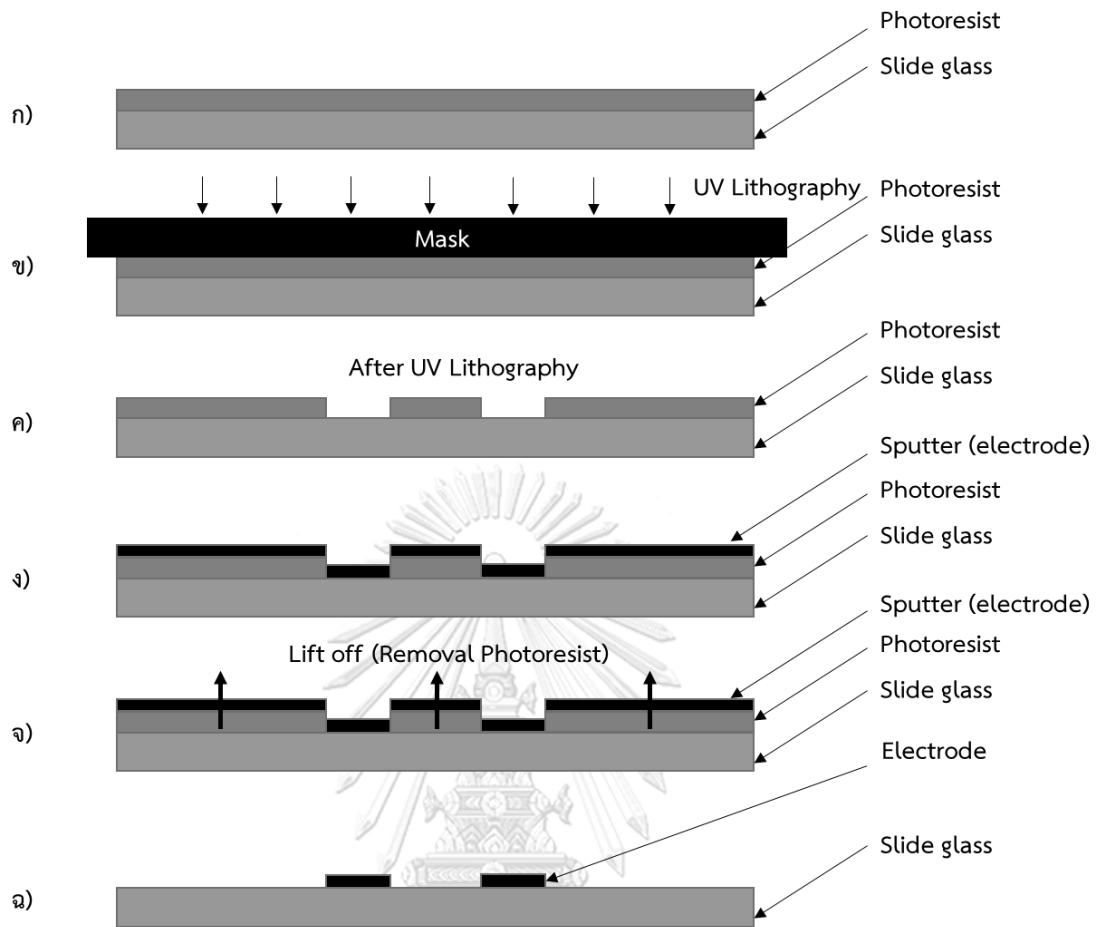
3.2.1 ขั้นตอนการสร้างช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์

ช่องทางไหลจุลภาค Polydimethylsiloxane (PDMS) ถูกสร้างด้วยวิธีซอฟต์แวร์ลิโทกราฟี (Soft lithography). ในขั้นตอนแรก ผู้วิจัยจะติดตั้งแผ่นฟิล์มไวแสงหรือสารไวแสง (Photoresist) ลงบนกระจกสไลด์ ดังในรูปที่ 3.4 ก). จากนั้น ผู้วิจัยจะนำแผ่นหน้ากาทึบที่มีลายของช่องทางไหลจุลภาคที่ต้องการมาทาบบนกระจกสไลด์ที่ได้เคลือบฟิล์มไวแสงไว้. กระจกที่ถูกทาด้วยหน้ากาทึบจะถูกส่องด้วยแสง UV เพื่อให้ฟิล์มไวแสงเกิดการแข็งตัว ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ข). ฟิล์มไวแสงส่วนที่ไม่แข็งตัวจะถูกล้างออกให้เหลือเพียงแต่ส่วนที่เป็นลายช่องทางไหลจุลภาค ดังในรูปที่ 3.4 ค). หลังจากได้แม่พิมพ์สำหรับทำช่องทางไหลแล้ว ผู้วิจัยจะเท PDMS ลงไป ดังในรูปที่ 3.4 ง) และนำไปอบเพื่อให้ PDMS เกิดการแข็งตัว. เมื่อ PDMS แข็งตัวแล้ว ผู้วิจัยลอก PDMS ออกจากแม่พิมพ์. เราจะได้ PDMS ที่มีลายช่องทางไหล ดังในรูปที่ 3.4 จ). ขั้นตอนการสร้างช่องทางไหลจุลภาคโดยละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ข1.



รูปที่ 3.4 กระบวนการสร้างช่องทางไหลจุลภาคด้วยวิธีซอฟต์แวร์ลิโทกราฟี.

อิเล็กทรอนิกส์ถูกสร้างด้วยวิธีลิฟต์ออฟ (Lift-off). ในขั้นตอนแรก ขั้นตอนการสร้างลวดลายบนฟิล์มไวแสงในรูปแบบที่ 3.4 ก) และ ข) ทำในลักษณะเดียวกับที่ได้กล่าวไว้แล้ว. ฟิล์มไวแสงส่วนที่เป็นลายอิเล็กทรอนิกส์จะไม่แข็งตัวและถูกล้างออกไป ดังในรูปแบบที่ 3.4 ค). หลังจากได้แม่พิมพ์แล้ว อิเล็กทรอนิกส์จะถูกสปีดลงบนชิ้นงาน. ขั้นตอนสปีดเตอริงได้รับความอนุเคราะห์โดยทางศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC). อิเล็กทรอนิกส์ที่สปีดลงไปมีลักษณะดังในรูปแบบที่ 3.5 ง). จากนั้นผู้วิจัยจะนำอิเล็กทรอนิกส์ส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยการขจัดฟิล์มไวแสง ดังในรูปแบบที่ 3.5 ฉ). ขั้นตอนการสร้างอิเล็กทรอนิกส์โดยละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ข2.

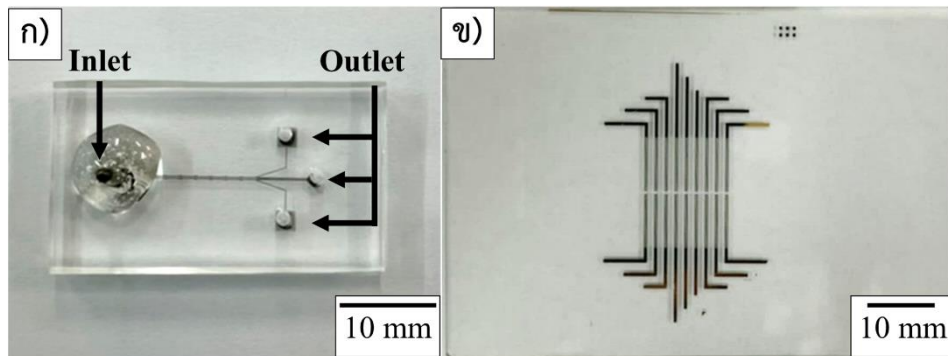


รูปที่ 3.5 กระบวนการสร้างอิเล็กโทรดด้วยวิธีลิฟท์ออฟ.

ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดถูกประกอบเข้าด้วยกันด้วยการใช้เครื่องโคโรนาดีสชาร์จ (BD-20AC, Electro-Technic-Product) กับผิวของ PDMS เป็นเวลา 2 นาที เพื่อปรับสภาพพื้นระบบนผิวหน้า PDMS ให้สามารถมายึดติดกับผิวหน้าของกระจกสไลด์อิเล็กโทรดได้ดียิ่งขึ้น. ช่องทางไหลและอิเล็กโทรดที่ผู้วิจัยได้ใช้ในงานวิจัยนี้ มีทั้งหมด 3 ชุด สำหรับเซลล์และการทดลองที่แตกต่างกัน.

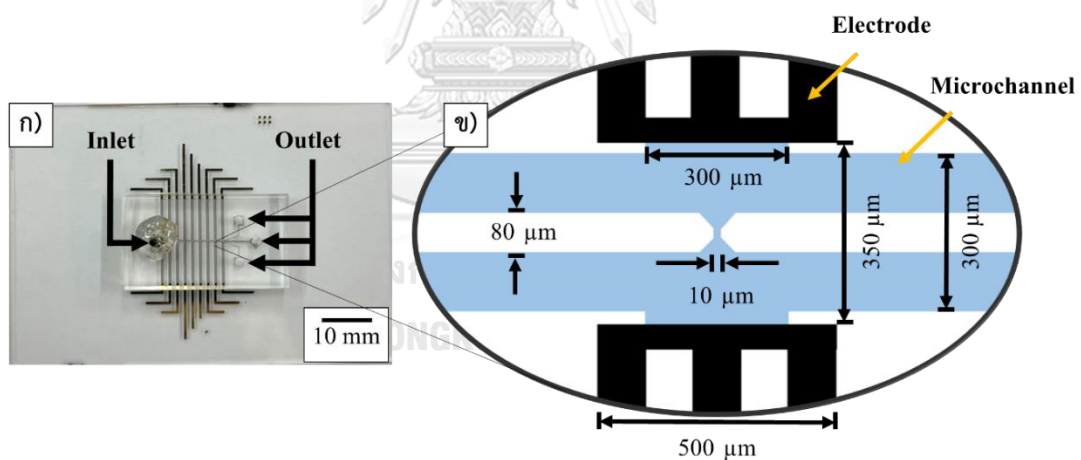
3.2.2 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 1

ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 1 ใช้ทดลองกับโพรโทพลาสต์ดอกอัญชัน. ช่องทางไหลจุลภาค PDMS มีลักษณะดังในรูปที่ 3.6 ก). ช่องทางไหลประกอบไปด้วย ช่องทางเข้า 1 ช่องทางออก 3 ช่องทาง. กระจกสไลด์อิเล็กโทรดมีลักษณะดังในรูปที่ 3.6 ข). วัสดุของอิเล็กโทรดเป็นทองและโครเมียมที่มีความหนาประมาณ 200 nm.



รูปที่ 3.6 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 1. ก) ช่องทางไหลจุลภาค. ข) อิเล็กโทรด.

ช่องทางไหลทางไหลจุลภาคและกระจกสไลด์อิเล็กโทรดที่ถูกประกอบเข้าด้วยกันมีลักษณะดังในรูปที่ 3.7 ก). ภายในช่องทางไหลมีช่องจับเซลล์ที่ใช้งานได้ทั้งหมด 6 ช่อง (ที่สามารถวางให้ตรงกับอิเล็กโทรดได้). มิติของชิปแสดงดังในรูปที่ 3.7 ข). มิติของส่วนสำคัญภายในช่องทางไหลจุลภาคเป็นดังนี้ ช่องจับเซลล์ขนาด $10\ \mu\text{m}$, ระยะแกปของอิเล็กโทรดขนาด $350\ \mu\text{m}$, ช่องทางไหลลึก $30\ \mu\text{m}$ และอิเล็กโทรดกว้าง $500\ \mu\text{m}$ โดยมีส่วนที่สัมผัสกับของเหลว กว้าง $300\ \mu\text{m}$.

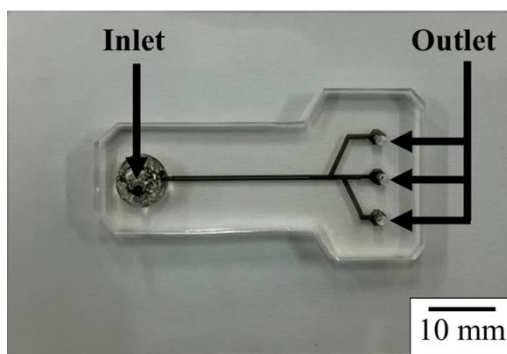


รูปที่ 3.7 ชิพจุลภาคและมิติชุดที่ 1. ก) ชิพจุลภาค. ข) มิติภายใน.

3.2.3 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 2

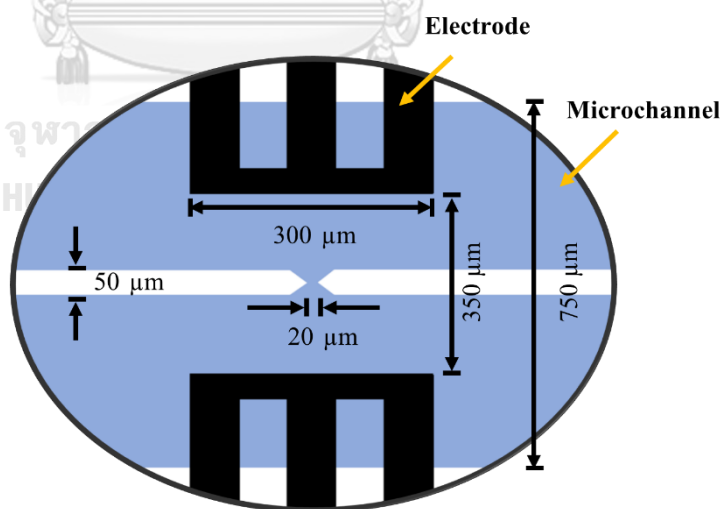
ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 2 ใช้กับเซลล์มาโครฟาจ. ช่องทางไหลจุลภาค PDMS มีลักษณะดังในรูปที่ 3.8. ช่องทางไหลประกอบไปด้วย ช่องทางเข้า 1 ช่องทาง ช่องทางออก 3 ช่องทาง. ช่องจับเซลล์มีทั้งหมด 2 ขนาด 20 และ $40\ \mu\text{m}$ แต่งานวิจัยนี้ใช้เพียงช่องจับเซลล์ขนาด 20

μm (ด้วยเงื่อนไขของขนาดเซลล์). กระจกสไลด์อิเล็กโทรดเป็นอิเล็กโทรดรูปแบบเดียวกันกับอิเล็กโทรดชุดที่ 1.



รูปที่ 3.8 ช่องทางไหลจุลภาคชุดที่ 2.

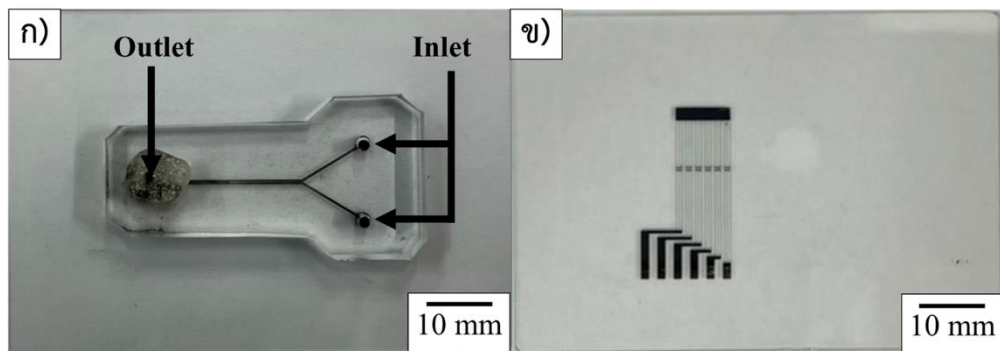
ช่องทางไหลทางไหลจุลภาคจากรูปที่ 3.8 และกระจกสไลด์อิเล็กโทรดจากรูปที่ 3.6 ข) ถูกประกอบเข้าด้วยกัน. ภายในช่องทางไหลมีช่องจับเซลล์ที่ใช้งานได้ทั้งหมด 4 ช่อง (ที่สามารถวางให้ตรงกับอิเล็กโทรดได้และช่องจับเซลล์ขนาด $20\ \mu\text{m}$). มิติของชิปแสดงดังในรูปที่ 3.9. มิติของส่วนสำคัญภายในช่องทางไหลจุลภาคเป็นดังนี้ ช่องจับเซลล์ขนาด $20\ \mu\text{m}$, ระยะแกปของอิเล็กโทรดขนาด $350\ \mu\text{m}$, ช่องทางไหลเล็ก $30\ \mu\text{m}$ และอิเล็กโทรดกว้าง $500\ \mu\text{m}$.



รูปที่ 3.9 มิติภายในของชิปชุดที่ 2.

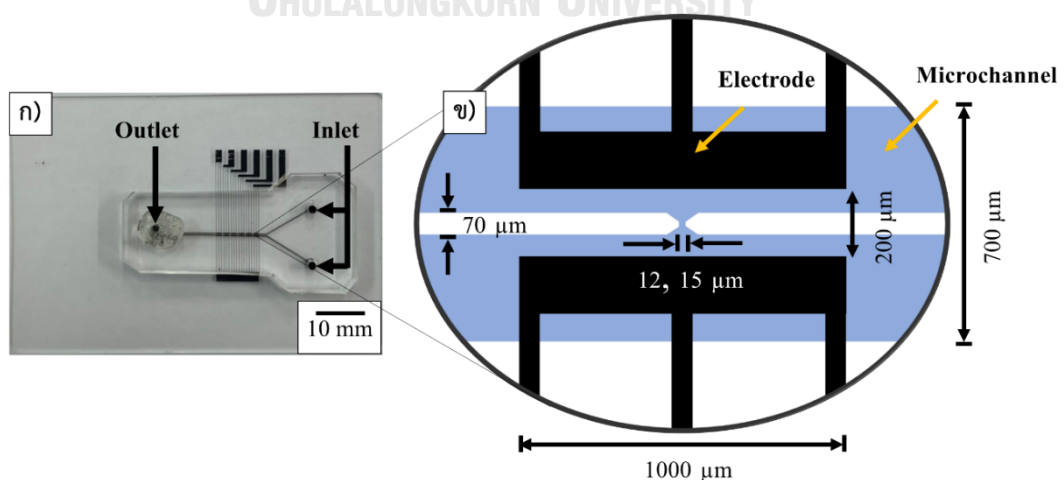
3.2.4 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 3

ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 3 สำหรับใช้ทดลองกับเซลล์มะเร็งรังสีหน่วยชนิดมาสต์ เซลล์พันธุ์ LUMC. ช่องทางไหลจุลภาค PDMS มีลักษณะดังในรูปที่ 3.10 ก). ช่องทางไหลประกอบไปด้วย ช่องทางเข้า 2 ช่องทางออก 1 ช่องทาง และช่องจับเซลล์ทั้งหมด 6 ช่อง ภายในช่องทางไหล. กระจกสไลด์อิเล็กโทรดมีอิเล็กโทรดทั้งหมด 6 คู่ ดังในรูปที่ 3.10 ข). วัสดุของอิเล็กโทรดเป็นโครเมียมที่มีความหนาประมาณ 200 nm.



รูปที่ 3.10 ช่องทางไหลจุลภาคและอิเล็กโทรดชุดที่ 3. ก) ช่องทางไหลจุลภาค. ข) อิเล็กโทรด.

ช่องทางไหลทางไหลจุลภาคและกระจกสไลด์อิเล็กโทรดที่ถูกประกอบเข้าด้วยกันมีลักษณะดังในรูปที่ 3.11 ก). มิติของชิปจุลภาคแสดงดังในรูปที่ 3.11 ข). มิติของส่วนสำคัญภายในช่องทางไหลจุลภาคเป็นดังนี้ ระยะแกบของอิเล็กโทรดขนาด 200 μm , ช่องทางไหลเล็ก 25 μm และอิเล็กโทรดกว้าง 1000 μm . ชิป PDMS ที่ใช้มี 2 แบบ ซึ่งแตกต่างกันที่ขนาดของช่องจับเซลล์เป็น 12 และ 15 μm ตามลำดับ.



รูปที่ 3.11 ชิปจุลภาคและมิติชุดที่ 3. ก) ชิปจุลภาค. ข) มิติภายใน.

ผู้วิจัยได้ปรับขนาดของช่องจับเซลล์และความลึกของช่องทางไหลให้เหมาะสมกับการทดลองแต่ละการทดลอง. ผู้วิจัยได้ปรับช่องทางไหลของชิปชุดที่ 2 และ 3 โดยเพิ่มพื้นที่สัมผัสของอิเล็กโทรดกับสารละลาย เพื่อให้กระแสไฟฟ้าไหลได้มากขึ้น. อิเล็กโทรดได้ถูกปรับให้แคบลง จาก $350\ \mu\text{m}$ เป็น $200\ \mu\text{m}$ และเพิ่มความกว้างหน้าสัมผัสจาก $500\ \mu\text{m}$ เป็น $100\ \mu\text{m}$ เพื่อเพิ่มแรงในการจับยึดเซลล์ (ในชิปชุดที่ 1 และ 2 เซลล์ต้องชิดช่องจับเซลล์อย่างมาก จึงจะสามารถจับได้).

3.3 อุปกรณ์ภายนอกระบบช่องทางไหลจุลภาค

3.3.1 เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์

การวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ทั้งหมด 2 รุ่น คือ รุ่น E4990A (Keysight) และรุ่น 4294A (Agilent). รายละเอียดเป็นดังนี้



รูปที่ 3.12 เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์. ก) E4990A. ข) 4294A.

1) เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์รุ่น E4990A แสดงในรูปที่ 3.12 ก). เครื่องมีทั้งหมด 4 แชนแนล และ 4 เทซ (Trace). จอภาพเป็น LCD แบบสัมผัสได้. เครื่องสามารถวัดอิมพีแดนซ์ได้ที่มีความถี่ตั้งแต่ $20\ \text{Hz}$ ถึง $10\ \text{MHz}$ ด้วยความละเอียด $1\ \text{mHz}$. ความแม่นยำพื้นฐานในการวัดค่าเท่ากับ $\pm 0.08\%$. เครื่องสามารถปรับแรงดันไฟฟ้าสำหรับการวัดได้ตั้งแต่ $5\ \text{mV}_{\text{rms}}$ ถึง $1\ \text{V}_{\text{rms}}$ ด้วยความละเอียด $1\ \text{mV}$. จำนวนของจุดที่สามารถวัดได้ตั้งแต่ 2 ถึง 1601 จุด.

2) เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์รุ่น 4294A แสดงดังในรูปที่ 3.12 ข) ซึ่งเป็นเครื่องที่ผู้วิจัยใช้ที่มหาวิทยาลัยฟุกุโอกะ. เครื่องมีทั้งหมด 2 เทซ. เครื่องสามารถวัดอิมพีแดนซ์ได้ที่มีความถี่ตั้งแต่ $40\ \text{Hz}$ ถึง $110\ \text{MHz}$ ด้วยความละเอียด $1\ \text{mHz}$. ความแม่นยำพื้นฐานในการวัดค่าเท่ากับ $\pm 0.08\%$. เครื่องสามารถปรับแรงดันไฟฟ้าสำหรับการวัดได้ตั้งแต่ $5\ \text{mV}_{\text{rms}}$ ถึง $1\ \text{V}_{\text{rms}}$ ด้วยความละเอียด $1\ \text{mV}$. จำนวนของจุดที่สามารถวัดได้ตั้งแต่ 2 ถึง 801 จุด.

3.3.2 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า

การป้อนสัญญาณไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นเซลล์ใช้เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าทั้งหมด 2 รุ่น คือ รุ่น AFG3022C (Tektronix) และรุ่น WF1966 (NF). รายละเอียดเป็นดังนี้



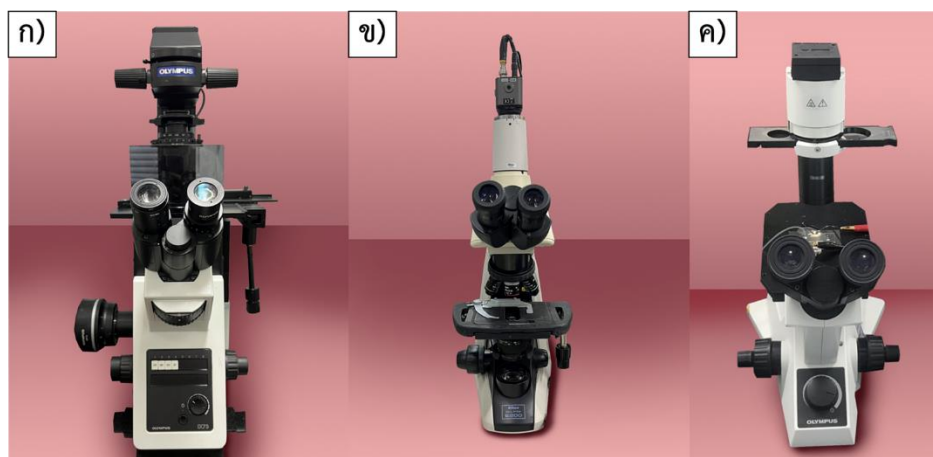
รูปที่ 3.13 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า. ก) AFG3022C. ข) WF1966.

1) เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ารุ่น AFG3022C แสดงดังในรูปที่ 3.13 ก). เครื่องมีช่องสัญญาณขาออก 2 แชนแนล. เครื่องสามารถป้อนความถี่ได้ตั้งแต่ $1 \mu\text{Hz}$ ถึง 25 MHz และแรงดันไฟฟ้าได้ตั้งแต่ 10 mV_p ถึง 10 V_p ด้วยความละเอียด 0.05 mV_p .

2) เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ารุ่น WF1966 แสดงดังในรูปที่ 3.13 ข) ซึ่งเป็นเครื่องที่ผู้วิจัยใช้ที่มหาวิทยาลัยฟุกุโอกะ. เครื่องมีทั้งหมด 2 แชนแนล. ตัวเครื่องสามารถป้อนความถี่ได้ตั้งแต่ $0.01 \mu\text{Hz}$ ถึง 50 MHz และแรงดันไฟฟ้าได้สูงสุดที่ 10 V_p ด้วยความละเอียด 0.05 mV_p .

3.3.3 กล้องจุลทรรศน์

การสังเกตการเคลื่อนที่ สภาพเซลล์ และสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye) ที่เข้าสู่เซลล์กระทำผ่านกล้องจุลทรรศน์ 3 รุ่น คือ รุ่น IX73 (Olympus), รุ่น Eclipse E200 (Nikon) และรุ่น CKX31 (Olympus). รายละเอียดเป็นดังนี้



รูปที่ 3.14 กล้องจุลทรรศน์. ก) IX73. ข) Eclipse E200. ค) CKX31.

1) กล้องจุลทรรศน์รุ่น IX73 เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ดังแสดงในรูปที่ 3.14 ก). เลนส์กล้องมีกำลังขยายทั้งหมด 5 ระดับ ดังนี้ 4X, 10X, 20X, 40X และ 60X. กล้องมีระบบฟลูออเรสเซนซ์. การบันทึกภาพและวิดีโอ ใช้กล้อง CCD ผ่านโปรแกรม CellSens ซึ่งสามารถปรับการตั้งค่าวิดีโอภายในโปรแกรมได้. ฟังก์ชันอื่นๆ ของโปรแกรม CellSens ยกตัวอย่างเช่น การนับเซลล์, วัดขนาดเซลล์, ตรวจสอบสเปกตรัม เป็นต้น.

2) กล้องจุลทรรศน์รุ่น Eclipse E200 เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบ Upright ดังแสดงในรูปที่ 3.14 ข). เลนส์กล้องมีกำลังขยายทั้งหมด 4 ระดับ ดังนี้ 4X, 10X, 20X และ 40X. ตัวกล้องนี้สามารถใช้ร่วมกับกล้อง CCD ได้ เพื่อบันทึกภาพและวิดีโอผ่านโปรแกรม AVerTV.

3) กล้องจุลทรรศน์รุ่น CKX31 เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบ Upright ดังแสดงในรูปที่ 3.14 ค). เลนส์กล้องมีกำลังขยายทั้งหมด 2 ระดับ ดังนี้ 4X และ 10X. ตัวกล้องไม่สามารถบันทึกภาพได้. ผู้วิจัยใช้กล้องนี้ในการทดลองที่มหาวิทยาลัยฟุกุโอกะ.

3.3.4 ป้อนกระบอกฉีดยา

การป้อนสารละลายและเซลล์สำหรับทดลองเข้าสู่ช่องทางไหลจุลภาคกระทำโดยใช้ปั๊มกระบอกฉีดยา (Syringe Pump) แบบกระบอกเดี่ยว ทั้งหมด 2 รุ่น คือ รุ่น NE-1000 (New Era Pump System) และรุ่น MR-1 (AS ONE). รายละเอียดเป็นดังนี้



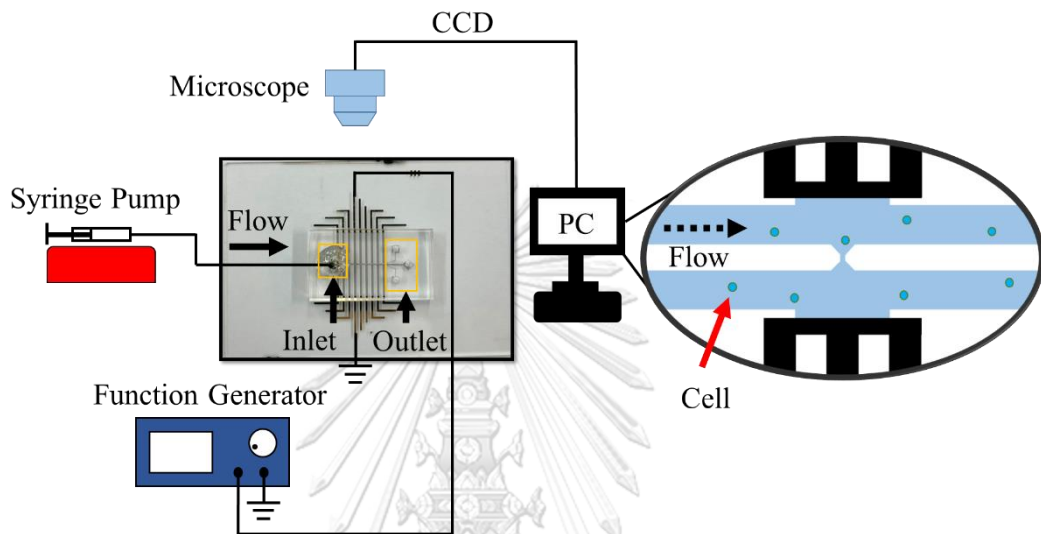
รูปที่ 3.15 ป้อนกระบอกฉีดยา. ก) NE-1000. ข) MR-1.

- 1) ป้อนกระบอกฉีดยารุ่น NE-1000 สามารถใช้อัตราการไหลได้ตั้งแต่ $0.01 \mu\text{L}/\text{min}$ ถึง $28 \text{ mL}/\text{min}$. เครื่องมีระบบตั้ง-ผลัก.
- 2) ป้อนกระบอกฉีดยารุ่น MR-1 สามารถใช้อัตราการไหลได้ตั้งแต่ $0.1 \mu\text{L}/\text{min}$ ถึง $100 \text{ mL}/\text{min}$. เครื่องเป็นระบบผลัก.

บทที่ 4

การทดลอง

4.1 การทดลองการจับยึดเซลล์ด้วยแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก



รูปที่ 4.1 แผนภาพเค้าร่างการทดลอง.



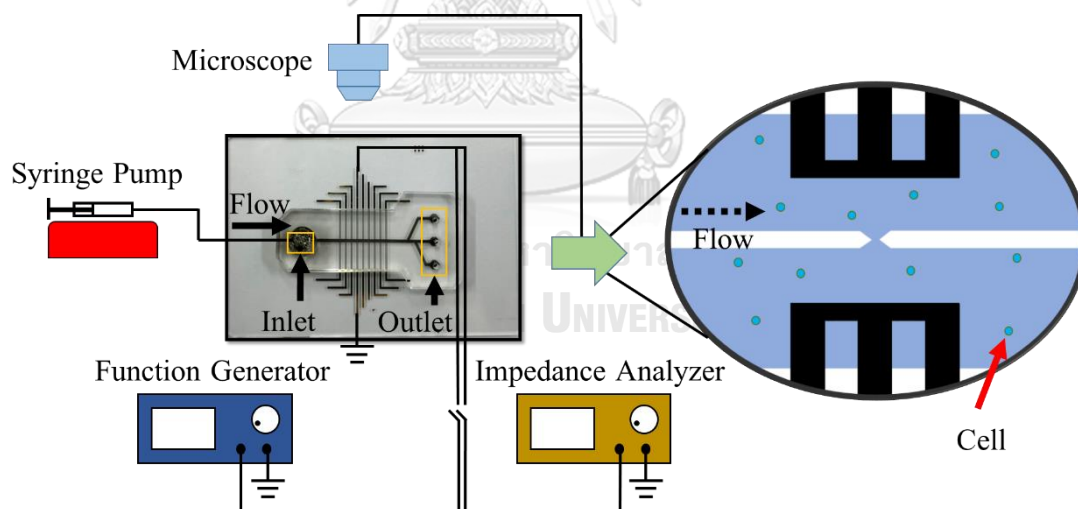
รูปที่ 4.2 ระบบการทดลองจริง.

การทดสอบนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถในการใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกยึดจับเซลล์ และเพื่อให้ผู้วิจัยได้ทราบถึงเงื่อนไขความถี่ และระดับแรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการยึด

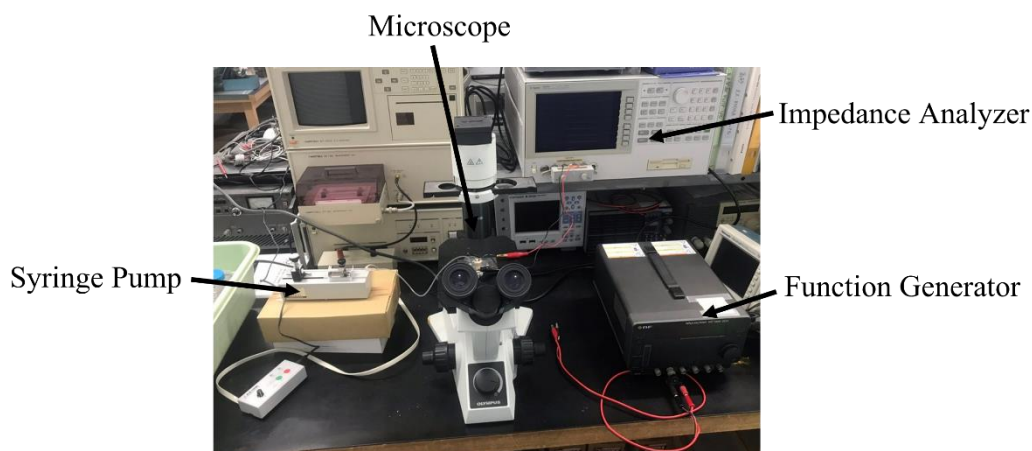
จับเซลล์เพื่อทำอิเล็กโทรพอเรชันและวัดอิมพีแดนซ์. แผนภาพเค้าร่างของระบบทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.1. ระบบการทดลองจริงแสดงดังในรูปที่ 4.2. สายยางจากกระบอกฉีดยาถูกเชื่อมกับฝั่งช่องทางทางเข้า. การทดลองเริ่มโดยการปลั๊กสารละลายเข้าสู่ช่องทางไหลที่อัตราการไหล 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ด้วยปั๊มกระบอกฉีดยา NE-1000 และออกทางฝั่งช่องทางออกทั้ง 3 ช่องทาง. เมื่อเซลล์เคลื่อนที่ผ่านบริเวณช่องจับเซลล์ ผู้วิจัยได้หยุดปั๊มเพื่อให้เซลล์หยุดนิ่ง. หลังจากนั้น ผู้วิจัยป้อนสัญญาณไฟฟ้า ด้วยเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า AFG3022C ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับขั้วอิเล็กโทรด (1 คู่) บนกระจกสไลด์. เงื่อนไขการป้อนแรงดัน คือ ความถี่ไฟฟ้า 1 MHz และระดับแรงดันไฟฟ้าตั้งแต่ 1 V_p ถึง 10 V_p โดยมีสัญญาณรูปคลื่นไซน์. กล้องจุลทรรศน์ Eclipse E200 ใช้ตรวจสอบสภาพและตำแหน่งของเซลล์. เงื่อนไขอื่นๆ ในการทดลอง เป็นดังนี้

- ชิปเป็นชิปชุดที่ 1 ที่มีอิเล็กโทรดระยะแคบ 350 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 10 μm .
- เซลล์เป็นโพรทอพลาสต์ดอกอัญชันที่มีขนาดประมาณ 20 ถึง 25 μm .
- สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m.

4.2 การทดลองวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าแบบเซลล์เดียว



รูปที่ 4.3 แผนภาพเค้าร่างการทดลอง.

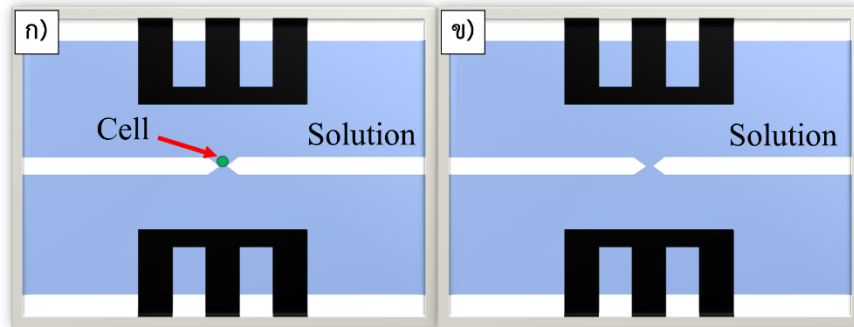


รูปที่ 4.4 ระบบการทดลองจริง.

ผู้วิจัยได้ดำเนินงานทดลองนี้ที่มหาวิทยาลัยฟูกูโอกะ โดยทดลองวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าของเซลล์มาโครพาสที่มีขนาดโดยประมาณ $10 \mu\text{m}$. แผนภาพเค้าร่างการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.3. ระบบการทดลองจริงแสดงดังในรูปที่ 4.4. วัตถุประสงค์การทดลอง คือ เพื่อให้ทราบถึงนัยยะสำคัญของความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าที่มีต่อเซลล์ นอกจากนี้ เพื่อให้ผู้วิจัยทราบถึงระดับของความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าที่ได้ และนำความต้านทานไฟฟ้ามาเปรียบเทียบกับผลการจำลองในเชิงทฤษฎี. การทดลองนี้ ผู้วิจัยได้วัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าทั้งหมด 2 กรณี คือ กรณีที่มีเซลล์ (with cell) และกรณีที่ไม่มีเซลล์ (without cell) ถูกจับยึดอยู่ที่ช่องจับเซลล์ ดังในรูปที่ 4.5 ก) และ ข) ตามลำดับ. ค่าความแตกต่างระหว่างทั้ง 2 กรณี สามารถบ่งบอกค่าอิมพีแดนซ์ของเซลล์นั้นๆ ได้แบบเฉพาะเจาะจง. สายยางจากกระบอกฉีดยาถูกเชื่อมกับฝั่งช่องทางเข้า. การทดลองเริ่มโดยการผลึกสารละลายเข้าสู่ช่องทางไหลที่อัตราการไหล $5 \mu\text{L}/\text{min}$ ด้วยปั๊มกระบอกฉีดยา MR-1 และออกทางฝั่งช่องทางออกทั้ง 3 ช่องทาง. เมื่อเซลล์เคลื่อนที่ผ่านบริเวณช่องจับเซลล์ ผู้วิจัยได้หยุดปั๊ม และดูดเข้ามาที่ช่องจับเซลล์ด้วยแรงดันไฟฟ้าที่ความถี่ 1 MHz ด้วยแรงรูปคลื่นไซน์จากเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า WF1966. เมื่อจับยึดเซลล์ได้แล้ว ผู้วิจัยถอดสายเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าออก แล้วต่อสายเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์แทน. ผู้วิจัยวัดค่าความต้านทานไฟฟ้า (R_p) และค่าความจุไฟฟ้าแบบขนาน (C_p) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ 4294A. หลังจากนั้น ผู้วิจัยจะขยับเซลล์ออกจากช่องจับเซลล์และทำการวัด R_p และ C_p ในกรณีไม่มีเซลล์. ผู้วิจัยวัด R_p และ C_p ที่ความถี่ตั้งแต่ 10 kHz จนถึง 100 kHz ด้วยแรงดันไฟฟ้า 0.5 V . กล้องจุลทรรศน์ CKX31 (ไม่สามารถบันทึกภาพหรือวิดีโอได้) ใช้ตรวจสอบสภาพและตำแหน่งของเซลล์. เงื่อนไขการทดลองอื่นๆ เป็นดังนี้

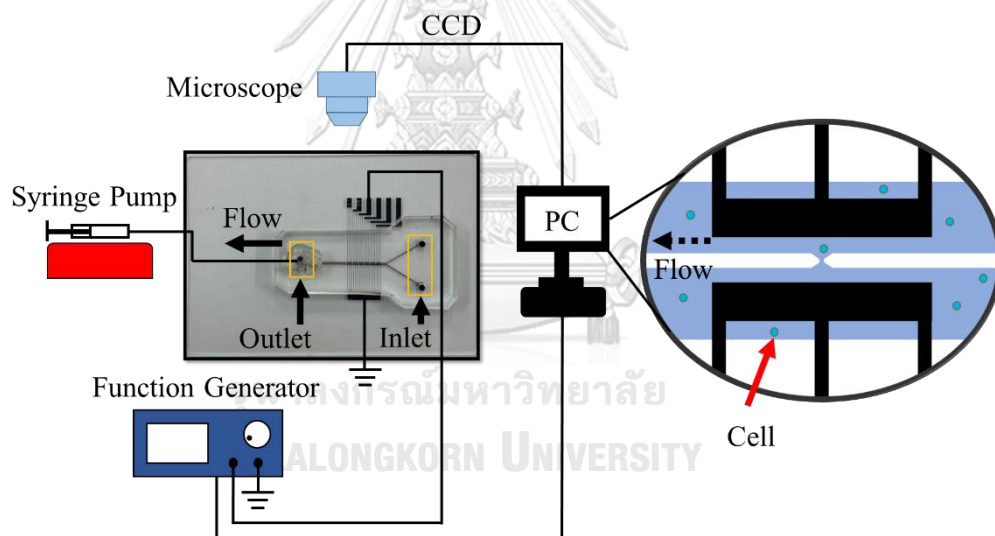
- ซิปเป็นซิปชุดที่ 2 ที่มีอิเล็กโทรดระยะแยก $350 \mu\text{m}$ และช่องจับเซลล์ขนาด $20 \mu\text{m}$.

- เซลล์มีความเข้มข้นที่ 1.5×10^6 cells/ml.
- สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m.

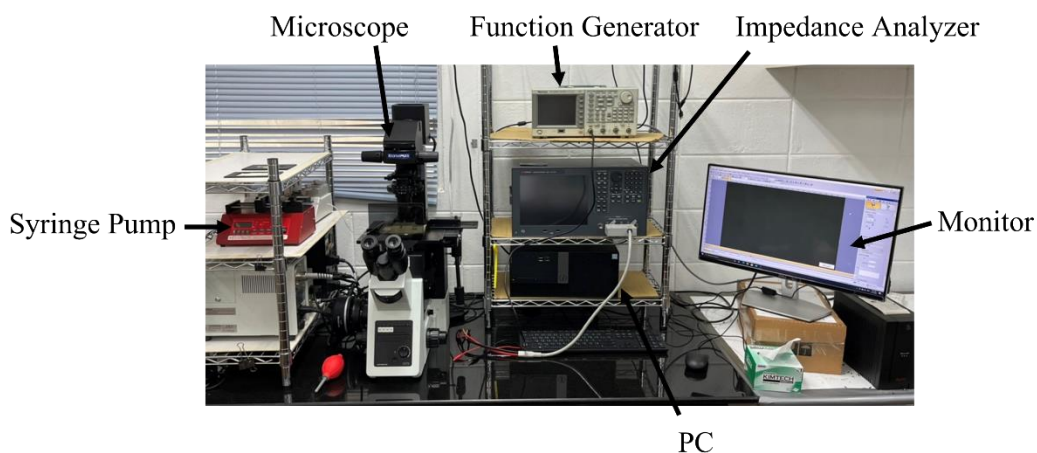


รูปที่ 4.5 เงื่อนไขของการวัดค่าอิมพีแดนซ์. ก) กรณีมีเซลล์. ข) กรณีไม่มีเซลล์.

4.3 การทดลองอิเล็กทรอนิกส์แบบเซลล์เดี่ยวด้วยแรงดันต่ำ



รูปที่ 4.6 แผนภาพเค้าร่างการทดลอง.

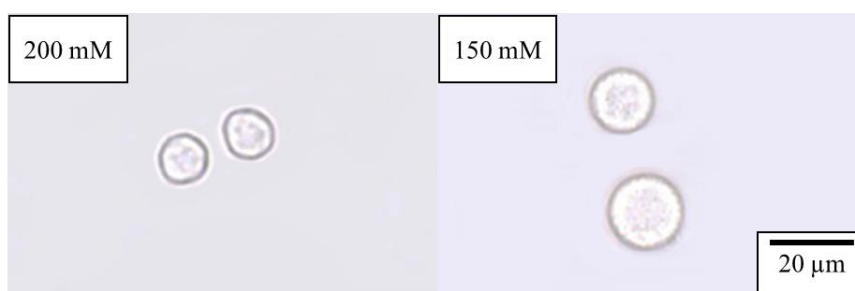


รูปที่ 4.7 ระบบการทดลองจริง.

การทดลองนี้ กระตุ้นให้เกิดอิเล็กโทรโพเรชันกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์พันธุ์ LUMC. วัตถุประสงค์การทดลอง คือ เพื่อประยุกต์ใช้ของไหลจุลภาคที่ได้ออกแบบ สำหรับการทำอิเล็กโทรโพเรชันด้วยแรงดันต่ำ ($< 5\text{ V}$) กับเซลล์ชนิดนี้ได้ และตรวจสอบลักษณะการแพร่เข้าสู่เซลล์ของสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ตามเวลา. แผนภาพเค้าร่างการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.6. ระบบการทดลองจริงแสดงดังในรูปที่ 4.7 ยกเว้นเพียงแต่เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ที่ไม่ถูกใช้ในการทดลองนี้. สารละลายกลูโคสนอกเซลล์ที่ใช้มีลักษณะเป็นไฮเพอร์โทนิก (สารละลายเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นประมาณ 200 mM) ส่งผลให้เซลล์มีขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ($\approx 2\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$) ดังแสดงในรูปที่ 4.8 เพื่อให้ผิวของเซลล์ตั้งและง่ายต่อการเปิดช่อง. สายยางจากกระบอกฉีดยาถูกเชื่อมกับฝั่งช่องทางออก. การทดลองเริ่มโดยการดูดสารละลายเข้าสู่ช่องทางไหล จากฝั่งช่องทางเข้าทั้ง 2 ช่องทาง ที่อัตราการไหล $5\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ ด้วยปั๊มกระบอกฉีดยา NE-1000. เมื่อมีเซลล์ผ่านมาบริเวณช่องจับเซลล์ ผู้วิจัยได้หยุดปั๊มและดูดเซลล์ไปที่ช่องจับเซลล์ด้วยการป้อนแรงดันไฟฟ้ารูปลิ้นสี่เหลี่ยม ที่ความถี่ 5 MHz . หลังจากนั้น ความถี่ไฟฟ้าถูกกวาดไปเป็น 20 kHz ที่แรงดันไฟฟ้า 4 V_p ด้วยเวลา 10 ms สำหรับกระตุ้นอิเล็กโทรโพเรชัน ด้วยเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า AFG3022C ซึ่งถูกควบคุมด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์. ผู้วิจัยสังเกตความเข้มของสีย้อมที่เข้าสู่เซลล์ทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยกล้องจุลทรรศน์ IX73. จากภาพที่ได้ ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ corrected total cell fluorescence (CTCF) ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อแสดงค่าปริมาณสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้าสู่เซลล์. เงื่อนไขการทดลองอื่นๆ เป็นดังนี้

- ซิปจุลภาคเป็นซิปชุดที่ 3 ที่มีอิเล็กโทรดระยะแยก $200\text{ }\mu\text{m}$ และช่องจับเซลล์ขนาด $15\text{ }\mu\text{m}$.
- เซลล์มีขนาดประมาณ $13\text{ ถึง }15\text{ }\mu\text{m}$ และความเข้มข้น $10^6\text{ cells}/\text{ml}$.

- สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m. สารละลายมี Yo-Pro 1 μM สำหรับย้อมนิวเคลียส.
- กล้องจุลทรรศน์ IX73 ถูกตั้งค่าความเข้มแสงยูวีที่ 25%. ฟิลเตอร์เป็น ND6 (Transmission = 6%). เลนส์มีกำลังขยาย 60X. การตั้งค่าวิดีโอที่บันทึกของซอฟต์แวร์มีเวลาเปิดรับแสง 15 ms, gain 1X และเฟรมเรต 25 fps.



รูปที่ 4.8 เซลล์ภายใต้สารละลายความเข้มข้น 200 mM และ 150 mM.

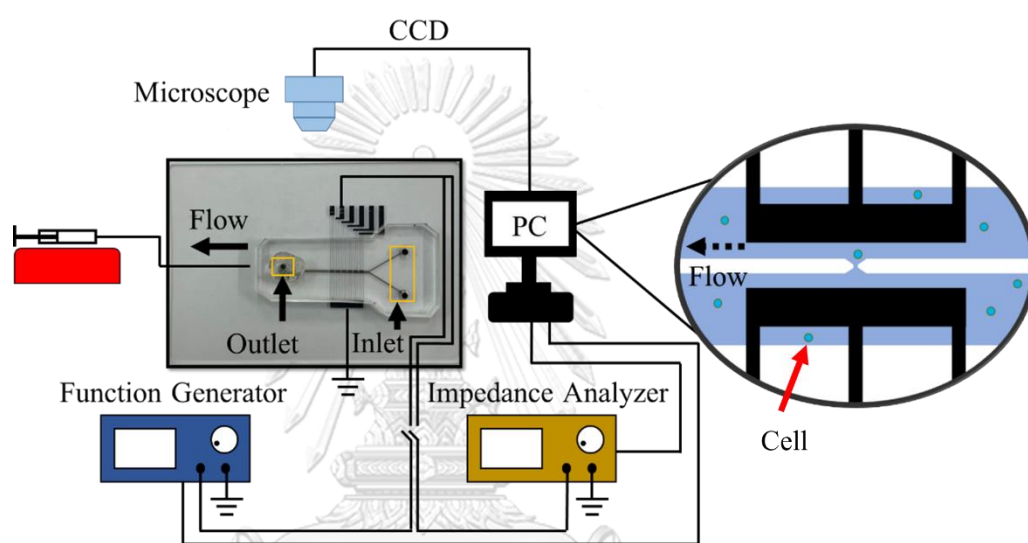
4.4 การหาประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม

เนื่องด้วยเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์เป็นเซลล์ที่เสียสภาพได้ง่าย เมื่อเงื่อนไขของการป้อนพัลส์ไม่เหมาะสม. การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถทำอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์ชนิดนี้ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ด้วยการหาเงื่อนไขที่เหมาะสมของพัลส์กระตุ้น. แผนภาพเค้าร่างการทดลองเป็นลักษณะเดียวกันกับหัวข้อที่ 4.3 ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.6. ระบบการทดลองจริงแสดงดังในรูปที่ 4.7 ยกเว้นเพียงแต่เครื่องวิเคราะห์หิมพีแดนซ์ที่ไม่ถูกใช้ในการทดลองนี้. การป้อนเซลล์เข้าสู่ชิปและการยึดจับเซลล์ทำในลักษณะเดียวกับหัวข้อที่ 4.3 ซึ่งต่างกันเพียงการยึดจับเซลล์ที่เปลี่ยนมาใช้พัลส์รูปคลื่นไซน์. หลังจากนั้น ผู้วิจัยได้ป้อนพัลส์กระตุ้นทั้งหมด 15 ครั้ง. ทั้ง 15 ครั้งถูกป้อนด้วยแรงดันไฟฟ้า $2.5 V_p$ ที่ความถี่ 20 kHz เป็นจำนวน 50 ลูกคลื่น. 5 ครั้งแรกถูกป้อนที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วินาที ตามลำดับ. 10 ครั้งหลังถูกป้อนที่ 1 ถึง 5.5 นาที โดยป้อนแต่ละครั้งห่างกัน 0.5 นาที. เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าถูกควบคุมด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์. ผู้วิจัยตรวจสอบสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เข้าสู่เซลล์หลังพัลส์กระตุ้นครั้งแรกถูกป้อน 10 นาที ด้วยกล้องจุลทรรศน์ IX73. สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ Yo-pro และ PI. ทั้งนี้ PI ใช้สำหรับตรวจสอบการเสียสภาพโดยถาวรของเยื่อหุ้มเซลล์. เงื่อนไขการทดลองอื่นๆ เป็นดังนี้

- ชิพจุลภาคเป็นชิปชุดที่ 3 ที่มีอิเล็กโทรดระยะแคบ 200 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 12 μm .

- เซลล์มีขนาดประมาณ 13 ถึง 15 μm และความเข้มข้น 10^6 cells/ml.
- สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m.
- กล้องจุลทรรศน์ IX73 ถูกตั้งค่าความเข้มแสงยูวีที่ 25% และไม่ใช้ฟิลเตอร์. เลนส์มีกำลังขยาย 60X. การตั้งค่าวิดีโอที่บันทึกของซอฟต์แวร์มีเวลาเปิดรับแสง 30 ms, gain 1X และเฟรมเรต 25 fps.

4.5 การทดลองวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ก่อนและหลังอิเล็กโทรพอเรชัน



รูปที่ 4.9 แผนภาพเค้าร่างการทดลอง.

การทดลองประยุกต์ใช้อิมพีแดนซ์ในการตรวจสอบสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เกิดจากอิเล็กโทรพอเรชัน แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์ และการตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์. ทั้งสองการทดลองมีแผนภาพเค้าร่างการทดลอง ดังในรูปที่ 4.9. ระบบการทดลองจริงแสดงดังในรูปที่ 4.7. การป้อนเซลล์เข้าสู่ชิปและการยึดจับเซลล์ทำในลักษณะเดียวกับหัวข้อที่ 4.4. เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าและเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์. เงื่อนไขการทดลองทั่วไป เป็นดังนี้

- ชิพจุลภาคเป็นชิปชุดที่ 3 ที่มีอิเล็กโทรดระยะแคบ 200 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 12 μm .
- เซลล์เป็นเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์พันธุ์ LUMC ที่มีขนาดประมาณ 13 ถึง 15 μm ความเข้มข้นของเซลล์ 10^6 cells/ml.

- สารละลายเป็นแบบไฮเพอร์โทนิก (150 mM) ที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m. ความเข้มข้นของคือ Yo-Pro 1 μM (การทดลองในหัวข้อที่ 4.4.1) และ 2 μM (การทดลองในหัวข้อที่ 4.4.2).
- กล้องจุลทรรศน์ IX73 ถูกตั้งค่าความเข้มแสงยูวีที่ 25%. ฟิลเตอร์เป็น ND6 (การทดลองในหัวข้อที่ 4.4.1) และ ND25 (การทดลองในหัวข้อที่ 4.4.2). เลนส์มีกำลังขยาย 60X. การตั้งค่าวิดีโอที่บันทึกของซอฟต์แวร์มีเวลาเปิดรับแสง 15 ms, gain 1X และเฟรมเรต 25 fps.
- เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ E4990A วัดที่ความถี่ 99 kHz ด้วยแรงดันไฟฟ้า 0.1 V และตั้งค่าให้เฉลี่ยจากการวัด 20 ค่า เพื่อให้ค่านิ่ง.

4.5.1 การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์

การทดลองเพื่อตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ จากการเปิดช่องด้วยอิเล็กโทรโพเรชัน ได้ในเชิงปริมาณด้วยการวัดอิมพีแดนซ์. เมื่อเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องแล้ว ความถี่ไฟฟ้าถูกกวาดไปเป็น 20 kHz ที่แรงดันไฟฟ้า 3 V_p ด้วยเวลา 10 ms สำหรับกระตุ้นอิเล็กโทรโพเรชัน. หลังจากนั้น ผู้วิจัยถอดสายเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าออก แล้วต่อสายเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์แทน. การตรวจสอบค่าความนำไฟฟ้าทำที่เวลา 0.5 และ 1 ถึง 10 นาที ทุกๆ 1 นาที หลังป้อนพัลส์กระตุ้น. ผู้วิจัยได้ตรวจสอบสภาพเซลล์และสีย้อมก่อนและหลังการป้อนสัญญาณกระตุ้น. นอกจากนี้ ค่า corrected total cell fluorescence (CTCF) ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ จะถูกนำมาพิจารณาประกอบด้วย. ค่า CTCF ถูกตรวจสอบที่เวลา 0, 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที.

4.5.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์

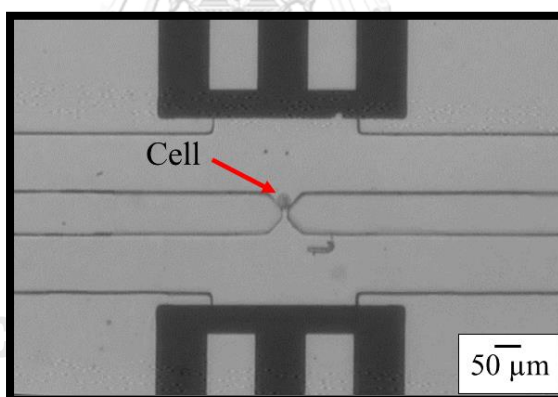
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้เราสามารถตรวจสอบขนาดช่องเปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เกิดจากการทำอิเล็กโทรโพเรชัน ได้ในเชิงปริมาณด้วยการวัดอิมพีแดนซ์. เมื่อเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องแล้ว ผู้วิจัยได้ป้อนพัลส์กระตุ้นการเปิดช่องที่ความถี่ 20 kHz. พัลส์กระตุ้นถูกป้อนในการทดลองทั้งหมด 12 เงื่อนไข ด้วยแรงดันไฟฟ้า 2.5, 3, 3.5 และ 4 V_p และด้วยจำนวนลูกคลื่น 100, 200 และ 300 ลูกคลื่น. ผู้วิจัยถอดสายเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าออก แล้วต่อสายเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์แทน. ผู้วิจัยได้ตรวจสอบสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้าสู่เซลล์และค่าความนำไฟฟ้า หลังป้อนพัลส์ 30 วินาที. ค่าความนำไฟฟ้าถูกวัดกรณีที่ไม่มีเซลล์ และหลังเซลล์ถูกกระตุ้น 30 วินาที สำหรับนำมาหาความแตกต่าง เพื่อให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์เปิดช่องได้อย่างชัดเจน. ผู้วิจัยได้ตรวจสอบสภาพเซลล์ก่อนและหลังการป้อนสัญญาณกระตุ้น จากภาพที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์.

บทที่ 5

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

5.1 ผลการทำให้เซลล์ไม่เคลื่อนที่โดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก

การทดลองจับยึดเซลล์ให้ไม่เคลื่อนที่ (Immobilization) ด้วยแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกกระทำกับเซลล์ดอกอัญชันที่มีขนาดประมาณ 20 ถึง 25 μm ภายใต้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m. มิติสำคัญภายในช่องทางไหลมีดังนี้ อีเล็กโตรดระยะเยก 350 μm , ช่องทางไหลลึก 30 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 10 μm . ในการทดลอง ผู้วิจัยได้ป้อนสัญญาณรูปคลื่นไซน์ที่มีความถี่ไฟฟ้า 1 MHz สำหรับจับเซลล์. แรงดันไฟฟ้าถูกใช้ตั้งแต่ 1 V_p ไปจนถึง 10 V_p โดยเพิ่มทีละ 0.5 V_p เพื่อหาระดับแรงดันไฟฟ้าที่เซลล์เริ่มตอบสนองต่อแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์เริ่มตอบสนองตั้งแต่ว่าระดับแรงดันไฟฟ้า 5 V_p เป็นต้นไป ซึ่งยิ่งระดับแรงดันมาก แรงที่กระทำต่อเซลล์มากตามไปด้วย. จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีสภาพปกติในทุกๆ ระดับแรงดัน. เซลล์ดอกอัญชันที่ถูกยึดจับแสดงดังในรูปที่ 5.1.



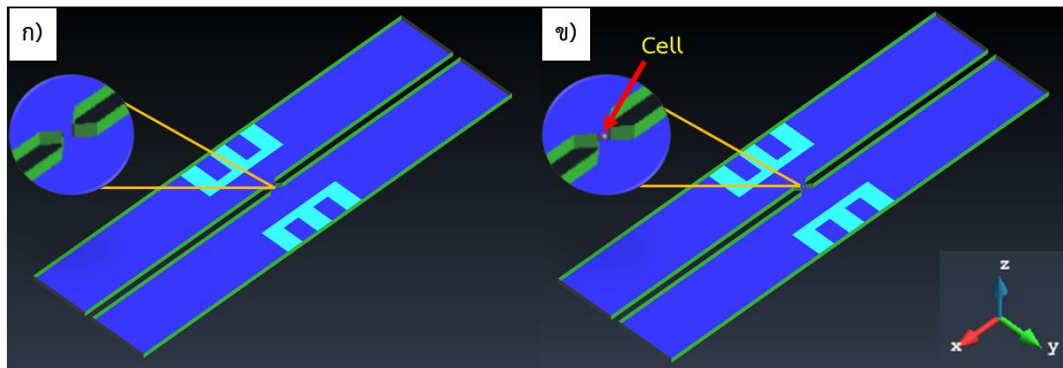
รูปที่ 5.1 เซลล์ดอกอัญชันที่ถูกจับยึด.

5.2 ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าแบบเซลล์เดี่ยว

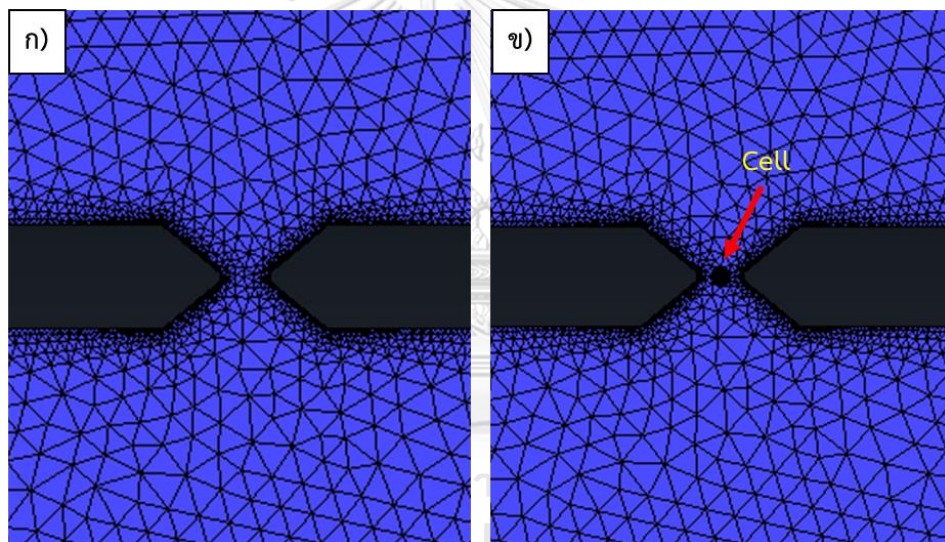
5.2.1 ผลการจำลองหาค่าความต้านทานไฟฟ้า

ผู้วิจัยได้ทำแบบจำลอง 3 มิติ เพื่อหาค่าความต้านทานไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ และมีเซลล์. แบบจำลองสร้างโดยใช้โปรแกรม GiD โดยอิงตามมิติภายในของชิปชุดที่ 2 (หัวข้อที่ 3.2.3) และกำหนดให้เซลล์มีขนาด 10 μm . แบบจำลอง 3 มิติ ของกรณีไม่มีเซลล์และมีเซลล์แสดงดังในรูปที่ 5.2 ก) และ ข) ตามลำดับ. ค่าศักย์ไฟฟ้าบนคู่อีเล็กโตรดถูกกำหนดให้มีค่าเป็น 0 และ 0.5 V_{rms} . ตัวกลางภายในถูกกำหนดให้มีสภาพนำไฟฟ้าเป็น 0.05 S/m. ค่าศักย์ไฟฟ้าและสนามไฟฟ้าภายในช่องทาง

ไหลคำนวณผ่านโปรแกรม Elmer. รูปที่ 5.3 แสดงตัวอย่างการแบ่งเอลิเมนต์ในการจำลองในระนาบ xy.



รูปที่ 5.2 แบบจำลอง 3 มิติ. ก) กรณีไม่มีเซลล์ และ ข) กรณีมีเซลล์อยู่ที่ช่องจับเซลล์.



รูปที่ 5.3 ตัวอย่างการแบ่งเอลิเมนต์ในระนาบ xy.

ผลการจำลองศักย์ไฟฟ้าบนระนาบ xy กรณีไม่มีเซลล์ และมีเซลล์เป็นดังในรูปที่ 5.4 ก) และ ข) ตามลำดับ. ผลการจำลองสนามไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ และมีเซลล์เป็นดังในรูปที่ 5.5 ก) และ ข) ตามลำดับ. จากผลการจำลองสนามไฟฟ้า เราจะเห็นสนามไฟฟ้าความเข้มสูงที่บริเวณช่องจับเซลล์ เนื่องจากแถบกันฉนวนบีบให้เส้นสนามไฟฟ้าผ่านเฉพาะบริเวณช่องเปิดเท่านั้น.

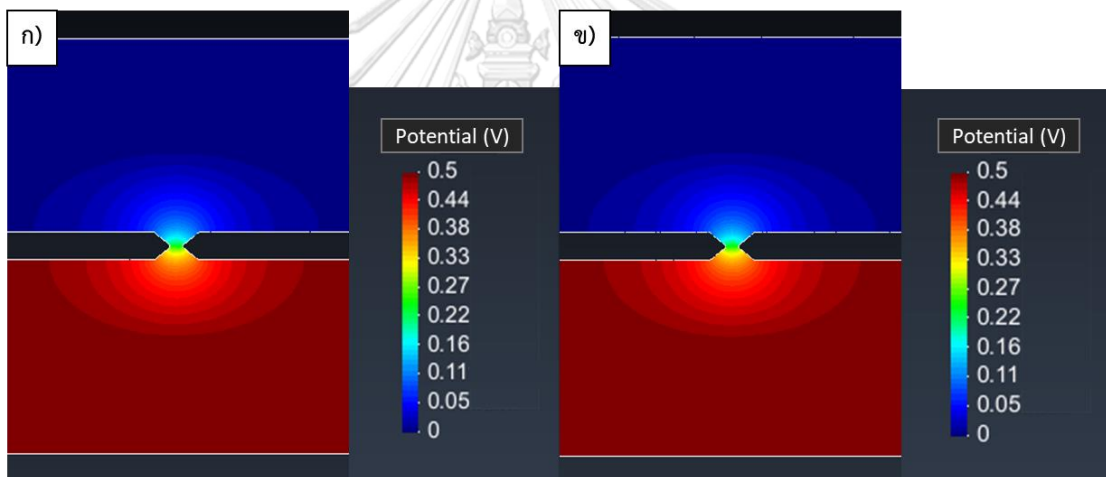
ค่ากระแสไฟฟ้าบนอิเล็กโทรดและค่าความต้านทานไฟฟ้าภายในช่องทางไหลคำนวณผ่านโปรแกรม Matlab. ค่ากระแสไฟฟ้าบนพื้นที่ย่อยของอิเล็กโทรดคำนวณได้จาก

$$dI_{dA} = \sigma_m E_A dA_{EL} \quad (5.1)$$

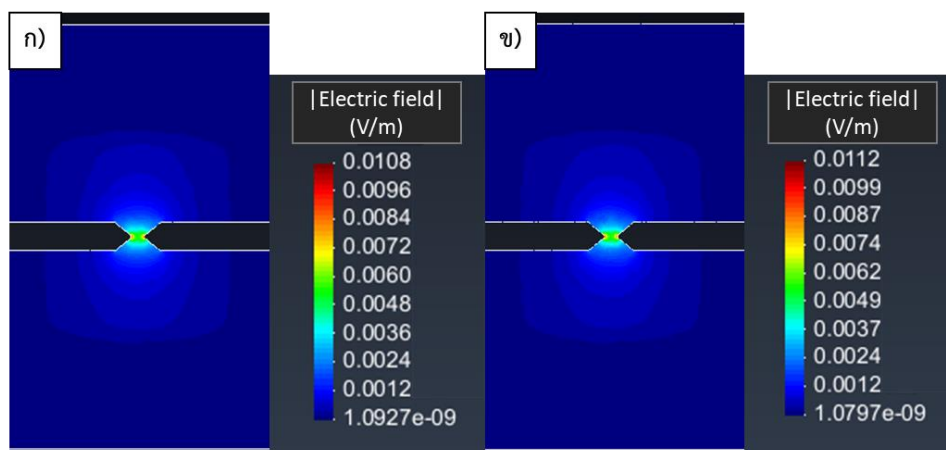
เมื่อ σ_m คือ สภาพนำไฟฟ้าของตัวกลาง, E_A คือ สนามไฟฟ้าบนพื้นที่ย่อย และ dA_{EL} คือ พื้นที่ย่อยบนอิเล็กโทรด.

ผลรวมของกระแสไฟฟ้าบนพื้นที่ย่อยได้เป็นกระแสไฟฟ้าทั้งหมดบนอิเล็กโทรด ซึ่งผู้วิจัยได้คำนวณกระแสไฟฟ้าบนอิเล็กโทรดทั้ง 2 ขั้ว และนำมาหาค่าเฉลี่ย เพื่อให้ได้กระแสไฟฟ้าที่ใกล้เคียงที่สุดของทั้งระบบ. เมื่อได้ค่ากระแสไฟฟ้าแล้ว เราจะสามารถคำนวณหาความต้านทานไฟฟ้าภายในระบบได้.

จากผลการคำนวณ ค่ากระแสไฟฟ้าเฉลี่ยบนอิเล็กโทรดกรณีไม่มีเซลล์และมีเซลล์เท่ากับ 0.1334 และ 0.1319 μA ตามลำดับ ทำให้ได้ค่าความต้านทานไฟฟ้าเท่ากับ 3.749 และ 3.790 $\text{M}\Omega$ ตามลำดับ. ความแตกต่าง ΔR_c ของความต้านทานไฟฟ้าที่ได้จากความต้านทานในกรณีที่มีเซลล์ลบด้วยความต้านทานในกรณีที่ไม่มีเซลล์ (ΔR_c) เท่ากับ 41.4196 $\text{k}\Omega$.



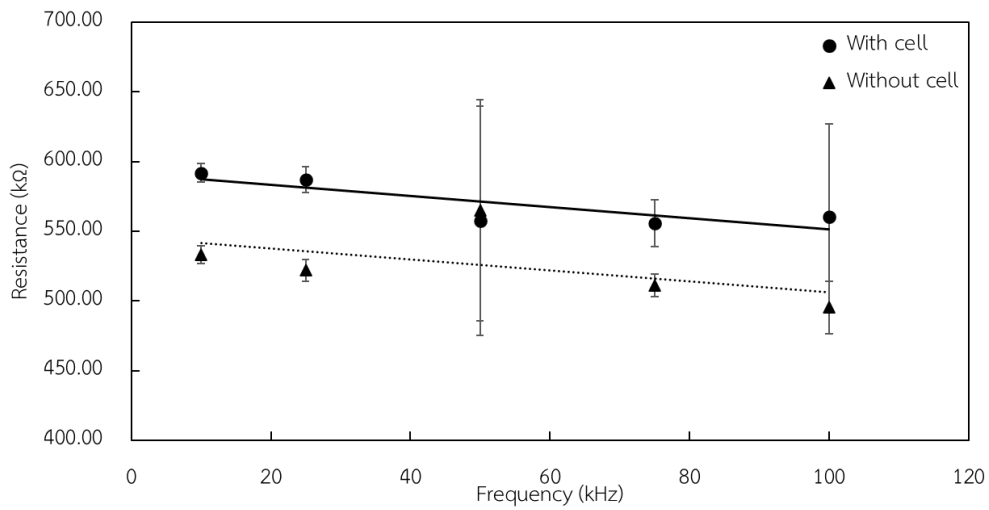
รูปที่ 5.4 การกระจายของศักย์ไฟฟ้า (V) ภายในช่องทางไหลบนระนาบ xy. ก) กรณีไม่มีเซลล์ และ ข) กรณีมีเซลล์อยู่ที่ช่องจับเซลล์.



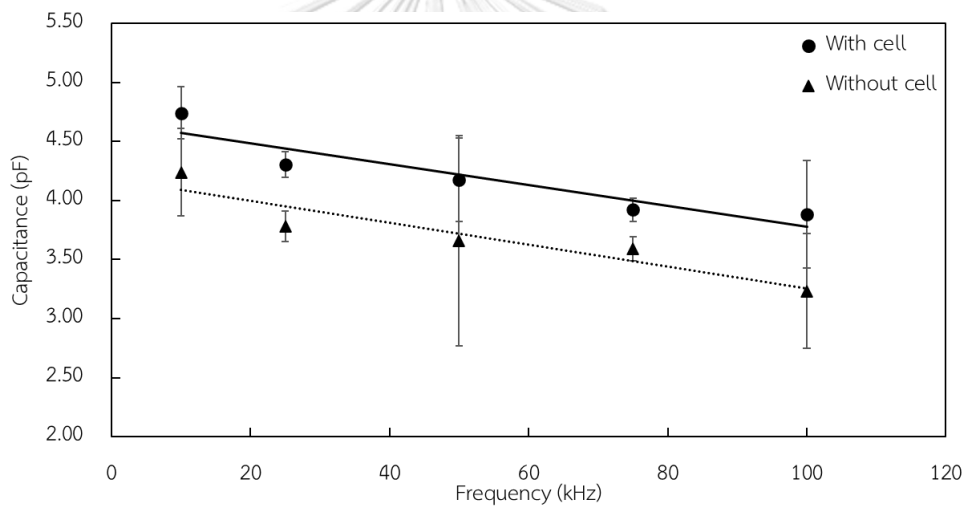
รูปที่ 5.5 การกระจายของสนามไฟฟ้า (V/m) ภายในช่องทางไหลบนระนาบ xy. ก) กรณีไม่มีเซลล์ และ ข) กรณีมีเซลล์อยู่ที่ช่องจับเซลล์.

5.2.2 ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้า

การทดลองวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้ากระทำกับเซลล์มาโครฟาจที่มีขนาดประมาณ $10\ \mu\text{m}$ ภายใต้สารละลายเกลือโคสที่มีสภาพนำไฟฟ้า $0.05\ \text{S/m}$ ด้วยมิติสำคัญภายในช่องทางไหลดังนี้ อิเล็กโทรดระยะแกป $350\ \mu\text{m}$ ช่องทางไหลลึก $30\ \mu\text{m}$ และช่องจับเซลล์ขนาด $20\ \mu\text{m}$ ซึ่งตรงกับแบบจำลอง 3 มิติ ข้างต้น. ผู้วิจัยได้วัดค่ากรณีมีเซลล์และไม่มีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์ และนำค่าความต้านทานไฟฟ้ามาเปรียบเทียบกับผลการจำลอง. ผลการวัดได้จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 5 เซลล์. การวัดค่าทำที่ความถี่ 10, 25, 50, 75 และ $100\ \text{kHz}$ ที่แรงดันไฟฟ้า $0.5\ \text{V}_{\text{rms}}$. ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและค่าความจุไฟฟ้าของทั้ง 2 กรณีเป็นดังในรูปที่ 5.6 และ 5.7 ตามลำดับ โดยมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกำกับเพื่อแสดงการกระจายของข้อมูล.



รูปที่ 5.6 ความต้านทานไฟฟ้า R_p ที่วัดได้ในกรณีมีเซลล์และไม่มีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์.



รูปที่ 5.7 ความจุไฟฟ้า C_p ที่วัดได้ในกรณีมีเซลล์และไม่มีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์.

จากรูปที่ 5.6 ผลการวัดสามารถแยกความแตกต่าง ΔR_c ของความต้านทานไฟฟ้าในกรณีมีเซลล์และไม่มีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์ได้อย่างชัดเจน. เราจะเห็นได้ว่า ค่าความต้านทานไฟฟ้ากรณีมีเซลล์และไม่มีเซลล์ มีค่าห่างจากผลการจำลองประมาณ 6 ถึง 7 เท่า. ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุของความแตกต่างนี้มาจาก PDMS ที่สามารถให้ของเหลวซึมผ่านได้บางส่วน. อย่างไรก็ตาม เมื่อเรานำค่า ΔR_c ที่ได้จากการวัดไปเปรียบเทียบกับผลการจำลอง เราจะเห็นได้ว่า ΔR_c จากการวัดโดยเฉลี่ยจากทุกความถี่เท่ากับ 45.635 k Ω มีค่าใกล้เคียงกับ ΔR_c จากการจำลอง (41.419 k Ω).

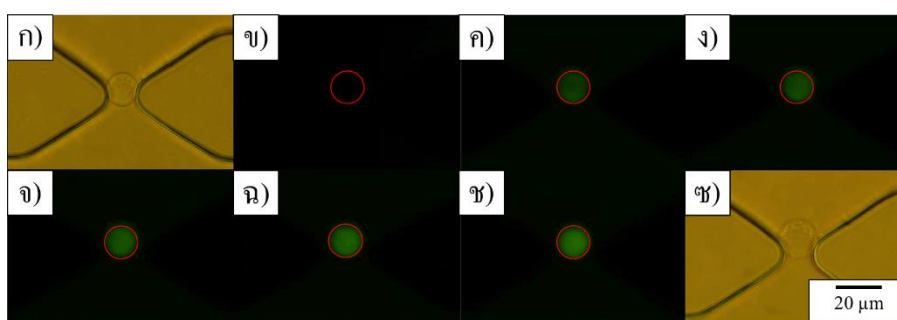
จากรูปที่ 5.7 ผลการวัดสามารถแยกความแตกต่าง ΔC_c ของความเก็บประจุในกรณีที่มีเซลล์และไม่มีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์ได้อย่างชัดเจน. ค่า ΔC_c มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเก็บ

ประจุของพื้นหลังภายนอก. นอกจากนี้ สภาพแวดล้อมภายนอกของระบบวัดมีอิทธิพลต่อผลการวัดค่อนข้างมาก ไม่ว่าจะเป็น ตำแหน่งของสาย ความห่างของขั้ววัด เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลอย่างมากต่อการทดลองในหัวข้อต่อมาของวิทยานิพนธ์นี้ ซึ่งมีการเชื่อมต่อและปลดสายวัดในระหว่างการทดลอง. ดังนั้น ผู้วิจัยจึงไม่นำความเก็บประจุมาพิจารณา.

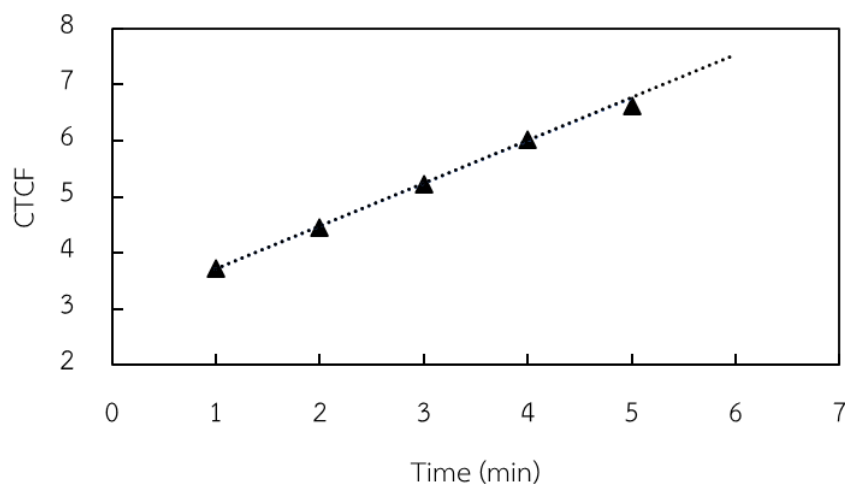
ค่าความต้านทานไฟฟ้าที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความถี่ที่ลดลง. ผู้วิจัยคาดว่า การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดมาจากปรากฏการณ์โพลาไรเซชัน (Polarization) ที่อิเล็กโทรด. การแกว่งของความต้านทานไฟฟ้าและความเก็บประจุที่ความถี่ 50 และ 100 kHz คาดว่าเกิดมาจากสัญญาณรบกวนภายนอก.

5.3 ผลการทำอิเล็กโทรโพเรชันแบบเซลล์เดี่ยวด้วยแรงดันต่ำ

การทดลองกระทำกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ที่มีขนาดประมาณ 15 ถึง 18 μm (ขยายขนาดโดยใช้ตัวกลางนอกเซลล์แบบไฮเพอร์ทอนิก 150 mM). สารละลายแขวนลอยเซลล์มีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m. มิติสำคัญภายในช่องทางไหลดังนี้ อิเล็กโทรดระยะแกป 200 μm ช่องทางไหลเล็ก 25 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 15 μm . การเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์สังเกตได้จากความเข้มของสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ตามเวลาหลังกระตุ้นด้วยพัลส์ไฟฟ้า ดังรูปที่ 5.8. การทำอิเล็กโทรโพเรชันในรูปใช้แรงดันไฟฟ้า 4 V_p ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 10 ms. รูปที่ 5.8 ก) แสดงภาพ bright field ของเซลล์ก่อนป้อนพัลส์. รูปที่ 5.8 ข) ถึง ช) แสดงสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้าสู่เซลล์ (วงกลมสำหรับระบุตำแหน่ง) ตามเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการป้อนแรงดันไฟฟ้า ที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที ตามลำดับ. รูปที่ 5.8 ช) แสดงภาพ bright field ของเซลล์ที่เวลา 5 นาที. จากรูปที่ 5.8 เราจะเห็นสังเกตเห็นสีย้อมเข้าสู่เซลล์ได้ตั้งแต่นาทีที่ 1. ความเข้มของสีย้อมเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป โดยที่เซลล์ยังไม่เสียหาย. เซลล์เพียงขยายขึ้นเล็กน้อยจากสภาพก่อนพัลส์.



รูปที่ 5.8 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า 4 V_p ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 10 ms. ก). สภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์. ข) ถึง ช) ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ที่ $t = 0$ ถึง $t = 5$ นาที ตามลำดับ. ช) สภาพเซลล์หลังผ่านไป 5 นาที.



รูปที่ 5.9 การเปลี่ยนแปลงค่า CTCF ของเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ตามเวลาหลังกระตุ้นด้วยพัลส์ไฟฟ้า.

รูปที่ 5.9 แสดงปริมาณสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ด้วย corrected total cell fluorescence (CTCF) ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา. จากรูปที่ 5.9 ค่า CTCF ที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสีย้อมที่เข้าสู่เซลล์จากรูปที่ 5.8. ค่า CTCF เพิ่มขึ้นตามเวลาอย่างเป็นเชิงเส้นจนนาทีที่ 4. นอกจากนี้ ระหว่างนาทีที่ 4 และ 5 เราสังเกตเห็นได้ว่าอัตราการเพิ่มของ CTCF ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสีย้อมเริ่มอิ่มตัวหรือเซลล์เริ่มปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์.

ความเข้มของสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถนำมาพิจารณาขนาดของการเปิดช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์ในเชิงปริมาณได้. การวัดอิมพีแดนซ์จึงเป็นส่วนสำคัญ ที่สามารถนำมาพิจารณาประกอบกับค่า CTCF เพื่อเทียบความสัมพันธ์ของขนาดของช่องที่เปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ในเชิงปริมาณกับปริมาณสีย้อมที่เข้าสู่เซลล์.

5.4 ประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม

จากการทดลองในหัวข้อ 5.3 ผู้วิจัยได้ขยายขนาดโดยการใช้ตัวกลางนอกเซลล์แบบไฮเพอร์โทนิก ซึ่งทำให้เซลล์เสียสภาพได้ง่ายเกินไป. ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงได้ปรับความเข้มข้นของสารละลายมาเท่ากับสารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 200 mM ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงเป็นที่ประมาณ 13 ถึง 15 μm . การทดลองกระทำกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ ภายใต้สารละลายกลูโคสที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m. มีติสำคัญภายในช่องทางไหลมีดังนี้ อิเล็กโทรดระยะแยก 200 μm ช่องทางไหลลึก 25 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 12 μm . ผู้วิจัยได้เปลี่ยนมาใช้ช่องจับเซลล์ที่มีขนาดเล็กลง เพื่อลด

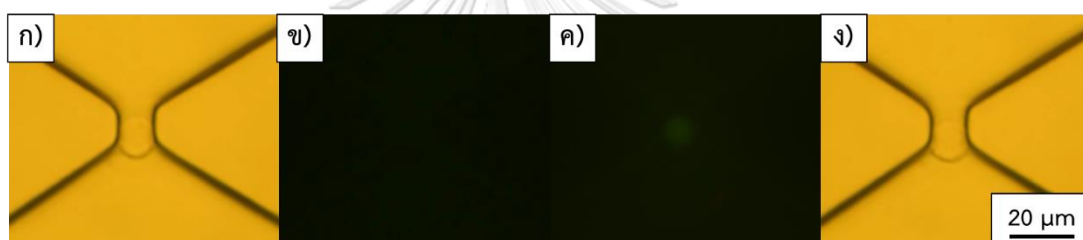
ปัญหาเซลล์หลุดออกจากช่องจับเซลล์หลังป้อนพัลส์กระตุ้น. ในการทดลอง ผู้วิจัยได้หาเงื่อนไขที่คิดว่าเหมาะสมก่อน เมื่อได้เงื่อนไขแล้วจึงมาเก็บผลการทดลองหาประสิทธิภาพ. ผู้วิจัยหาเงื่อนไขที่เหมาะสมโดยการตีกรอบเงื่อนไขให้แคบลง ระหว่างเงื่อนไขที่ทำให้เซลล์เสียหายและเซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง. ในเริ่มแรก ผู้วิจัยได้ใช้เงื่อนไขการกระตุ้นที่ $3 V_p$ 20 kHz 100 cycles แต่พบว่าเซลล์ที่เสียหายจากการกระตุ้นค่อนข้างมาก. ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนมาใช้ระดับแรงดันที่ $2.5 V_p$ โดยป้อน 10 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 2.5 วินาที ซึ่งยังคงมีเซลล์เสียหายอยู่มากเช่นเดิม. ผู้วิจัยได้เปลี่ยนเงื่อนไขมาที่ $2 V_p$ 20 kHz 50 cycles โดยป้อนทั้งหมด 5 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 2.5 วินาที. ผลปรากฏว่าไม่มีเซลล์ที่สีย้อมสามารถซึมผ่านได้หลังการกระตุ้น. จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้ข้อสรุปมาใช้ที่เงื่อนไข $2.5 V_p$ 20 kHz 50 cycles และเพิ่มจำนวนครั้งเป็น 15 ครั้ง เพื่อทำอิเล็กโทรพอเรชันในการทดลอง. 5 ครั้งแรกถูกป้อนที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วินาที ตามลำดับ. 10 ครั้งหลังถูกป้อนที่ 1 ถึง 5.5 นาที โดยป้อนแต่ละครั้งห่างกัน 0.5 นาที. เซลล์ถูกตรวจสอบสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เวลา 10 นาที.

การตรวจสอบสถานะของเซลล์หลังเกิดอิเล็กโทรพอเรชันอาศัย Propidium iodide (PI) $2.4 \mu\text{M}$ และ Yo-Pro-1 $1 \mu\text{M}$ ในสารแขวนลอยเซลล์. PI จะเข้าสู่ภายในเซลล์และแสดงฟลูออเรสเซนต์สีแดงได้ก็ต่อเมื่อเซลล์ตาย (เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายอย่างถาวร) แล้วเท่านั้น. Yo-Pro-1 จะสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้แม้จะเกิดช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์แบบชั่วคราว (คืนสภาพได้) ซึ่ง PI ไม่สามารถแพร่เข้าได้ เราจึงสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวและถาวรได้. ผลการทดลองเป็นผลจากเซลล์ทั้งหมด 10 เซลล์. จากผลการทดลอง เซลล์ที่แสดงสีเขียวมีจำนวนทั้งหมด 5 เซลล์. เซลล์ที่แสดงสีแดงมีทั้งหมด 3 เซลล์. เซลล์ที่สีย้อมไม่สามารถซึมผ่านได้มีทั้งหมด 2 เซลล์. ประสิทธิภาพในการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวที่ได้เท่ากับ 50%. ตัวอย่างเซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวแสดงดังในรูปที่ 5.10. รูปที่ 5.10 ก) ถึง ง) แสดงสภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์ การตรวจสอบสีย้อมก่อนป้อนพัลส์ การตรวจสอบสีย้อมหลังจากป้อนพัลส์แรก 10 นาที และสภาพเซลล์หลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที ตามลำดับ. ตัวอย่างเซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบถาวรแสดงดังในรูปที่ 5.11. รูปที่ 5.11 ก) ถึง ง) แสดงสภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์ การตรวจสอบสีย้อมก่อนป้อนพัลส์ การตรวจสอบสีย้อมหลังจากป้อนพัลส์แรก 10 นาที และสภาพเซลล์หลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที ตามลำดับ.

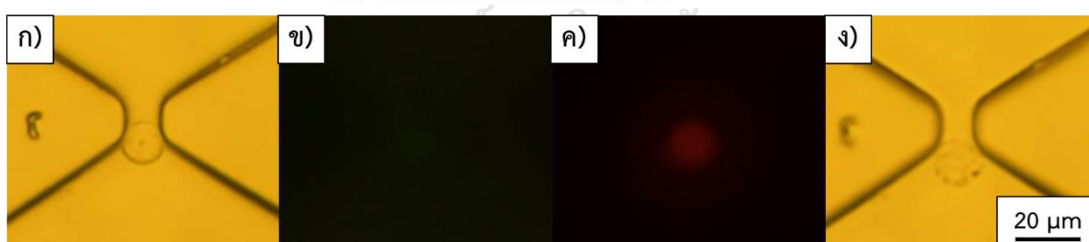
นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทดลองเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวยิ่งขึ้นไปอีก. ผู้วิจัยได้นำสาร ROCK Inhibitor Y-27632 มาใช้กับเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้

สำหรับเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะกันของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์. ผู้วิจัยผสมสารดังกล่าวลงในสารละลายสำหรับทดลองด้วยความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$. หลังถูกแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงนำเซลล์ตัวอย่างมาทดลอง. ผลที่ได้ ประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากจาก 50% เป็น 80% จากทั้งหมด 10 เซลล์ ด้วยเงื่อนไขการทดลองเดิม.

งานวิจัยที่ใช้อิเล็กโทรพอเรชันในการกระตุ้นการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผ่านมาในอดีตโดยทั่วไปใช้ระดับแรงดันไฟฟ้าประมาณ $10 V_p$ ขึ้นไป. งานวิจัยการทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยไฟฟ้าเคมี [15] สามารถทำให้เกิดช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ไม่เสียหาย ได้ที่ระดับแรงดัน 5 ถึง $7 V_{rms}$. งานวิจัยอุปกรณ์ของไหลจุลภาคแบบใหม่สำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชัน [16] สามารถทำได้ที่ระดับแรงดัน $15 V_{rms}$. ดังนั้น ระดับแรงดันที่ใช้ในการกระตุ้นการเปิดช่องที่ทำได้ในงานวิจัยนี้ อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ($2.5 V_p$).



รูปที่ 5.10 เซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราว. ก) สภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์. ข) สีย้อมก่อนป้อนพัลส์. ค) สีย้อมหลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที. ง) สภาพเซลล์หลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที.



รูปที่ 5.11 เซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันแบบถาวร. ก) สภาพเซลล์ก่อนป้อนพัลส์. ข) สีย้อมก่อนป้อนพัลส์. ค) สีย้อมหลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที. ง) สภาพเซลล์หลังป้อนพัลส์แรก 10 นาที.

5.5 การวัดอิมพีแดนซ์ของเซลล์ก่อนและหลังอิเล็กโทรพอเรชัน

การทดลองกระทำกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ที่มีขนาดประมาณ 13 ถึง $15 \mu\text{m}$ ภายใต้สารละลายกลูโคส 150 mM ที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m ด้วยมิติสำคัญภายในช่องทางไหล

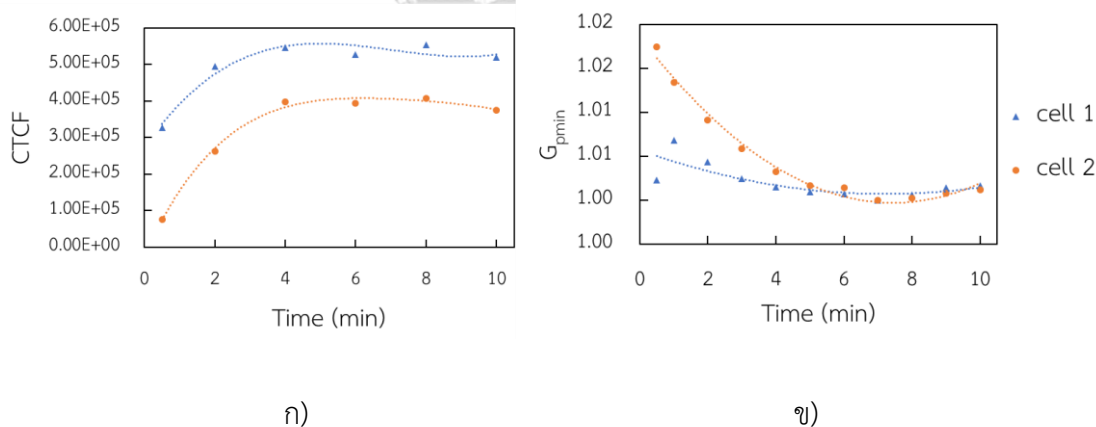
ดังนี้ อิเล็กโทรดระยะแกป 200 μm ช่องทางไหลเล็ก 25 μm และช่องจับเซลล์ขนาด 12 μm . ผลการทดลองเป็นดังนี้

5.5.1 การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์

เซลล์ถูกทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยการกระตุ้นแรงดันไฟฟ้า 3 V_p ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 10 ms. ผู้วิจัยได้ทดลองกับเซลล์ทั้งหมด 17 เซลล์. การตรวจสอบค่าความนำไฟฟ้าที่ความถี่ 99 kHz ทำที่เวลา 0.5 และ 1 ถึง 10 นาที ทุกๆ 1 นาที หลังป้อนพัลส์กระตุ้น. ค่า CTCF ถูกตรวจสอบที่เวลา 0, 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที. CTCF ที่ 0 นาที ถูกตรวจสอบเพื่อเช็คความเข้มของสีย้อมก่อนเริ่มป้อนพัลส์ (ค่าใกล้ 0 เป็นส่วนใหญ่). ผลการทดลองแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ดังนี้ (1) ลดลงตามเวลาแล้วเกิดการอิมิตัว (2) พาราโบลาลง และ (3) เพิ่มขึ้นตามเวลา. ผลการทดลองจำแนกจากรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงตามเวลาของค่า G_{pmin} ที่วัดได้ โดยนิยาม

$$G_{pmin} = G \text{ ที่วัดได้จริงตามเวลา} / G \text{ ต่ำสุดที่วัดได้จริงของเซลล์นั้นๆ} \quad (5.2)$$

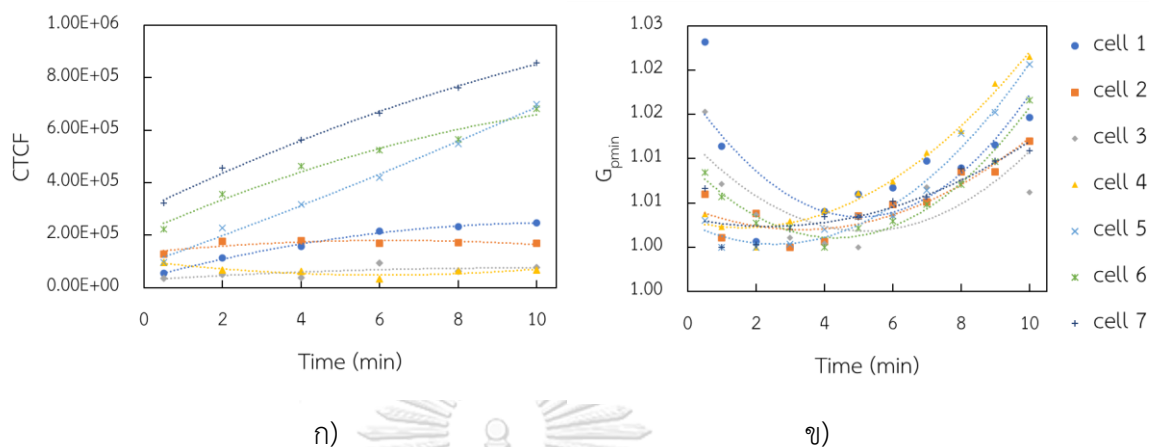
เส้นแนวโน้มของผลการทดลองทั้ง 3 รูปแบบของแต่ละเซลล์ที่ตรวจสอบเป็นดังในรูปที่ 5.12, 5.13 และ 5.14 ตามลำดับ.



รูปที่ 5.12 เซลล์ที่เกิดการคืนสภาพ. ก) CTCF และ ข) G_{pmin} .

ในรูปที่ 5.12 ก) เราจะเห็นได้ว่าค่าความชันของกราฟ CTCF ค่อนข้างคงที่หลังนาทีที่ 5. ในรูปที่ 5.12 ข) G_{pmin} มีค่าลดลงตามเวลาในช่วงแรกและเกิดการอิมิตัว. ผู้วิจัยคาดว่า ในกรณีนี้เกิดการคืนสภาพของช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้เปิดออก ทำให้ค่าความนำไฟฟ้าลดลง. เมื่อการคืนสภาพสิ้นสุดแล้ว ค่าความนำไฟฟ้าจะคงที่ที่ค่าหนึ่ง. การเปลี่ยนแปลงของ G_{pmin} ในที่นี้สัมพันธ์กับ CTCF ของ

เซลล์. การเปลี่ยนแปลงของ CTCF และความนำไฟฟ้าในกรณีนี้มีลักษณะตามที่ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดขึ้น.

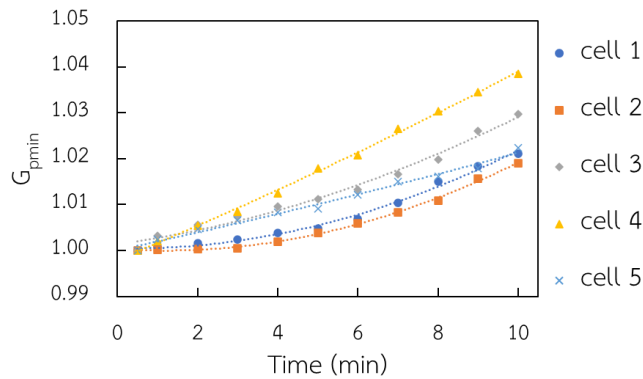


รูปที่ 5.13 เซลล์ที่เกิดการคืนสภาพและได้รับผลกระทบการเปลี่ยนแปลงสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลาง นอกเซลล์. ก) CTCF และ ข) G_{pmin} .

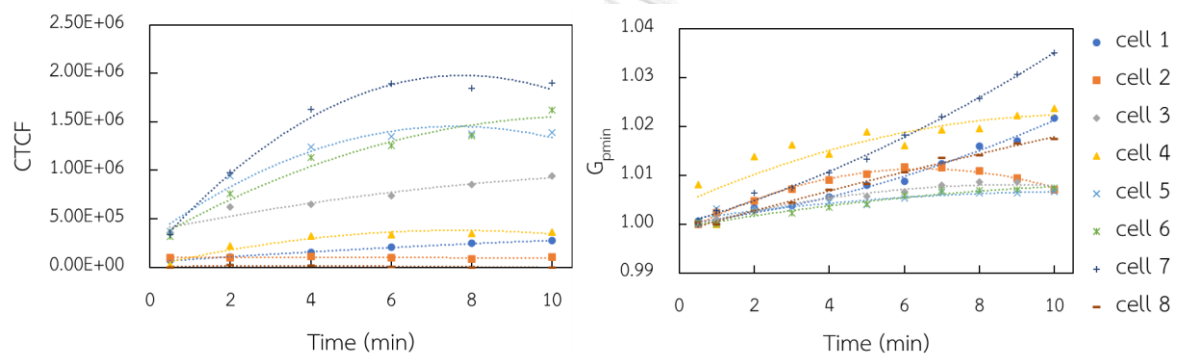
ในรูปที่ 5.13 ก) ผู้วิจัยได้พิจารณาเส้นกราฟเป็น 2 กรณี. ในกรณีแรกค่า CTCF เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามเวลา ซึ่งแสดงถึงเซลล์ยังคงเปิดช่องอยู่มากแม้ว่าเวลาจะผ่านไปแล้ว 10 นาที. กรณีต่อมา เป็นกรณีที่กราฟค่า CTCF มีค่าต่ำ แสดงถึงเซลล์มีการเปิดช่องน้อยทำให้สีย้อมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ปริมาณน้อย (หรืออาจไม่เข้าสู่ภายในเซลล์). ในรูปที่ 5.13 ข) G_{pmin} มีลักษณะเป็นกราฟรูปพาราโบลา หาย. เมื่อพิจารณาเซลล์ที่มี CTCF เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามเวลา (เส้นกราฟสีม่วง, เขียว และฟ้า) เราสามารถสรุปได้จากรูปที่ 5.13 ข) ว่า การคืนสภาพของเซลล์เกิดขึ้นในช่วงแรก แต่มีระดับที่น้อยลง หรือไม่เกิดขึ้นในช่วงท้าย. การที่เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีช่องเปิดอยู่ (จากการตายหรือคืนสภาพได้น้อยลง) ส่งผลให้สีย้อมยังคงแพร่เข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่อง. ทั้งนี้ โดยหลักการแล้ว หากเยื่อหุ้มเซลล์คืนสภาพได้น้อยลงหรือไม่คืนสภาพ ค่าความนำไฟฟ้าควรจะคงที่ที่ค่าหนึ่ง. สาเหตุที่ค่าความนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในการทดลอง ผู้วิจัยคาดว่า เป็นความนำไฟฟ้าของสารละลายที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สวนทางกับการคืนสภาพของเซลล์). การเปลี่ยนแปลงความนำไฟฟ้าของสารละลายแสดงดังในรูปที่ 5.14 ซึ่งได้จากการวัดค่าความนำไฟฟ้าของเซลล์ที่ถูกจับยึดโดยไม่ป้อนพัลส์กระตุ้นเป็นเวลา 10 นาที.

ในกรณีของเซลล์ที่แสดงค่า CTCF ต่ำ (เส้นกราฟสีน้ำเงิน, ส้ม, เหลือง และเทา) เราสามารถสรุปได้จากรูปที่ 5.13 ข) ว่า ในช่วงเริ่มต้นเซลล์เกิดการคืนสภาพจากการเปิดช่องที่มีขนาดเล็ก ทำให้ปริมาณสีย้อมแพร่เข้าสู่เซลล์ได้น้อยและช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์ปิดอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ค่าความนำ

ไฟฟ้าลดลงในช่วงแรก. หลังจากนั้น ในช่วงท้ายการเปลี่ยนแปลงสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายนอกเซลล์ ส่งผลให้ค่าความนำไฟฟ้าที่วัดได้เพิ่มขึ้น ในลักษณะเดียวกันกับกรณีแรก.



รูปที่ 5.14 การเพิ่มขึ้นตามเวลาของความนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลางที่วัดได้.



ก)

ข)

รูปที่ 5.15 เซลล์ที่ไม่เกิดการคืนสภาพและได้รับผลกระทบการเปลี่ยนแปลงสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลางนอกเซลล์. ก) CTCF และ ข) G_{pmin} .

ในรูปที่ 5.15 ค่า G_{pmin} และค่า CTCF มีค่าเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสาเหตุของรูปแบบนี้ผู้วิจัยแบ่งออกได้เป็น 2 กรณี ดังนี้ เซลล์ตาย เซลล์ไม่เปิดช่อง. จากรูปที่ 5.15 ก) ในกรณีที่เซลล์ตาย ค่า CTCF จะมีค่ามากและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามเวลา. ในกรณีที่เซลล์ไม่เปิดช่อง ค่า CTCF จะมีค่าน้อยมากจนทำให้แทบไม่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลง. เมื่อพิจารณารูปที่ 5.15 ข) ในทางอุดมคติของทั้ง 2 กรณีควรจะมีค่าความนำไฟฟ้าคงที่ที่ค่าหนึ่งในกรณีที่เซลล์ไม่เกิดการคืนสภาพ แต่กลับมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามเวลา ซึ่งคาดว่า เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลาง.

ผู้วิจัยได้พบการตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์เป็นรูปแบบที่ 1 จำนวน 2 เซลล์ รูปแบบที่ 2 จำนวน 7 เซลล์ และรูปแบบที่ 3 จำนวน 8 เซลล์. โดยสรุปแล้ว เซลล์สามารถตรวจสอบได้มีทั้งหมด 2 เซลล์จาก 17 เซลล์. ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลางไม่สามารถตรวจสอบได้ผลตามที่ตั้งเป้าหมายไว้. นอกจากนี้ ผู้วิจัยสังเกตว่าเงื่อนไขของพัลส์ที่แรงดันไฟฟ้า $3 V_p$ ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 10 ms ที่ได้ใช้ในการทดลองส่วนนี้ อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพโดยถาวรได้. อย่างไรก็ตาม เมื่อลดขนาดแรงดันไฟฟ้าหรือจำนวนลูกคลื่นลง จะไม่สามารถสังเกตการเกิดอิเล็กโทรโพเรชันได้อย่างชัดเจน. ด้วยเหตุนี้ การศึกษาในส่วนนี้ อาจทำโดยทดลองกับเซลล์ชนิดอื่น ซึ่งมีย่านของแรงดันที่กว้างขึ้นสำหรับการกระตุ้นอิเล็กโทรโพเรชัน เพื่อให้สามารถเข้าใจปรากฏการณ์ได้ชัดเจนมากขึ้น.

5.5.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์

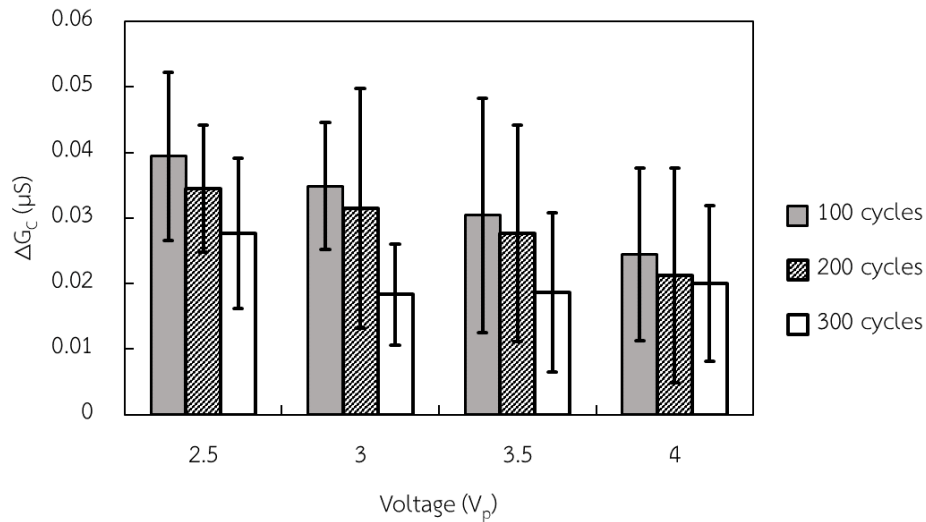
ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะบ่งชี้ขนาดช่องเปิดที่เกิดจากการทำอิเล็กโทรโพเรชัน ด้วยความแตกต่างระหว่างค่าความนำไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึดบริเวณช่องจับเซลล์ (วัดค่าใหม่ทุกครั้งที่เริ่มทดลองกับแต่ละเซลล์) และกรณีหลังป้อนพัลส์ไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยนิยาม

$$\Delta G_C = G \text{ ที่วัดได้ในกรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด} - G \text{ ที่วัดได้หลังป้อนพัลส์ไฟฟ้า} \quad (5.3)$$

การทดลองกระตุ้นเซลล์ที่แรงดันไฟฟ้า 2.5, 3, 3.5 และ 4 V_p . ที่แต่ละระดับแรงดันไฟฟ้า ผู้วิจัยป้อนพัลส์จำนวน 100, 200 และ 300 cycles. ค่าความนำไฟฟ้าถูกตรวจสอบหลังจากป้อนพัลส์ไปแล้ว 30 วินาที. รูปที่ 5.16 แสดง ΔG_C ที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 120 เซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยเงื่อนไขละ 10 เซลล์. ผู้วิจัยนิยาม

$$\Delta G_{WC} = G \text{ ในกรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด} - G \text{ ในกรณีมีเซลล์ถูกจับยึด} \quad (5.4)$$

เพื่อใช้พิจารณาประกอบกับค่า ΔG_C ให้สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ถูกพัลส์กระตุ้นและเซลล์ที่ไม่ถูกพัลส์กระตุ้น.



รูปที่ 5.16 ΔG_C ที่เงื่อนไขการกระตุ้นต่างๆ.

การวัด ΔG_{wc} ของเซลล์จำนวน 10 เซลล์ได้ค่าเฉลี่ยของ ΔG_{wc} เท่ากับ $0.0493 \mu S$ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $0.0112 \mu S$. เมื่อเปรียบเทียบค่า ΔG_{wc} กับ ΔG_C จากผลการทดลอง เราจะเห็นได้ว่า $\Delta G_{wc} > \Delta G_C$ เนื่องจากการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์. จากผลการทดลองในรูปที่ 5.16 เราจะเห็นได้ว่าค่า ΔG_C ลดลงตามแรงดันไฟฟ้าและจำนวนลูกคลื่นที่มากขึ้น ซึ่งจำนวนลูกคลื่นจะส่งผลกระทบต่อเซลล์มากกว่าแรงดันไฟฟ้า. ค่า ΔG_C เริ่มลู่ออกค่าช่วง $0.02 \mu S$ เมื่อเพิ่มระดับแรงดันและลูกคลื่น ซึ่งสื่อความหมายได้ว่าเซลล์เปิดขนาดช่อง (รวมถึงกรณีที่เซลล์ตาย) ได้มากที่สุดที่ ΔG_C ประมาณ $0.02 \mu S$. ค่า ΔG_{wc} มีความแตกต่างกับค่า ΔG_C ประมาณ $0.03 \mu S$ ซึ่งบ่งบอกถึงขนาดการเปิดช่องสูงสุดในรูปแบบความนำไฟฟ้า.

นอกจากนี้ เรายังสามารถนำค่าความนำไฟฟ้า ΔG_{wc} และ ΔG_C มาหาขนาดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ ในรูปแบบพื้นที่ A_{eff} ที่แต่ละด้านของเซลล์ได้ โดยมีสมมติฐานดังนี้ แรงดันตกคร่อมส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ช่องจับเซลล์, เซลล์มีขนาด $12 \mu m$ เท่ากันทุกเซลล์, สภาพนำไฟฟ้าภายในเซลล์ได้รับผลกระทบจากการแพร่เข้าสู่เซลล์ของสารละลายภายนอกเพียงเล็กน้อย A_{eff} คำนวณได้จาก

$$\frac{\Delta G_{wc} - \Delta G_C}{\Delta G_{wc}} = \frac{\sigma_l A_0 - \sigma_c A_{eff}}{\sigma_l A_0} \quad (5.5)$$

เมื่อ A_0 คือ พื้นที่หน้าตัดของช่องยึดจับเซลล์, σ_l และ σ_c คือ สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลาง และสภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึมของเซลล์ ตามลำดับ.

จากสมการที่ (5.5) เราสามารถหาพื้นที่ช่องเปิดสูงสุดได้ด้วยการแทนค่า ΔG_C ต่ำสุด โดยประมาณที่ได้จากกราฟคือ $0.02 \mu\text{S}$ และแทน ΔG_{WC} ที่มีค่าเท่ากับ $0.0493 \mu\text{S}$. A_0 มีค่าเท่ากับ $300 (\mu\text{m})^2$ จากช่องจับเซลล์กว้าง $12 \mu\text{m}$ ถึง $25 \mu\text{m}$. σ_1 มีค่าเท่ากับ 0.05 S/m . σ_c กำหนดให้อยู่ในช่วง 0.1 S/m ถึง 0.5 S/m ซึ่งเป็นค่าทั่วไป เนื่องจากผู้วิจัยไม่ทราบค่าสภาพนำไฟฟ้าที่แน่นอนของไฮโทพลาสซึมของเซลล์ชนิดนี้. ผลการคำนวณที่ได้ คือ A_{eff} อยู่ในช่วงตั้งแต่ $6.09 (\mu\text{m})^2$ ถึง $30.45 (\mu\text{m})^2$. ในความเป็นจริง ช่องเปิดเกิดขึ้นทั้ง 2 ฝั่งของเซลล์ ทำให้เราประมาณพื้นที่ช่องเปิดสูงสุดบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้อยู่ในช่วง $12.18 (\mu\text{m})^2$ ถึง $60.90 (\mu\text{m})^2$. 5.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการวัดค่าอิมพีแดนซ์

ความคลาดเคลื่อนของการวัดค่าอิมพีแดนซ์ที่เกิดขึ้นในวิทยานิพนธ์นี้ เกิดจากสาเหตุดังนี้ ตำแหน่งของสายโพรบ สัญญาณรบกวนภายนอก การเกิดปรากฏการณ์โพลาไรซ์เซชันของอิเล็กโทรดและสารละลาย เป็นต้น. ในการทดลองวัดอิมพีแดนซ์บางการทดลอง ได้มีการปลดสายเข้าออกเพื่อสับเปลี่ยนระหว่างเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์และเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า ทำให้ตำแหน่งของสายหรือความแนบสนิทระหว่างจุดเชื่อมต่อไม่เท่ากัน ซึ่งอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้. นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีเครื่องอิเล็กทรอนิกส์อื่นๆ ค่อนข้างมาก ซึ่งอาจมีสัญญาณรบกวนส่งผลต่อการทดลองได้ ทำให้ค่าที่อ่านได้ในบางช่วงความถี่ไม่นิ่ง. การเกิดปรากฏการณ์โพลาไรซ์เซชันบนอิเล็กโทรดส่งผลให้ค่าความต้านทานไฟฟ้าที่อ่านได้จากเครื่องวัดมีค่าน้อยลง เมื่อวัดที่ความถี่มากขึ้น. ส่วนการเกิดปรากฏการณ์โพลาไรซ์เซชันของสารละลายตัวกลางส่งผลให้ค่าความนำไฟฟ้ามีค่าเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป.

บทที่ 6

สรุป

ระบบของไหลจุลภาคได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้ สำหรับขับเคลื่อนเซลล์ และควบคุมทิศทางสนามไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า เพื่อให้สามารถทำอิเล็กโทรพอเรชันในระบบไฟฟ้าแรงดันต่ำได้. นอกจากนี้ การวิเคราะห์หิมพีแดนซ์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ สำหรับตรวจสอบพฤติกรรมอิเล็กโทรพอเรชันของเซลล์ และสภาพให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ในเชิงปริมาณ.

แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับจับเซลล์ในวิทยานิพนธ์นี้ ซึ่งเงื่อนไขอยู่ในช่วงความถี่ 1 ถึง 5 MHz ด้วยสภาพนำไฟฟ้า 0.05 S/m ตลอดการวิจัย. ในการทดลองจับเซลล์ เซลล์เริ่มตอบสนองต่อแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกที่ระดับแรงดันไฟฟ้าตั้งแต่ 5 V_p เป็นต้นไป ซึ่งผู้วิจัยได้ปรับปรุงแก้ไขอิเล็กโทรดสำหรับการทดลองกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ จากระยะแคบ 350 μm เป็น 200 μm เพื่อให้แรงที่กระทำต่อเซลล์มากขึ้นเมื่อใช้แรงดันไฟฟ้าเท่ากัน. ตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยได้ใช้ทั้งรูปคลื่นไซน์และรูปคลื่นสี่เหลี่ยมในการจับเซลล์ ซึ่งรูปคลื่นสี่เหลี่ยมให้ V_{rms} ที่มากกว่า ส่งผลให้แรงที่กระทำต่อเซลล์มากกว่าเมื่อ V_p เท่ากัน.

การทดลองวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้าแบบเซลล์เดี่ยวได้ทดลองกับเซลล์มาโครฟาจ. จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ค่าความต้านทานจากผลการทดลองต่างจากผลการทดลองค่อนข้างมาก 6 ถึง 7 เท่า จากผลของการดูดซับของเหลวใต้ของ PDMS. ค่า ΔR_c (ความต้านทานไฟฟ้ากรณีมีเซลล์-ไม่มีเซลล์) ได้ถูกนำมาพิจารณาแทน เพื่อให้สามารถระบุเฉพาะเจาะจงเพียงแค่ตัวเซลล์ได้. ค่า ΔR_c จากผลการจำลองและผลการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันที่ 41.419 kΩ และ 45.635 kΩ ตามลำดับ. ค่าความจุไฟฟ้าของเซลล์มีค่าต่ำ ซึ่งทำให้ค่าความจุไฟฟ้าจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมภายนอกเป็นค่าที่เด่นกว่ามาก ทำให้ค่าความจุไฟฟ้าไม่ถูกนำมาพิจารณาในการทดลองวัดหิมพีแดนซ์ต่อไป.

การทดลองอิเล็กโทรพอเรชันแบบเซลล์เดี่ยวด้วยแรงดันต่ำได้ทดลองกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์. จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สีย้อมฟลูออเรสเซนต์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ด้วยไฟฟ้าแรงดันต่ำเพียง 4 V_p โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย. ผู้วิจัยได้ต่อยอดการทดลองนี้ โดยได้ทำการทดลองหาเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชันให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด. การหาประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสมได้ทดลองกับเซลล์ข้างต้น. จากผลการทดลอง ได้ประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบชั่วคราวเท่ากับ 50% จากเซลล์ทั้งหมด 10 เซลล์ ซึ่ง

ประกอบไปด้วย เซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรโพเรชันแบบชั่วคราว 5 เซลล์ เซลล์ที่เกิดอิเล็กโทรโพเรชันแบบถาวร 3 เซลล์ และเซลล์ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง 2 เซลล์. เงื่อนไขการป้อนใช้ที่แรงดันไฟฟ้า $2.5 V_p$, ความถี่ 20 kHz และจำนวนลูกคลื่น 50 cycles โดยป้อนทั้งหมด 15 ครั้ง. 5 ครั้งแรกถูกป้อนที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วินาที ตามลำดับ. 10 ครั้งหลังถูกป้อนที่ 1 ถึง 5.5 นาที โดยป้อนแต่ละครั้งห่างกัน 0.5 นาที. นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้นำสาร ROCK Inhibitor Y-27632 มาใช้กับเซลล์ ซึ่งเป็นสารสำหรับเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์. ผลที่ได้คือประสิทธิภาพการทำอิเล็กโทรโพเรชันแบบชั่วคราวเพิ่มเป็น 90%.

การตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์ทดลองกับเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์. จากผลการทดลอง ผู้วิจัยยังไม่สามารถทำการตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการวัดอิมพีแดนซ์ได้ เนื่องจากค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายมีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสวนทางกับค่าการเปลี่ยนแปลงความนำไฟฟ้าที่เกิดจากการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์. นอกจากนี้ ผู้วิจัยพบว่าเงื่อนไขของพัลส์ที่ใช้ ($3 V_p$, 20 kHz, 10 ms) อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายโดยถาวรได้. ทั้งนี้ เมื่อลดขนาดแรงดันไฟฟ้า หรือจำนวนลูกคลื่นลง การเกิดอิเล็กโทรโพเรชันจะไม่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน. ด้วยเหตุนี้ จึงอาจมีการทดลองกับเซลล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งมีย่านของแรงดันที่กว้างขึ้นสำหรับการกระตุ้นอิเล็กโทรโพเรชันต่อไป.

การตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์สรุปได้ว่า จำนวนลูกคลื่นที่ป้อนมีผลกระทบต่อเซลล์มากกว่าแรงดันไฟฟ้า. ค่าความแตกต่างระหว่างค่าความนำไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึดบริเวณช่องจับเซลล์ และกรณีหลังป้อนพัลส์ไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าต่ำสุดที่ประมาณ $0.02 \mu S$ ซึ่งเป็นค่าที่ขนาดของช่องบนเยื่อหุ้มเซลล์เปิดได้มากที่สุด. ค่า ΔG_{wc} มีความแตกต่างกับค่า ΔG_c ประมาณ $0.03 \mu S$ ซึ่งบ่งบอกถึงขนาดการเปิดช่องสูงสุด. นอกจากนี้ เราสามารถหาพื้นที่ช่องเปิดสูงสุดโดยประมาณได้จากค่า ΔG_{wc} และ ΔG_c ต่ำสุด ซึ่งประมาณพื้นที่ช่องเปิดสูงสุดบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้อยู่ในช่วงตั้งแต่ $12.18 (\mu m)^2$ ถึง $121.8 (\mu m)^2$. ดังนั้นค่า ΔG สามารถนำมาใช้ตรวจสอบขนาดช่องที่เปิดในเชิงปริมาณได้.

ผลการวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้แสดงให้เห็นว่า เราสามารถตรวจสอบสภาพการเปิดช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ในเชิงปริมาณ. เราสามารถหาเงื่อนไขในการทำอิเล็กโทรโพเรชันให้มีประสิทธิภาพสูงได้ด้วยแรงดันต่ำสุดที่ $2.5 V_p$ ในขณะที่งานวิจัยในระบบของไหลจุลภาคส่วนใหญ่ ต้องใช้แรงดันไฟฟ้าประมาณ $10 V_p$ ขึ้นไป [15, 16]. วิทยานิพนธ์นี้ สามารถนำไปพัฒนาสำหรับทดลองกับเซลล์ชนิดอื่นได้ต่อไป.



ภาคผนวก ก

พหุคูณที่มาของตัวประกอบคอลลีเซียส-มอสซอตติของเซลล์สิ่งมีชีวิต

ค่า \mathbf{K} ซึ่งเป็นตัวประกอบคอลลีเซียส-มอสซอตติสำหรับอนุภาค เป็นไปตามสมการ

$$\mathbf{K}(\omega) = \frac{\epsilon_c - \epsilon_l}{\epsilon_c + 2\epsilon_l} \quad (\text{ก.1})$$

เมื่อ ω คือ ความถี่เชิงมุมของแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับ, ϵ_c และ ϵ_l คือ สภาพยอมเชิงซ้อนของอนุภาค และสารละลายตัวกลาง ตามลำดับ.

ในกรณีของเซลล์สิ่งมีชีวิต ค่าสภาพยอมสมมูล ϵ_c เป็น

$$\epsilon_c = C_m R \left[\frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \right] \quad (\text{ก.2})$$

เมื่อ C_m คือ ความจุไฟฟ้าต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์, τ_c คือ สภาพนำไฟฟ้าภายในเซลล์, R คือ รัศมีของเซลล์.

สภาพยอมเชิงซ้อน ϵ_l เป็นไปตามสมการ

$$\epsilon_l = \epsilon_l + \frac{\sigma_l}{j\omega} \quad (\text{ก.3})$$

เมื่อ ϵ_l คือ สภาพยอมของสารละลายตัวกลาง และ σ_l คือ สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลาง.

จากสมการที่ (2.13) และ (2.14) เราจะได้

$$\epsilon_l = \tau_l \sigma_l \quad (\text{ก.4})$$

และ

$$\sigma_l = \frac{C_m R}{\tau'_m} \quad (\text{ก.5})$$

นำสมการ (ก.4) และ (ก.5) แทนลงในสมการ (ก.3) และจัดรูปได้เป็น

$$\epsilon_l = C_m R \left(\frac{j\omega\tau_l + 1}{j\omega\tau'_m} \right) \quad (\text{ก.6})$$

นำสมการ (ก.3) และ (ก.6) แทนลงในสมการ (ก.1) ได้เป็น

$$\mathbf{K}(\omega) = \frac{C_m R \left[\frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \right] - C_m R \left(\frac{j\omega\tau_l + 1}{j\omega\tau'_m} \right)}{C_m R \left[\frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \right] + 2C_m R \left(\frac{j\omega\tau_l + 1}{j\omega\tau'_m} \right)} \quad (\text{ก.7})$$

จัดรูปสมการและตัดพจน์ที่ไม่จำเป็นออก ได้เป็น

$$\mathbf{K}(\omega) = \frac{(j\omega\tau_c + 1)(j\omega\tau'_m) - (j\omega\tau_c + 1)(j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1)}{(j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1)(j\omega\tau'_m)} \quad (\text{ก.8})$$

$$\mathbf{K}(\omega) = \frac{(j\omega\tau_c + 1)(j\omega\tau'_m) - (j\omega\tau_c + 1)(j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1)}{(j\omega\tau_c + 1)(j\omega\tau'_m) + 2(j\omega\tau_c + 1)(j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1)} \quad (\text{ก.9})$$

สุดท้ายได้สมการออกมาในรูป ดังนี้

$$\mathbf{K}(\omega) = - \frac{\omega^2 (\tau_l \tau_m - \tau_c \tau'_m) + j\omega (\tau'_m - \tau_l - \tau_m) - 1 + \omega^2 \tau_l \tau_c - j\omega \tau_c}{\omega^2 (\tau_c \tau'_m + 2\tau_l \tau_m) - j\omega (\tau'_m + 2\tau_l + \tau_m) - 2 + 2\omega^2 \tau_l \tau_c - 2j\omega \tau_c - j\omega \tau_m} \quad (\text{ก.10})$$

พิจารณาสมการ (ก.10) จะเห็นได้ว่ามีพจน์ส่วนเกินเมื่อเทียบกับสมการที่ (2.12). เนื่องจากโดยปกติแล้ว ค่าสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์ σ_c จะมีค่าค่อนข้างมาก ส่งผลให้ค่าคงที่ของเวลาของเซลล์ τ_c มีน้อยกว่าค่าคงที่ของเวลาตัวอื่นๆ มาก ทำให้ในสัจพจน์จินตภาพไม่เป็นจำเป็นต้องนำค่า τ_c มาพิจารณา. ค่าของ τ_l มีค่าน้อยกว่า τ'_m มากเช่นกัน ส่งผลให้เมื่อนำ τ_c ไปคูณกับตัวแปรทั้งสองจะทำให้พจน์ที่เป็น τ_l คูณกับ τ_c มีค่าน้อยกว่ามากๆ จึงทำให้ในสัจพจน์จริง เราไม่จำเป็นต้องพิจารณาพจน์ที่มี τ_l คูณกับ τ_c เป็นตัวประกอบ.

ภาคผนวก ข

การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

1. การหล่อ PDMS สำหรับใช้เป็นช่องทางไหลของสารละลาย

ช่องทางไหลสร้างโดยใช้ฟิล์มไวแสงชนิดลบ (Hitachi Chemical). ขั้นตอนการหล่อดังนี้

- นำกระจกขนาด $52 \times 76 \text{ mm}^2$ นำไปล้างด้วยไอโซโพรพานอลแอลกอฮอล์ในเครื่องล้างอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที.
- ล้างกระจกด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่ากระจกสไลด์ให้แห้ง และนำไปอบไล่ความชื้นบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที.
- นำฟิล์มไวแสงชนิดลบ (Hitachi Chemical) มารีดติดกับแผ่นกระจกด้วยเครื่องรีดลูกกลิ้งความร้อนที่อุณหภูมิ 110°C จากนั้นนำกระจกที่ติดฟิล์มไวแสงอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาที.
- นำกระจกที่ได้ติดฟิล์มไวแสงฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ผ่าน Photomask ที่มีรูปร่างของช่องทางไหลที่ต้องการเป็นเวลา 6 ถึง 7 วินาที ซึ่งขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์ม. ฟิล์มหนา $25 \mu\text{m}$ ใช้ 6 วินาที. ฟิล์มหนา $25 \mu\text{m}$ ใช้ 7 วินาที.
- นำกระจกที่ผ่านการฉายแสงแล้วไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที. จากนั้นนำกระจกที่ได้ไปแช่ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่มีความเข้มข้น 1% โดยมวล เพื่อล้างฟิล์มไวแสงส่วนที่ไม่ใช่ออก.
- นำกระจกที่ได้ไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที.
- นำกระจกที่มีลายช่องทางไหลที่ต้องการไปเคลือบด้วยสารกันติด (ใช้ Barrier Coat No.6 ผสมกับ Toluene ด้วยอัตรา 1 ต่อ 10).
- ตัดยางซิลิโคนความหนา 3 mm เพื่อใช้เป็นแบบหล่อให้มีรูปร่างพอเหมาะ.
- เท PDMS ลงไปในแบบหล่อที่มีกระจกที่เตรียมไว้ติดอยู่ให้เต็ม.
- ปิดทับด้านบนของแม่พิมพ์ด้วยกระจกเปล่าที่เคลือบสารกันติดไว้.
- นำชิ้นงานเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง.
- นำชิ้นงานออกจากตู้อบ จากนั้นตัดชิ้นงานเป็นรูปร่างตามต้องการที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้งานและเจาะรูไว้ใช้สำหรับเป็นทางเข้าและออกของสารละลาย.

- ล้างชิ้นงานด้วยโทลูอีนและไอโซโพรพานอลแอลกอฮอล์อย่างละ 5 นาที.
- นำไปล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่าลมให้แห้ง.

2. การทำอิเล็กทรอนิกส์

การทำอิเล็กทรอนิกส์โดยใช้การโฟโตลิโทกราฟีและการสปีดเตอริง. อิเล็กทรอนิกส์ประกอบมี 2 รูปแบบ แบบที่ประกอบด้วยชั้นของโครเมียมและทอง และแบบโครเมียม.

โฟโตลิโทกราฟี

- เตรียมกระจกขนาด $52 \times 76 \text{ mm}^2$ นำไปล้างด้วยไอโซโพรพานอลแอลกอฮอล์ (Isopropanol Alcohol, IPA) ในเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที.
- ล้างกระจกด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่าให้แห้ง และนำไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เพื่อให้น้ำระเหยออกไป เป็นเวลา 20 นาที.
- เตรียมสารไวแสงชนิดลบ (NR9-3000PY, Futurrex) จากนั้นนำมาเคลือบบนแผ่นกระจกด้วยเครื่องเคลือบผิวตัวอย่างด้วยการปั่นเหวี่ยง (Spin Coater) โดยตั้งความเร็วรอบที่ 500 rpm เป็นเวลา 12 วินาที จากนั้นหมุนต่อด้วยความเร็วรอบที่ 3000 rpm เป็นเวลา 40 วินาที.
- นำกระจกที่ได้เคลือบสารไวแสงแล้วไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 3.5 นาที
- นำกระจกไปฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ผ่าน Photomask ที่มีรูปร่างของอิเล็กทรอนิกส์ที่ต้องการ เป็นเวลา 4 วินาที
- นำกระจกที่ผ่านการฉายแสงแล้ว ไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3.5 นาที
- จากนั้นนำไปล้างด้วย Resist Developer RD6 เป็นเวลา 10 วินาที
- นำไปล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่าให้แห้ง
- นำไปอบบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C 2 นาที จากนั้นอบต่อด้วยอุณหภูมิ 100°C 5 นาที

สปีดเตอริง

- นำกระจกที่ได้ทำโฟโตลิโทกราฟีทำความสะอาดผิวหน้ากระจกด้วยพลาสมา 2 รอบ

- เคลือบชั้นโครเมียมโดยใช้กำลังไฟฟ้า 100 W เป็นเวลา 8 นาที.
- เคลือบชั้นทอง/โครเมียมโดยใช้กำลังไฟฟ้า 100 W เป็นเวลา 8 นาที

เมื่อได้อิเล็คโตรดที่ผ่านการสปัตเตอริงมาแล้ว จากนั้นจึงนำไปล้างฟิล์มไวแสงออกด้วย Resist Remover RR5



ภาคผนวก ค

การเตรียมระบบของไหลจุลภาคเพื่อทำการทดลอง

การเตรียมช่องทางไหลจุลภาคก่อนเริ่มการทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

1. ประกอบชิปจุลภาคเข้ากับแท่นวางแผ่นชิป ซึ่งไว้ใช้สำหรับเชื่อมอิเล็กทรอนิกส์เข้ากับสายโพรบ จากเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์และเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า.
2. ติดตั้งกระบอกฉีดยาขนาด 1 ml และปลายเข็มฉีดยาขนาด 18G เข้ากับปั๊มกระบอกฉีดยา โดยกระบอกฉีดยาบรรจุสารละลายสำหรับทดลองที่ไม่มีเซลล์ผสมอยู่.
3. นำสายยางซิลิโคนขนาด 1 × 2 mm (I.D. × O.D.) ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาและไล่ฟองอากาศ ภายในสายยางซิลิโคนจนหมด จากนั้นนำสายยางซิลิโคนต่อเข้ากับชิปจุลภาค.
4. ตั้งค่าปั๊มกระบอกฉีดยาให้ โดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4.71 mm และรูปแบบการป้อนเป็นแบบดึงกลับ (เฉพาะปั๊มรุ่น NE-1000). ปั๊มรุ่น MR-1 เป็นแบบผลักรูปแบบเดียว. อัตราการไหลเป็น 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.
5. ป้อนสารละลายที่ใช้ในการทดลอง (ไม่ผสมกับเซลล์) เข้าสู่ช่องทางเข้าช่องทางไหลจุลภาค โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในช่องทางไหล. ใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบการไหลของสารละลายภายในช่องทางไหล. ถ้าหากเกิดฟองอากาศภายในช่องทางไหล เราสามารถดูดอากาศออกมาด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ เป็นเวลา 5 นาที.
6. หลังจากที่ได้ป้อนสารละลายเข้าสู่ช่องทางไหลแล้ว จากนั้นรอเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ BSA เคลือบติดกับผิวภายในช่องทางไหล.
7. หลังจากผ่านไป 30 นาที ป้อนสารละลายที่ผสมกับเซลล์สำหรับทดลองเข้าสู่ช่องทางเข้าของช่องทางไหลจุลภาคและเริ่มการทดลอง.

ภาคผนวก ง

การตั้งค่ากล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์สำหรับตรวจสอบสีย้อมที่แพร่เข้าสู่เซลล์

กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์มีการตั้งค่าของทั้งฮาร์ดแวร์และซอฟต์แวร์ ที่ต้องตั้งให้ถูกต้องก่อนการทดลอง. ขั้นตอนการตั้งค่าเป็นดังนี้

ฮาร์ดแวร์

1. เปิดแหล่งกำเนิดแสง (U-HGLGPS, Olympus) และปรับความเข้มของแสง UV ตามที่ต้องการโดยมีที่ระดับ 0%, 3%, 6%, 12%, 25%, 50% และ 100%.
2. ปรับฟิลเตอร์กรองแสง UV ตามที่ต้องการ โดยมีฟิลเตอร์กรองแสงชนิด ND6, ND25 และเลนส์เปล่า. ฟิลเตอร์ ND6 และ ND25 คือให้แสง UV ผ่านได้ 6 และ 25% ตามลำดับ.
3. เลือกฟิลเตอร์สำหรับใช้กับสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์หรือประเภทงานที่ต้องการ โดยฟิลเตอร์มีทั้งหมด 4 ชนิด ดังนี้
 - ฟิลเตอร์หมายเลข 1 (UW) สำหรับใช้กับสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์สีฟ้า.
 - ฟิลเตอร์หมายเลข 2 (BW) สำหรับใช้กับสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวและสีเหลือง.
 - ฟิลเตอร์หมายเลข 3 (GW) สำหรับใช้กับสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์สีแดง.
 - ฟิลเตอร์หมายเลข 4 (BF) สำหรับใช้ในโหมด Bright Field.

ซอฟต์แวร์ cellSens (Standard Version 2.2, Olympus)

1. ตั้งค่าเฟรมเรทของวิดีโอที่ต้องการบันทึกเป็น 25 fps และคุณภาพของวิดีโอเป็น high.
2. ในส่วนของ Exposure ตั้งค่า Exposure time เป็นตามที่ต้องการ. สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยใช้อยู่ในช่วง 10 ถึง 30 ms. Gain ตั้งเป็น 1x.

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบของผลการทดลอง

1. ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าและความจุไฟฟ้า (จากหัวข้อ 5.2.2)

ผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้ามีทั้งหมด 2 กรณี คือ กรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด และกรณีมีเซลล์ถูกจับยึดที่ช่องจับเซลล์. ข้อมูลดิบของผลการทดลองจากรูปที่ 5.6 ในกรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด และกรณีมีเซลล์ถูกจับยึดเป็นดังในตารางที่ จ.1 และ จ.2 ตามลำดับ.

ตารางที่ จ.1 ข้อมูลดิบของผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด.

ความถี่ (kHz)	ความต้านทานที่วัดได้ (k Ω)					ค่าเฉลี่ย (k Ω)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (k Ω)	
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5			
กรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด	10	544.31	534.33	532.29	529.41	525.89	533.24	6.22
	25	536.29	518.05	523.81	518.87	513.22	522.05	7.87
	50	526.04	621.43	439.94	669.97	567.03	564.88	79.20
	75	524.30	512.54	501.52	503.51	513.96	511.17	8.17
	100	498.99	501.33	460.34	499.47	516.62	495.35	18.68

ตารางที่ จ.2 ข้อมูลดิบของผลการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้ากรณีมีเซลล์ถูกจับยึด.

ความถี่ (kHz)	ความต้านทานที่วัดได้ (k Ω)					ค่าเฉลี่ย (k Ω)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (k Ω)	
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5			
กรณีมีเซลล์ถูกจับยึด	10	594.46	600.78	596.08	582.55	585.62	591.90	6.78
	25	599.72	594.95	584.99	583.25	572.83	587.15	9.42
	50	563.33	457.35	690.46	589.47	487.32	557.59	82.09
	75	543.15	583.76	559.70	556.84	535.39	555.77	16.58
	100	471.96	624.05	488.14	605.30	613.92	560.67	66.29

ผลการวัดค่าความจุไฟฟ้ามีทั้งหมด 2 กรณีเช่นเดียวกับผลการวัดความต้านทานไฟฟ้า.
ข้อมูลดิบของผลการทดลองจากรูปที่ 5.7 ในกรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด และกรณีมีเซลล์ถูกจับยึดเป็นดัง
ในตารางที่ จ.3 และ จ.4 ตามลำดับ.

ตารางที่ จ.3 ข้อมูลดิบของผลการวัดค่าความจุไฟฟ้ากรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด.

	ความถี่ (kHz)	ความจุไฟฟ้าที่วัดได้ (pF)					ค่าเฉลี่ย (pF)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (pF)
		เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5		
กรณีไม่มีเซลล์ถูกจับยึด	10	4.42	4.61	4.25	4.38	3.54	4.24	0.37
	25	3.83	3.96	3.62	3.86	3.64	3.78	0.13
	50	5.21	2.96	2.79	4.08	3.26	3.66	0.89
	75	3.55	3.49	3.60	3.53	3.79	3.59	0.10
	100	3.43	3.83	2.41	3.48	3.02	3.23	0.49

ตารางที่ จ.4 ข้อมูลดิบของผลการวัดค่าความจุไฟฟ้ากรณีมีเซลล์ถูกจับยึด.

	ความถี่ (kHz)	ความจุไฟฟ้าที่วัดได้ (pF)					ค่าเฉลี่ย (pF)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (pF)
		เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5		
กรณีมีเซลล์ถูกจับยึด	10	4.75	4.40	4.70	5.10	4.76	4.74	0.22
	25	4.13	4.23	4.41	4.39	4.35	4.30	0.11
	50	4.25	4.68	4.15	3.58	4.22	4.18	0.35
	75	3.88	4.08	3.99	3.84	3.82	3.92	0.10
	100	3.76	3.37	3.45	4.40	4.43	3.88	0.45

2. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า CTCF ของเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ตามเวลาหลังกระตุ้นด้วยพัลส์ไฟฟ้า (จากรูปที่ 5.9)

ข้อมูลดิบของผลการเปลี่ยนแปลงค่า CTCF จากการตรวจสอบความเข้มสีของฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา หลังจากถูกกระตุ้นด้วยพัลส์ กระตุ้นการเกิดอิเล็กโทรพอเรชัน เป็นดังในตารางที่ จ.5. ค่า CTCF คำนวณได้จาก $CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$ ซึ่งค่าต่างๆ ได้มาจากโปรแกรม ImageJ.

ตารางที่ จ.5 ข้อมูลดิบของผลการเปลี่ยนแปลงค่า CTCF จากรูปที่ 5.9.

เวลา (min)	CTCF
1	3.729
2	4.459
3	5.234
4	6.016
5	6.621

3. ผลการตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอิมพีแดนซ์ (จากหัวข้อ 5.5.1)

ผลการตรวจสอบการคืนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยความนำไฟฟ้า แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ดังนี้ ลดลงแล้วอิมพัท พาราโบล่าหงาย และเพิ่มขึ้นตามเวลา. ข้อมูลดิบของค่า CTCF และ G_{pmin} รูปแบบลดลงแล้วอิมพัทเป็นดังในตารางที่ จ.6 และ จ.7 ตามลำดับ. ข้อมูลดิบของค่า CTCF และ G_{pmin} รูปแบบพาราโบล่าหงายเป็นดังในตารางที่ จ.8 และ จ.9 ตามลำดับ. ข้อมูลดิบของค่า CTCF และ G_{pmin} รูปแบบเพิ่มขึ้นตามเวลาเป็นดังในตารางที่ จ.10 และ จ.11 ตามลำดับ. ข้อมูลดิบของผลการเพิ่มขึ้นตามเวลาของความนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลางที่วัดได้เป็นดังในตารางที่ จ.12.

ตารางที่ จ.6 ข้อมูลดิบของค่า CTCF รูปแบบความนำไฟฟ้าลดลงแล้วอิมิตัวจากรูปที่ 5.12 ก)

เวลา (min)	CTCF	
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2
0	0	0
0.5	327412	76099
2	493891	262146
4	544949	397529
6	527078	393204
8	553822	406578
10	518922	374696

ตารางที่ จ.7 ข้อมูลดิบของ G_{pmin} รูปแบบลดลงแล้วอิมิตัวจากรูปที่ 5.12 ข)

เวลา (min)	G_{pmin}	
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2
0.5	1.00230	1.01747
1	1.00685	1.01341
2	1.00438	1.00909
3	1.00248	1.00591
4	1.00155	1.00325
5	1.00097	1.00171
6	1.00070	1.00143
7	1.00000	1.00000
8	1.00068	1.00025
9	1.00143	1.00079
10	1.00167	1.00123

ตารางที่ จ.8 ข้อมูลดิบของค่า CTCF รูปแบบความนำไฟฟ้าพาราโบล่าหงายจากรูปที่ 5.13 ก)

เวลา (min)	CTCF						
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5	เซลล์ที่ 6	เซลล์ที่ 7
0	32342	16845	661	8122	41879	49301	13703
0.5	55184	128150	35358	223882	95840	95527	321490
2	112666	176731	51109	357129	228866	66371	455803
4	157993	179992	39075	462801	318020	63485	562402
6	216708	168751	94697	523760	418620	34761	664187
8	233244	172233	62364	566613	547851	65548	762265
10	246963	170480	77056	682081	699011	67395	858005

ตารางที่ จ.9 ข้อมูลดิบของ G_{pmin} รูปแบบพาราโบล่าหงายจากรูปที่ 5.13 ข)

เวลา (min)	G_{pmin}						
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5	เซลล์ที่ 6	เซลล์ที่ 7
0.5	1.02320	1.00600	1.01528	1.00847	1.00303	1.00378	1.00664
1	1.01141	1.00108	1.00712	1.00571	1.00001	1.00230	1.00000
2	1.00063	1.00379	1.00364	1.00272	1.00000	1.00000	1.00028
3	1.00000	1.00000	1.00109	1.00223	1.00036	1.00297	1.00204
4	1.00404	1.00062	1.00040	1.00000	1.00200	1.00420	1.00348
5	1.00602	1.00355	1.00000	1.00214	1.00347	1.00610	1.00342
6	1.00670	1.00485	1.00362	1.00298	1.00353	1.00745	1.00518
7	1.00971	1.00514	1.00679	1.00486	1.00642	1.01066	1.00571
8	1.00896	1.00849	1.00742	1.00708	1.01287	1.01315	1.00884
9	1.01152	1.00848	1.00961	1.00967	1.01523	1.01848	1.00977
10	1.01461	1.01198	1.00624	1.01660	1.02064	1.02148	1.01089

ตารางที่ จ.10 ข้อมูลดิบของค่า CTCF รูปแบบความนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามเวลาจากรูปที่ 5.15 ก)

เวลา (min)	CTCF							
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5	เซลล์ที่ 6	เซลล์ที่ 7	เซลล์ที่ 8
0	5703	79514	0	0	19515	0	0	2472
0.5	69345	99999	355927	21791	367788	319040	337881	0
2	108111	101770	623222	220331	940408	757633	972446	24642
4	151596	111001	649636	322232	1237632	1132943	1626263	19099
6	208558	97475	739283	336477	1352190	1251172	1893163	543
8	245852	88425	851922	349627	1378047	1358270	1844528	0
10	274848	102964	940059	366684	1389685	1619697	1898680	0

ตารางที่ จ.11 ข้อมูลดิบของ G_{pmin} รูปแบบเพิ่มขึ้นตามเวลาจากรูปที่ 5.15 ข)

เวลา (min)	G_{pmin}							
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5	เซลล์ที่ 6	เซลล์ที่ 7	เซลล์ที่ 8
0.5	1.0007	1.0000	1.0000	1.0081	1.0000	1.0003	1.0000	1.0004
1	1.0000	1.0024	1.0011	1.0000	1.0031	1.0000	1.0028	1.0000
2	1.0033	1.0047	1.0029	1.0138	1.0032	1.0024	1.0063	1.0027
3	1.0039	1.0071	1.0041	1.0162	1.0034	1.0023	1.0074	1.0043
4	1.0056	1.0090	1.0054	1.0144	1.0045	1.0034	1.0105	1.0071
5	1.0079	1.0103	1.0057	1.0189	1.0040	1.0042	1.0134	1.0083
6	1.0087	1.0117	1.0067	1.0161	1.0053	1.0058	1.0182	1.0107
7	1.0124	1.0116	1.0080	1.0194	1.0066	1.0069	1.0220	1.0136
8	1.0159	1.0109	1.0086	1.0196	1.0063	1.0069	1.0257	1.0141
9	1.0171	1.0095	1.0087	1.0222	1.0064	1.0071	1.0307	1.0165
10	1.0218	1.0071	1.0072	1.0238	1.0066	1.0075	1.0351	1.0175

ตารางที่ จ.12 ข้อมูลดิบของผลการวัดค่า G_{pmin} จากรูปที่ 5.14

เวลา (min)	G_{pmin}				
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5
0.5	0.9364	0.9572	1.0225	1.0707	1.3306
1	0.9371	0.9574	1.0259	1.0729	1.3337
2	0.9379	0.9575	1.0283	1.0764	1.3368
3	0.9387	0.9577	1.0303	1.0798	1.3394
4	0.9400	0.9591	1.0324	1.0840	1.3418
5	0.9409	0.9609	1.0340	1.0898	1.3427
6	0.9428	0.9629	1.0361	1.0929	1.3467
7	0.9462	0.9653	1.0395	1.0992	1.3507
8	0.9504	0.9677	1.0428	1.1032	1.3520
9	0.9537	0.9722	1.0492	1.1076	1.3545
10	0.9561	0.9755	1.0529	1.1119	1.3603

4. ผลการตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดด้วยอิมพีแดนซ์ (จากหัวข้อ 5.5.2)

ผู้วิจัยได้แบ่งข้อมูลดิบของผลการตรวจสอบความสัมพันธ์ของขนาดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยค่าความนำไฟฟ้าเป็น 3 กรณี ดังนี้ กรณีที่ใช้จำนวนลูกคลื่น 100, 200 และ 300 ลูกคลื่น โดยแสดงดังในตารางที่ จ.13, จ.14 และจ.15 ตามลำดับ.

ตารางที่ จ.13 ข้อมูลดิบจากผลการทดลองรูปที่ 5.16 ในกรณีที่ป้อนด้วย 100 ลูกคลื่น

เซลล์ที่	ΔG_c (μS)			
	ที่ 2.5 Vp	ที่ 3 Vp	ที่ 3.5 Vp	ที่ 4 Vp
1	0.0503	0.0347	0.0270	0.0064
2	0.0401	0.0399	0.0392	0.0386
3	0.0503	0.0264	0.0156	0.0147
4	0.0037	0.0315	0.0343	0.0079
5	0.0366	0.0281	0.0362	0.0241
6	0.0434	0.0517	0.0658	0.0269
7	0.0487	0.0159	0.0258	0.0123
8	0.0433	0.0368	0.0060	0.0306
9	0.0377	0.0367	0.0491	0.0350
10	0.0401	0.0469	0.0055	0.0479
ค่าเฉลี่ย	0.0394	0.0349	0.0304	0.0245
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0128	0.0097	0.0179	0.0132

ตารางที่ จ.14 ข้อมูลดิบจากผลการทดลองรูปที่ 5.16 ในกรณีที่ป้อนด้วย 200 ลูกคลื่น

เซลล์ที่	ΔG_c (μS)			
	ที่ 2.5 Vp	ที่ 3 Vp	ที่ 3.5 Vp	ที่ 4 Vp
1	0.0418	0.0149	0.0149	0.0097
2	0.0419	0.0320	0.0496	0.0093
3	0.0439	0.0602	0.0464	0.0052
4	0.0413	0.0295	0.0087	0.0136
5	0.0415	0.0183	0.0247	0.0111
6	0.0297	0.0282	0.0110	0.0484
7	0.0358	0.0709	0.0524	0.0263
8	0.0348	0.0254	0.0082	0.0126
9	0.0181	0.0103	0.0234	0.0215
10	0.0157	0.0250	0.0372	0.0552
ค่าเฉลี่ย	0.0345	0.0315	0.0276	0.0213
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0097	0.0184	0.0166	0.0164

ตารางที่ จ.15 ข้อมูลดิบจากผลการทดลองรูปที่ 5.16 ในกรณีที่ป้อนด้วย 300 ลูกคลื่น

เซลล์ที่	ΔG_c (μS)			
	ที่ 2.5 Vp	ที่ 3 Vp	ที่ 3.5 Vp	ที่ 4 Vp
1	0.0090	0.0171	0.0163	0.0104
2	0.0333	0.0270	0.0470	0.0162
3	0.0279	0.0133	0.0230	0.0142
4	0.0484	0.0148	0.0133	0.0055
5	0.0301	0.0369	0.0113	0.0067
6	0.0265	0.0224	0.0070	0.0340
7	0.0407	0.0134	0.0349	0.0410
8	0.0102	0.0113	0.0125	0.0184
9	0.0266	0.0125	0.0118	0.0183
10	0.0236	0.0145	0.0094	0.0351
ค่าเฉลี่ย	0.0276	0.0183	0.0187	0.0200
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0114	0.0077	0.0122	0.0118

บรรณานุกรม

1. Kim, K. and W.G. Lee, *Electroporation for nanomedicine: a review*. J Mater Chem B, 2017. **5**(15): p. 2726-2738.
2. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-73.
3. Tan, Q., et al., *Quantification of the specific membrane capacitance of single cells using a microfluidic device and impedance spectroscopy measurement*. Biomicrofluidics, 2012. **6**(3): p. 34112.
4. Gawad, S., L. Schild, and P.H. Renaud, *Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing*. Lab Chip, 2001. **1**(1): p. 76-82.
5. Bernabini, C., D. Holmes, and H. Morgan, *Micro-impedance cytometry for detection and analysis of micron-sized particles and bacteria*. Lab Chip, 2011. **11**(3): p. 407-12.
6. Du, E., et al., *Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states*. Lab Chip, 2013. **13**(19): p. 3903-3909.
7. Techaumnat, B. and M. Washizu, *Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2007. **40**(6): p. 1831-1837.
8. Jones, T.B., *Basic Theory of Dielectrophoresis and Electrorotation*. IEEE Eng. Med. Biol. Mag., 2003. **22**: p. 33-42.
9. Jones, T.B., *Electromechanics of Particles*. 1995.
10. Zimmermann, U., *Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena*. Biochim. Biophys. Acta., 1982. **694**: p. 227-277.
11. Arnold, U.Z.a.W.M., *Biophysics of electroinjection and electrofusion*. Journal of Electrostatics, 1998. **21**: p. 309-345.
12. Techaumnat, B., et al., *High-yield electrofusion of biological cells based on field tailoring by microfabricated structures*. IET Nanobiotechnol, 2008. **2**(4): p. 93-9.
13. Kurosawa, O., et al., *Electroporation through a micro-fabricated orifice and its*

application to the measurement of cell response to external stimuli.

Measurement Science and Technology, 2006. **17**(12): p. 3127-3133.

14. Guo, X. and R. Zhu, *Controllable in-situ cell electroporation with cell positioning and impedance monitoring using micro electrode array.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 31392.
15. Ghosh, J., X. Liu, and K.D. Gillis, *Electroporation followed by electrochemical measurement of quantal transmitter release from single cells using a patterned microelectrode.* Lab Chip, 2013. **13**(11): p. 2083-90.
16. Dong, Z., et al., *Advanced microfluidic devices for cell electroporation and manipulation,* in *Micro and Nano Systems for Biophysical Studies of Cells and Small Organisms.* 2021. p. 105-123.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Patcharapon Kangwarnchokchai
วัน เดือน ปี เกิด	27 July 1995
สถานที่เกิด	Chonburi
วุฒิการศึกษา	King mongkut's institute of technology ladkrabang
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 16 ซอย 12 ถนน ลงหาดบางแสน ตำบล แสนสุข อำเภอ เมือง จังหวัด ชลบุรี 20130
ผลงานตีพิมพ์	พัชรพล กังวาลโชคชัย และ บุญชัย เตชะอำนาจ, “การศึกษาอิเล็กทรอนิกส์โพเร ชั้นแบบเซลล์เดี่ยวของเซลล์มะเร็งสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ด้วยแรงดันต่ำใน ระบบของไหลจุลภาค”, การประชุมวิชาการทางวิศวกรรมไฟฟ้าครั้งที่ 44 (EECON-44), 2021.