รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคสำหรับคัดแยก จัดเก็บ และเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในรูปเซลล์เดี่ยว เพื่อศึกษาพฤติกรรมทางชีวภาพเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัข

โครงการวิจัยต่อเนื่องปีที่ 2

Developments of microfluidics-based devices for single cell isolation, trapping and culturing single cancer cells for biological behavior study of canine round cell tumors"

(2nd Year)

โครงการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

ประเภทผลผลิตเพื่อสร้างองค์ความรู้ โครงการวิจัยพื้นฐาน

เงินอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2561

หน่วยงานดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยประกอบด้วยหน่วยงานดำเนินการวิจัยหลักจำนวน 5 หน่วยงานได้แก่

1. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอีเลกทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเลคทรอนิคส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
5. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเภทโครงการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน โดยมีการประยุกต์ความรู้ทางวิศวกรรมศาสตร์ขั้นสูง ได้แก่ ไมโครอิเล็กทรอนิกส์ และวิศวกรรมศาสตร์เครื่องกลในส่วนของระบบการไหลระดับจุลภาค บูรณาการเข้ากับความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อสร้างองค์ความรู้เชิงบูรณการทางชีววิทยาระดับเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขเป็นต้นแบบ องค์ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ต้นแบบ ใช้ในการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและพยาธิกำเนิดในการเกิดโรคมะเร็ง ทั้งในมนุษย์และสัตว์ในระดับที่สูงขึ้นต่อไป โดยโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัยต่อเนื่องปี 2560-2561 เงินอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2561

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยในสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน ประเภทผลผลิตเพื่อสร้างองค์ความรู้

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไศละสูต	หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

รองหัวหน้าโครงการ

ผศ. น.สพ. ดร. ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล	หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นักวิจัย

รศ.น.สพ.ดร.ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์	หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร. อลงกรณ์ พิมพ์พิณ	ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร. วีระยุทธ ศรีธุระวานิช	ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศิริ	ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์ และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ
นาย วิศรุต ศรีพุ่มไข่	ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ดร. วิน บรรจงปรุ	ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
นายจักรพงษ์ ศุภเดช	ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ
นายจิรวัฒน์ จันต๊ะวงค์	ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ

นาย ชาญเดช หรูอนันต์ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ

อ.ดร. มยุรี ชนะสกุลนิยม ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	10
บทนำและที่มาของโครงการ	13
ขอบเขตซองโครงการวิจัย	18
ทฤษฎี สมมุติฐานและวัตถุประสงค์การวิจัย	16
ทบทวนวรรณกรรม	19
โครงการย่อยที่ 1	25
สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 1	39
โครงการย่อยที่ 2	41
สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 2	53
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	57
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี	57
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	

สารบัญรูปและตาราง

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงถึงปัจจัยทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) ที่สำคัญได้แก่ แรงเฉื่อย (inertial force) และโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ที่ทำให้เกิดการกระจายการไหล (perfusion flow) ของของไหล ตัวกลางและ ผลของแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity) ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่กระจายตัวอยู่ในชั้นการไหล ในระดับต่างๆในระบบของไหลจุลภาค (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)	25
รูปที่ 2	แสดงผลการศึกษาการจำลองการไหลของของไหลตัวกลางด้วยคอมพิวเตอร์ ที่ศึกษาโดย Park และ คณะในปี 2010 ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีของไหลตัวกลางที่มีระดับชั้นการไหลที่อยู่ชิดกับหลุมเพาะเลี้ยงไหล (microwell) และเคลื่อนที่ผ่านหลุมเพาะเลี้ยง ของไหลตัวกลางในระดับชั้นการไหลดังกล่าวจะมี การเคลื่อนที่ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของของไหลตัวกลางมีการเคลื่อนที่แบบหมุน และส่งผลให้อนุภาคและเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆบริเวณหลุมเพาะนั้นๆไหลลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงได้ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)	26
รูปที่ 3	แสดงผลการศึกษาของ Park และคณะ ที่ทำการจำลองการเกิดการไหลแบบหมุนเวียนของของไหล ตัวกลาง (recirculation flow) ด้วยคอมพิวเตอร์ที่เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิต (geometry) แบบต่างๆ ผลของการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ จะมีผลต่อ ความแรงในการเกิดการไหลแบบหมุนเวียน โดยที่หลุมเพาะเลี้ยงแบบรูปสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบ หมุนวนได้แรงที่สุดเมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงอื่นๆ ได้แก่ วงกลม (circle) สี่เหลี่ยมจัตุรัส (square) รูป สามเหลี่ยม (diamond) และรูปกรวย (cone) (ทีมา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)	27
รูปที่ 4	แสดงอิทธิพลของรูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงที่มีต่อความน่าจะเป็นในการดักจับเซลล์ให้อยู่ ในหลุมเพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 1: 1 (single trapping efficacy หรือ S.T.E.) โดยพบว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรง ทางเรขาคณิตแบบสามเหลี่ยมนั้นมีค่า S.T.E. สูง ดังนั้นจึงประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เพียงเซลล์เดียว รวมทั้ง ป้องกันการไหลของเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณหลุมเพาะเลี้ยง	28

	ที่มีเซลล์บรรจุอยู่แล้วได้ดีกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรง แบบวงกลมและสี่เหลี่ยมจตุรัส (ทีมา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)	
รูปที่ 5	แสดงขั้นตอนในการสร้างและประกอบ (fabrication) อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ดักจับเซลล์ด้วย เทคนิค soft-lithography ซึ่งแม่พิมพ์จะถูกสร้างด้วยแผ่นเวเฟอร์ชนิดซิลิกอน (silicon wafer) ที่ใช้ในการสร้าง ชิ้นส่วนอุปกรณ์อิเลคทรอนิกส์ชนิดวงจรรวม (IC) และตัวอุปกรณ์ถูกสร้างด้วยสารโพลีเมอร์ชนิด polydimethyl siloxane (PDMS) และชิ้นส่วนของอุปกรณ์แต่ละส่วนจะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน (oxygen plasma)	30
รูปที่ 6	เป็นภาพจำลองการติดตั้งอุปกรณ์ (instrumentation) ที่ใช้ในการทดลองเพื่อดักจับเซลล์ โดยอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างขึ้นมา โดยอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง กล้องบันทึกภาพวีดีโอแบบดิจิตอล ชุดเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ทำการประมวลผลภาพ โดยที่อุปกรณ์จะถูกวางลงบนกล้องจุลทรรศน์และเชื่อมปลายด้านหนึ่งของอุปกรณ์เข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์ และในส่วนของช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่ต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้	31
รูปที่ 7	แสดงความเป็นไปได้และลักษณะของการไหลวนของของเหลวตัวกลาง (recirculation flow) ที่ เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ที่ได้จากการจำลองด้วยระบบคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม COMSOLTM Multiphysics	32
รูปที่ 8	แสดงภาพแบบภาพพิมพ์เขียว (blueprint) ที่เขียนแบบด้วยโปรแกรม AutoCADTM ซึ่งแบบพิมพ์เขียวที่ได้จะนำไปใช้สร้างแม่พิมพ์ซิลิกอน (silicon mold) ที่ใช้สำหรับสร้างและประกอบอุปกรณ์ต่อไป ลักษณะของอุปกรณ์ประกอบไปด้วยสองส่วนหลักที่ถูกเชื่อมติดกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน ซึ่งส่วนประกอบหลักทั้งสองส่วนได้แก่ ส่วนที่เป็นช่องการหลัก (main flow channel) ซึ่งทำหน้าที่เป็น ช่องผ่านเข้าออกของของไหลตัวกลางและเซลล์	33
รูปที่ 9	แสดงการเรียงตัวของชุดหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม (triangular microwell array) ที่อยู่ที่พื้น ด้านล่างของอุปกรณ์ ที่ทำหน้าที่ดักจับเซลล์ โดยแต่ละหลุมเพาะเลี้ยงในแต่ละแถวจะอยู่ห่างกัน 40 μm ส่วนขนาดของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุมจะมีขนาดความยาวของด้านสามเหลี่ยมเท่ากับ 40 μm และมีความลึกเท่ากับ 30 μm ตามลำดับ	34

รูปที่ 10	แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างและประกอบขึ้นมาด้วยเทคนิค softlithography ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยภาพขยายจะแสดงให้เห็นถึงชุดของหลุมเพาะเลี้ยงรูปสามเหลียมที่ จัดเรียงตัวอยู่ในส่วนที่สองของอุปกรณ์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์	35
รูปที่ 11	แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งมาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านหน้าของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 200X) โดยเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์จะมีสักษณะรูปทรงกลมไม่ติดสีอยู่ในหลุม	36
รูปที่ 12	แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณตรงกลางของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 200X)	37
รูปที่ 13	แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านท้ายของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 100X)	38
รูปที่ 14	แสดงภาพพื้นที่บริเวณที่ทำการนับเซลล์ในอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น	42
รูปที่ 15	แสดงภาพลักษณะของเซลล์ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์ โดยมีทั้งเซลล์เดี่ยว (ลูกศร) และหลายเซลล์ (หัวลูกศร)	44
รูปที่ 16	แสดงภาพผลการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอุปกรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี (ลูกศร) แต่เซลล์ตายจะย้อมติดสีฟ้า (หัวลูกศร)	45
รูปที่ 17	แสดงภาพผลการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอุปกรณ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี (ลูกศร) แต่เซลล์ตายจะย้อมติดสีฟ้า (หัวลูกศร)	45
รูปที่ 18	แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มีชีวิต (จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์) ที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในเวลาก่อนการทดลอง (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM) $p<0.05$)	48
รูปที่ 19	แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ($p<0.05$)	49
รูปที่ 20	แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)	50
รูปที่ 21	แสดงภาพลักษณะของเซลล์ cMCT ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์	52

รูปที่ 22 แสดงภาพลักษณะของเซลล์ cMCT ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์ ในชั่วโมงที่ 72 พบว่าเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจากเดิมและพบเซลล์ตาย (ลูกศร) 53

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในที่พบในแต่ละช่วงของอุปกรณ์ พบเซลล์ถูกจับเป็น ลักษณะเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่ด้านหลังและด้านหน้าของอุปกรณ์ ค่าเฉลี่ยเซลล์เดี่ยวที่ดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลม ได้ร้อยละ 30 38

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาค ในปีที่ 1 เพื่อคัดแยกและจัดเก็บเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขให้ อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยว มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่สามารถจำแนกเซลล์มะเร็งออกจากกันโดยทำให้เซลล์มะเร็ง เกิดการเคลื่อนที่เป็นสายกระแสการไหลตามขนาดของเซลล์มะเร็งและแยกออกจากกันตามขนาดของเซลล์มะเร็งแต่ละเซลล์ องค์ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ในการออกแบบอุปกรณ์ในระบบการไหลจุลภาคที่มีประสิทธิภาพ ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งให้ถูกจัดเรียงออกมาใน ลักษณะเซลล์เดี่ยวๆเพื่อพัฒนาการะเพาเลี้ยงต่อเนื่อง ในปีที่ 2 ศึกษาและพัฒนาอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถใช้ดักจับเซลล์ที่อยู่ในสารแขวนลอยของเซลล์ (cell suspension) โดยให้เซลล์เหล่านั้นอยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆและกลุ่มย่อยให้มีชีวิตอยู่ได้ พัฒนาเทคนิคต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงบนอุปกรณ์ โดยใช้ เซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ (Mast cell tumor) เป็นรูปแบบการศึกษา

โครงการในปีที่ 1 นี้ประกอบด้วย 2 โครงการย่อย ดังนี้ <u>โครงการย่อยที่ 1</u> การสร้างอุปกรณ์ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค โดยพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่ประยุกต์ความรู้เชิงฟิสิกส์ ของระบบของไหลจุลภาคควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของเซลล์ โดยอุปกรณ์ที่ได้จะประกอบไปด้วยท่อสำหรับของไหลที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของท่ออยู่ที่ 130 ไมโครเมตร มีความกว้างเท่ากับ 500 μm ท่อทั้งหมดจะขดเป็นรูปวงกลมจำนวน 5 วง และมีระยะห่างระหว่างวงรอบ (interspace) ที่อยู่ติดกันอยู่ที่ 500 μm โดยมีรัศมีรวมของความโค้งของท่อทั้งหมดอยู่ที่ 10 มิลลิเมตร และมีอัตราส่วนของขนาดของอนุภาคที่ใช้ศึกษาแต่ละขนาดต่อความสูงของท่อ (a_p/H) มากกว่าหรือ เท่ากับ 0.07 โดยพบว่าเซลล์มะเร็งชนิดกลมในสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ ขนาดของมาสต์เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 μm และมากกว่า พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะออกมาในท่อของอุปกรณ์ได้ ผลของเซลล์มะเร็งที่ออกมาจากท่อมีจำนวนลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง รวมทั้งร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต อยู่หลังจากผ่านอุปกรณ์แยกเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 30 เนื่องจากแรงเหวี่ยงในท่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสมดุลย์และสูญเสียนท่อของอุปกรณ์อย่างชัดเจน ซึ่งควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการทำงาน และผลกระทบของเซลล์ในท่อต่อไป **<u>โครงการย่อยที่ 2</u> การสร้างอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค** โดยออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคที่มีหลุมเพาะเลี้ยงอยู่ที่พื้นของอุปกรณ์ เพื่อใช้ดักจับเม็ดโพลีสไตรีนจำลองขนาดของเซลล์และเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ลงหลุมเพาะเลี้ยง และอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ภายในของของ ไหล (internally physical property) ในการพาเซลล์

ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ที่สามารถนำมาใช้ดักจับอนุภาคที่แขวนลอยในของไหลตัวกลางได้ ตามหลักทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) โดย Park และคณะ (2010) เป็นปัจจัยในการพิจารณา โดยหลักการทำงานของอุปกรณ์จะเป็นการทำงานโดยที่ไม่ต้องใช้สนามของแรงจากภายนอก (external force field) เป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่ของอนุภาค รวมทั้งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลตัวกลาง จะมีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนการไหลของของไหลตัวกลางด้วย แรงเฉื่อย (inertial force) การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ในขณะที่อนุภาค เคลื่อนที่ อนุภาคแต่ละตัวจะถูกดึงให้ตกลงสู่พื้นล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force) ที่ กระทำต่ออนุภาค เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยง อนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation force) ของ ของไหลตัวกลางเกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยง นอกจากนี้พบว่ารูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบสามเหลี่ยม จะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่มีความแรงที่สุด และดักจับดีที่สุด อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาใน ครั้งนี้ ได้ถูกประกอบด้วยวิธี soft-lithography โดยใช้ PDMS ทำหน้าที่เป็นโครงของอุปกรณ์ โดยพบว่าอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี (กำหนดไว้ที่ ร้อยละ 45) และพบว่าคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ อย่างไรก็ตามในอนาคตยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง ผลกระทบของวัสดุ (PDMS) ที่ใช้ทำอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นต้น ทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ที่สูงขึ้นและมีชีวิตอยู่ ก่อนที่จะนำอุปกรณ์นี้มาประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์และเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขเป็นรูปแบบการศึกษาในปีที่ 2

โครงการปีที่ 2 ประกอบด้วย 2 โครงการย่อย ดังนี้ <u>โครงการย่อยที่ 1</u> การพัฒนาประสิทธิภาพอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค ศึกษาทบทวนระบบอุปกรณ์ดักจับให้มีผลกระทบกับเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมาจะประกอบไปด้วยสองส่วนหลักได้แก่ ช่องการไหลหลัก (main flow channel) สำหรับให้ของไหล ตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูง ของช่อง 70 μm และมีความกว้าง 500 μm โดยที่ปลายของอุปกรณ์ด้านหนึ่งจะต่อกับช่องทางเข้า inlet) จำนวน 1 ช่องและช่องทางออก (outlet) จะอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของอุปกรณ์ ภายหลังที่ติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับระบบ ควบคุมแล้ว โดยในนำผลชั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 ml/hr อย่างต่อเนื่องเพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่

ประกอบขึ้นมีความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้ ประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 30 ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากผลการทดลองทั้งหมด โดยพบว่าอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี (กำหนดไว้ที่ ร้อยละ 45) และพบว่าคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ยังมีชีวิตอยู่

<u>โครงการย่อยที่ 2</u> การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอุปกรณ์บนอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค และการตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ในอุปกรณ์ โดยการการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ ของเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวลิมโฟไซท์ชนิดเฉียบพลันของมนุษย์ (human acute T-cell leukemia) ชนิด Jurkat cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลมคล้ายคลึงกับเซลล์ในอุดมคติ (ideal cell) และ **การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข** จากการทดสอบความมีชีวิตอยู่ (viability) ของเซลล์ Jurkat cell line ที่เพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมาในครั้งนี้ ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% พบว่า Jurkat cell line ที่ถูกเพาะเลี้ยงสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าว **ส่วนการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข** ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidics-based device) สามารถนำมาใช้ดักจับเซลล์ cMCT ที่มีขนาดในช่วง 10-20 μm ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่สามารถเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในระยะยาวได้ ระยะเวลาที่เหมาะสมอยู่ในระหว่าง 24-48 ชั่วโมงในการศึกษาเซลล์ อาจเนื่องจากมีสภาพสิ่งแวดล้อมระดับจุลภาคไม่เหมาะสม เช่น เซลล์ขาดการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-cell communication) เซลล์อาจมีความต้องการสารประเภทโกรทแฟคเตอร์ (growth factors) และปัจจัยที่ช่วยในการดำรงชีพ (survival factors) ต่าง ๆ จากเซลล์ข้างเคียง อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงอุปกรณ์ไปในอนาคต เพื่อทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์และเพาะเลี้ยงที่สูงขึ้นต่อไป

บทนำและที่มาของโครงการ

โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการเจริญและงอกขยายที่ผิดปกติ (abnormal proliferation and overgrowth) ของเซลล์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่มีความสำคัญในลำดับต้นๆ ทั้งในมนุษย์และในสัตว์เลี้ยง และมีอุบัติการณ์ (incidence) ในการเกิดโรคที่มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และยังไม่มีวิธีการใดๆที่ใช้ในการรักษาโรคดังกล่าวให้หายขาดได้ในปัจจุบัน

เนื่องจากพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของโรคเนื้องอกและมะเร็งนั้น ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานยืนยันแสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ มักมีการเกิดการ กลายพันธุ์ (mutant gene) เกิดขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอันหนึ่งที่ส่งผลให้เซลล์ที่มียีนที่ผิดปกติเหล่านี้สามารถเกิด การเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นนั้นมักจะไม่ได้เกิดขึ้นมาจากเซลล์หลายๆเซลล์พร้อมๆกันใน เนื้อเยื่อที่เกิดโรค แต่มักจะเกิดขึ้นจากเซลล์ร่างกายเพียงเซลล์เดียว (single cell) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกิดการสะสมความผิดปกติทางพันธุกรรมไว้ภายในเซลล์ ทำให้มีการแบ่งเซลล์และงอกขยายของเซลล์ที่ผิดปกติจนไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นสิ่งที่สำคัญคือ จะต้องพิจารณาว่าเซลล์ใดที่เป็นเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (transformed cell) และเป็นเซลล์ที่ให้กำเนิดก้อนเนื้องอกและมะเร็ง รวมทั้งจำเป็นที่จะต้องทราบถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์เหล่านั้นว่ามีคุณสมบัติเป็นอย่างไร ซึ่งความเข้าใจในชีววิทยาของเซลล์เหล่านี้จะนำมาซึ่งการค้นหาแนวทางและวิธีการใหม่ๆ ในการรักษาโรคเนื้องอกและมะเร็งให้สามารถหายขาดได้ต่อไปในอนาคตข้างหน้า

อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญที่สุด ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งในปัจจุบันและยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญต่อเนื่องต่อไปในอนาคต คือเรื่องของความแตกต่างอย่างหลากหลายทาง ชีวภาพของเซลล์ (cellular heterogeneity) ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เนื้องอกและ มะเร็ง รวมทั้งความแตกต่างทางด้านพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) ของเซลล์เหล่านี้ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นทั้ง ภายในก้อนเนื้องอกและมะเร็งเดียวกัน (intratumour heterogeneity) หรือเกิดความแตกต่างอย่างหลากหลาย ระหว่างเนื้องอกและมะเร็งที่ต่างชนิดกัน (intertumour heterogeneity) ตัวอย่างของความแตกต่างที่เห็นได้ ชัดเจน เช่น ลักษณะของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งที่มาจากก้อนเดียวกันแต่ต่างบริเวณกัน หรือที่มาจากเนื้องอกชนิด เดียวกันแต่มาจากผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่ต่างกันนั้น จะพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphologic appearance) และการเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงในทางชีววิทยาเช่น การกลายพันธุ์หรือการทำงานทางชีวเคมี (biochemical function) มักจะมีความแตกต่างกัน (Heppner, 1984; Marusyk and Polyak, 2010; Michoraud and Polyak, 2010; Marusyk et al., 2012) ซึ่งปัญหาเหล่านี้มีอิทธิพลและเป็น

อุปสรรคอย่างมากต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง รวมถึงการกำหนดแผนในการรักษาโรคอีกด้วย เพราะคุณสมบัติที่ผิดปกติเหล่านี้อาจจะนำมาซึ่งการแปรผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผิดพลาด ถึงแม้จะนำมาใช้ศึกษาเนื้องอกและมะเร็งที่เป็นชนิดเดียวกันแต่มีกลไกความผิดปกติที่เกิดแตกต่างกันภายในเซลล์ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดที่สุดในปัจจุบันได้แก่ การให้สารเคมีบำบัดโดยโดยอาศัยการแปรผลทางชีวภาพของเซลล์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่อยู่ในก้อนเป็นปัจจัยในการตัดสินใจ โดยไม่คำนึงถึงเซลล์ที่เป็นประชากรส่วนน้อยแต่มี ความสำคัญในการที่เป็นเซลล์ที่อาจจะเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ในก้อนมะเร็งเหล่านั้น อาจจะทำให้สารเคมีบำบัดที่ใช้ สามารถทำลายได้เฉพาะเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่แสดงผลในการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยส่วนใหญ่ แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งที่เป็นจุดกำเนิดได้ ทำให้การรักษาไม่ได้ผลและมักจะพบมีการงอกของก้อนมะเร็งใหม่ที่จุดเดิม (recurrence) ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญที่พบในปัจจุบันในการรักษาโรคเนื้องอกและมะเร็ง

จากหลักฐานที่มีอยู่ในปัจจุบันทำให้เกิดการยอมรับกันอย่างกว้างขวางมากขึ้นว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่ให้กำเนิดเนื้องอกและมะเร็งนั้นมี คุณสมบัติที่มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อปกติ (normal stem cell) ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของร่างกายโดยทั่วไป รวมทั้งมีคุณสมบัติเชิงชีววิทยาหลายอย่างที่คล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดของคัพภะ (embryonic stem cell) ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญได้แก่ มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (self-renewal) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตยืนยาว (long-lived) มีความต้านทานต่อสารเคมีบำบัดและรังสีรักษาสูง (highly radio-chemotherapeutic resistance) หรือหยุดเจริญชั่วคราว (dormancy) จึงมีการสร้างสมมุติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง (cancer stem cell hypothesis) ขึ้นและกลายมาเป็นหัวข้อหลักในงานวิจัยทางด้านเนื้องอกและมะเร็งเรื่องหนึ่งที่มีอัตราการแข่งขันในการศึกษาและวิจัยที่สูงมากทั่วโลกในปัจจุบัน

นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งยังเป็นต้นเหตุ ที่ทำให้เกิดสภาพความแตกต่างอย่างหลากหลายของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (Ailles and Wiessman, 2007; Lobo et al.,2007; Dick, 2008; O'Brien et al. 2009; Clevers, 2011; Valent et al., 2012) ดังนั้นเมื่อรวมหลักการและปัญหาดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกัน จะเห็นได้ว่าความแตกต่างอย่างหลากหลายที่เกิดขึ้นในเซลล์เนื้องอกและมะเร็งนั้น น่าจะเป็นผลมาจากการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกและมะเร็ง โดยเริ่มจากการเป็นเซลล์เริ่มต้นที่ทำหน้าที่สะสมความผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ใช้ควบคุมขบวนการแบ่งเซลล์และงอกขยาย ดังนั้นสิ่งที่สำคัญที่สุดใน

การพิสูจน์สมมุติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งก็คือ การที่ต้องศึกษาเซลล์เหล่านี้ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวๆที่มีขนาดในระดับจุลภาค เพื่อชี้ให้ชัดลงไปว่าเซลล์ใดที่ทำหน้าที่หลักในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

แต่ด้วยเทคนิคและวิธีการใช้กันในงานวิจัยอย่างทั่วไปในปัจจุบัน เช่น เทคนิคโฟว์ไซโตเมทรี้ (flowcytometry หรือ FACS) หรือเทคนิคทางอิมมูโนไซโตเคมี (immunocytochemistry) สำหรับใช้คัดแยกเซลล์เหล่านั้น ถึงแม้จะสามารถคัดแยกเซลล์ที่ต้องการได้ (Tirino et at., 2013) แต่เซลล์ที่ได้อาจจะไม่แสดงคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งอย่างชัดเจน เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องอาศัยการคัดแยกโดยการติดฉลากเซลล์ (label-dependent) ด้วยปฏิกิริยาจำเพาะของแอนไทบอดี้ (antibody) กับโปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (surface-protein marker) ที่อยู่บนผิวเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดโปรตีนเครื่องหมายที่จำเพาะสำหรับเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง ทำให้อาจจะมีการคัดแยกเซลล์ที่ต้องการผิดชนิด เพราะผลจากงานวิจัยที่ผ่านๆมาแสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่คาดว่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งที่คัดแยกด้วยวิธีการติดฉลากนั้นจะมีความแปรผันในการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายของเซลล์ แม้เซลล์เหล่านั้นจะมาจากก้อนเนื้องอกชนิดเดียวกัน ซึ่งพบว่าการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายจะขึ้นกับกับสถานะทางชีวภาพ (biological stage) ของเซลล์ รวมทั้งการศึกษาตัวชี้วัดอื่นๆ เช่น การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อตรวจสอบยืนที่การกลายพันธุ์นั้น ผลที่ได้นั้นอาจจะไม่สามารถบ่งบอกบอกอย่างจำเพาะลงไปได้ว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเกิดที่เซลล์ใด รวมทั้งค่าที่ได้เสมือนว่าเป็นค่าผลลัพธ์โดยเฉลี่ยที่ เกิดจากการตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ทั้งหมดในเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บมา ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพแฝงอยู่ทำให้ไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าเป็นผลที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจาก เซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งหรือมาจากเซลล์อื่น เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็น ที่จะต้องสร้างระบบการศึกษาเซลล์ที่มีความสามารถนำไปใช้ศึกษาเซลล์เนื้องอกและมะเร็งเป้าหมายในระดับเซลล์เดี่ยวได้ โดยการพัฒนาวิธีที่ใช้ในการทำให้เซลล์ที่เก็บมาได้ในตัวอย่างกระจายตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และไม่ต้องผ่านกระบวนการเตรียมเซลล์ที่นานหรือมากเกินความจำเป็นอย่างที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์หรือบางครั้งอาจรุนแรงถึงขั้นทำให้เซลล์ที่ต้องการศึกษาตาย ส่งผลให้ผลในการศึกษาและวิเคราะห์ผลมีความผิดพลาดเกิดขึ้น นอกจากนี้การที่จะศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยวได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบที่ใช้ในการศึกษาเซลล์ที่มีความสามารถที่จะจัดเรียงเซลล์ที่จะศึกษาให้อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวที่แยกออกจากกัน เพื่อลดอิทธิพลจากการสื่อสารระหว่างกัน (cell-to-cell communication) ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ที่กำลังศึกษา โดยจะต้องพัฒนาระบบที่สามารถดักจับเซลล์ไว้ในภาชนะที่ใช้ศึกษาได้ ซึ่ง

โดยปกติเทคนิคในระดับมหภาคที่ใช้อยู่ในปัจจุบันรวมทั้งเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น ไม่สามารถให้ผลในการศึกษาที่แม่นยำได้ (Kalisky et al., 2011; Fritzch et al., 2012)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด ถึงลักษณะที่แท้จริงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งอย่างชัดเจนเช่น รูปร่างและขนาด เป็นต้น และถึงแม้ว่าจากผลการศึกษาวิจัยในปัจจุบันจะแสดงให้เห็นแนวโน้มที่จะคัดตรวจพบและคัดแยกเซลล์มะเร็งที่มีหน้าที่เหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดปกติ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วแฝงตัวอยู่ในก้อนเนื้องอกและมะเร็ง และสามารถตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาบางอย่างที่ควบคุมการทำหน้าที่ในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งได้ด้วยเทคนิคต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันเช่น PCR RT-PCR และอื่นๆ แต่ด้วยความไม่แน่นอนในการแปรผลและการเกิดความหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ รวมทั้งเทคนิคที่ใช้ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะส่งผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพมีอิทธิพลที่รุนแรงขึ้น ดังนั้นจึงมีเหตุจำเป็นที่จะต้องทำการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ที่มีความสามารถในการลดผลกระทบของปัจจัยทางเทคนิคต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ในทุกแขนงเข้ามาช่วยแก้ปัญหา ซึ่งวิธีการหนึ่งที่งานวิจัยทั่วโลกให้การยอมรับและถูกนำมาประยุกต์ใช้ในเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในปัจจุบันคือ เทคนิคระบบของไหลจุลภาค (microfluidics)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า การเกิดความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ในก้อนเนื้องอกและมะเร็งนั้น เป็นอุปสรรคต่อการที่จะศึกษาให้เข้าใจถึงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกและมะเร็งที่แฝงอยู่ โดยเฉพาะเรื่องของการระบุตัวของเซลล์เหล่านี้ รวมทั้งเทคนิคและวิธีการทางระดับมหภาคที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น FACS และ PCR ยังไม่สามารถตอบสนองต่องานวิจัยเพื่อให้ได้รับผลลัพธ์ที่ถูกต้อง ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจอันถูกต้องและเป็นการลดปัจจัยที่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่จะศึกษา จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเซลล์เนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยว และเทคนิคของไหลในระดับจุลภาคน่าจะเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในปัจจุบัน สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวต่อไป (Nilsson et al., 2009)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงทำให้งานวิจัยครั้งนี้จึงถูกแยกออกเป็นสองระยะหลักคือ ในช่วงแรกจะเป็นการพัฒนาระบบของไหลจุลภาคที่สามารถคัดแยกเซลล์ให้สำเร็จ ก่อนที่จะนำเซลล์เหล่านั้นไปประยุกต์ใช้สำหรับศึกษาเรื่องราวทางชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในขั้นสูงต่อไป ส่วนในระยะที่สองจะเป็นการวิจัยและพัฒนาระบบของไหลจุลภาค ที่มีความสามารถในการจัดเก็บและเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกคัดแยกดังกล่าวบนอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคในระดับเซลล์เดี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) ภายนอกร่างกาย (in vitro) เป็นวิธีการที่สำคัญอย่างยิ่งที่สามารถใช้ในการศึกษา คุณลักษณะ พฤติกรรม และกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ที่ปราศจากการรบกวนของปัจจัยต่างๆที่เกิดขึ้นจากตัวสัตว์ แต่

อย่างไรก็ตามวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้โดยทั่วไป (conventional method) ในปัจจุบันนั้น เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับมหภาค (macroscopic scale) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (culture vessel) เช่น จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขวดแก้ว (flask) เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในปริมาณมาก ทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากรและค่าใช้จ่าย อีกทั้งผลที่ได้จากการศึกษานั้น อาจจะมีความคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากสภาวะความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มี การศึกษาและพัฒนาเทคนิควิธีการในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวเกิดขึ้นทั่วโลก ซึ่งหนึ่งในเทคนิคที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันคือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาค (microfluidic cell culture) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถควบคุมการไหลของของเหลวในระดับไมโครลิตร (microliter) และระดับนาโนลิตร (nanoliter) เพื่อใช้ในการแยก ดักจับ และเลี้ยงเซลล์เดี่ยวได้ เทคนิคนี้มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในระดับจุลภาคทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ (chemical and physical control of the microenvironment) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถศึกษาการตอบสนองของเซลล์ (cellular response) ในระดับเซลล์เดี่ยวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ สามารถควบคุมจำนวนและความหนาแน่นของเซลล์ (cell numbers and density) ภายในบริเวณหรือปริมาณที่กำหนด สามารถกำหนดการวางเซลล์ (placement of cells) ในตำแหน่งต่าง ๆ ได้ ในบางการศึกษายังได้มีการสร้างสภาวะแวดล้อมแบบสามมิติ (three-dimensional geometries) เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะปกติในร่างกายได้ และทำการทดลองเปรียบเทียบพร้อมกัน (High parallelization of experiments) ได้ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (high throughput) สามารถลดปริมาณและค่าใช้จ่ายของสารเคมีต่างๆ และเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ได้ นอกจากนี้ยังมีการสร้างระบบการทำงานแบบอัตโนมัติ (automation) ทำให้สามารถควบคุมการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลานานหลายสัปดาห์ได้

โดยสรุป งานวิจัยในครั้งนี้จึงถูกออกแบบมาโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ที่ใช้หลักการทางระบบของไหลจุลภาค ที่มีความสามารถคัดแยกและกระจายเซลล์ที่จะศึกษาให้อยู่ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ และสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่มีความสามารถในการจัดเก็บเซลล์ที่ถูกแยกเหล่านี้ให้อยู่ในช่องจัดเก็บในลักษณะ 1 เซลล์ต่อ 1 ช่อง ตามช่วงขนาดของเซลล์ โดย. ในปีที่ 2 โครงการวิจัยจะศึกษาเซลล์ที่จัดเก็บได้จะยังมีชีวิตอยู่และสามารถเพาะเลี้ยงเจริญเติบโตต่อไปได้ (cell viability) และนำไปใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ต่อไปได้ ผลสำเร็จที่เกิดขึ้นจะนำมาซึ่งประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในส่วนของการศึกษาพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์ต่างๆ ต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในปีที่ 2 ประกอบด้วย 2 โครงการย่อย ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 การพัฒนาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้

1.1. การออกแบบอุปกรณ์

1.2. การจำลองการทำงานของอุปกรณ์

1.3. การสร้างอุปกรณ์

1.4. การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์แบบ ณ เวลาจริง

1.5. การดักจับเซลล์มะเร็งจริงด้วยอุปกรณ์

โครงการย่อยที่ 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอุปกรณ์ การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ในอุปกรณ์ ขั้นตอนดังนี้

2.1 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

2.2 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธีการดักจับเซลล์ในแบบต่างๆ

2.3 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ บนอุปกรณ์ที่ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยปีที่ 2

สมมุติฐานของงานวิจัยในครั้งนี้คือ ระบบของไหลจุลภาคสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคนิค และสร้างอุปกรณ์ ที่สามารถควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของเซลล์ (cell suspension) เนื้องอกชนิดกลม ของสุนัขที่เก็บมาได้โดยวิธีการดูดเจาะด้วยเข็ม (fine-needle aspiration) จากก้อนเนื้องอกของสุนัขได้ และ สามารถทำให้เซลล์เกิดการกระจายตัวของเซลล์ให้อยู่ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวๆ รวมทั้งสามารถบังคับให้เซลล์ที่ กระจายตัวอยู่ถูกดักจับ และจัดเก็บเซลล์ในช่องจัดเก็บโดยมีเซลล์ 1 ตัว หรือกลุ่มย่อย 2-3 เซลล์ ต่อ 1 ช่อง ตามขนาดของเซลล์โดยที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ และสามารถพัฒนาเทคนิคการ

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และนำเซลล์เพาะเลี้ยงนำมาใช้ศึกษาถึงคุณลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์เหล่านี้ในขั้นต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยปีที่ 2

เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidic devices) ที่มีความสามารถในการดักจับ (trapping) เซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่เก็บโดยการเจาะดูด (aspiration) หรือ โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin จากก้อนเนื้องอกผิวหนังของสุนัขให้อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ โดยที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ และพัฒนาอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidic devices) ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกที่ถูกแยกเป็นเซลล์เดี่ยวแขวนลอยในอุปกรณ์ได้ และศึกษาคุณลักษณะและพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์เนื้องอกในอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น

ทบทวนวรรณกรรม

เซลล์ที่ยังมีชีวิต (living cells) นั้น โดยปกติจะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological properties) ของตัวเองอยู่ตลอดเวลาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มากระตุ้นทั้งจากภายนอกและภายใน เซลล์ (extracellular and intracellular stimuli) ทำให้เซลล์เกิดการปรับตัว (adaptation) เพื่อรักษาสมดุลย ภาพ (homeostasis) ของเซลล์ไว้ได้ส่งผลให้เซลล์ยังคงสามารถมีชีวิตอยู่รอด (survival) ต่อไปได้ โดยปกติแล้วเซลล์แต่ละเซลล์ถึงแม้จะอยู่ในเนื้อเยื่อเดียวกันก็ตาม ก็จะมีความสามารถในการตอบสนอง ต่อสิ่งเร้าในระดับที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในแต่ละเซลล์ต่อการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจึงมี ความแตกต่างกันออกไปในแต่ละเซลล์ไม่มากก็น้อยด้วยเช่นกัน ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ที่เกิดขึ้นจึงเป็นปัจจัยหลัก ที่สำคัญในการกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ (biological characteristics) ของแต่ละเซลล์ ให้มีความ แตกต่างจากกันทั้งในด้านสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีรวิทยา (physiology) ดังนั้นเซลล์แต่ละเซลล์จึงไม่ มีความเท่ากันโดยสมบูรณ์ และทำให้เกิดความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ (cellular heterogeneity) ในแต่ละ เซลล์เกิดขึ้น (Batchelor et al., 2013) ความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ จัดได้ว่าปัญหาสำคัญที่สุดสำหรับการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ (cell biology)

เพราะความแตกต่างที่เกิดขึ้นย่อมทำให้นักวิจัย ไม่สามารถใช้กฎเกณฑ์ที่แน่นอนที่ใช้สำหรับศึกษาเซลล์ ชนิดหนึ่งๆ มาใช้ศึกษาเซลล์ที่เหลือได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพียงพอในช่วงเวลาหนึ่ง ดังนั้นส่งผลให้การแปรผล การศึกษา (study interpretation) ย่อมมีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นด้วย สิ่งเหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีผลต่อ

ความเข้าใจ อย่างละเอียด (comprehension) ในชีววิทยาของเซลล์มีความคลาดเคลื่อนและผิดพลาดไปด้วย (Wu and Singh, 2011; Yin and Marshall, 2012) เช่น ในการศึกษาเซลล์โดยใช้โปรตีนเครื่องหมายที่ผิวเซลล์ (surface protein marker) เพื่อกำหนดชนิดของเซลล์ต่างๆนั้น จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าถึงแม้ว่าจะเป็นเซลล์ที่เป็นชนิด เดียวกันและมีความเท่าเทียมกันทั้งทางพันธุกรรม (genetic identity) ทางรูปร่าง (morphology identity) หรือ การทำหน้าที่ (functional identity) ก็ยังมีความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายที่ศึกษา ซึ่งใน บางเซลล์อาจจะมีการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ ในขณะที่บางเซลล์อาจจะไม่มีการแสดงออกของโปรตีน เครื่องหมายในขณะที่ทำการศึกษาก็เป็นได้ นอกจากนี้เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายก็อาจจะมี ความเข้ม (intensity) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันทั้งๆที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันเป็นต้น สิ่งเหล่านี้ จัดเป็นตัวอย่างอันดีอันหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ที่เกิดขึ้น กลไกอันหนึ่งที่เป็นไปได้ในการทำให้เกิดความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์นั้น อาจจะเป็นผลที่เกิดขึ้น เนื่องจากการที่เซลล์แต่ละเซลล์มีการตอบสนองต่อสัญญาณกระตุ้นต่างๆในระดับที่ไม่เท่ากัน ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในสภาพ ที่ถูกกระตุ้น (activated) ก็จะมีการตอบสนองเกิดขึ้น ในขณะที่เซลล์อื่นๆ ถึงแม้จะเป็นชนิดเดียวกันและในเนื้อเยื่อ เดียวกันอาจจะอยู่ในสภาพดื้อต่อการกระตุ้น (refractory) ทำให้เซลล์อยู่ในสถานะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (inactivated) และทำให้ไม่มีการตอบสนอง (irresponsive) เกิดขึ้น หรือเซลล์อาจเกิดการกระตุ้น แต่มีการ ตอบสนองของเซลล์ที่มีความแตกต่างจากเซลล์อื่นๆ ทั้งที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและได้รับสิ่งเร้าชนิดเดียวกันก็ เป็นได้ สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์หนึ่งๆที่ถูกกระตุ้น อาจจะมีขบวนการตอบสนองทางชีวภาพที่แตกต่างออกไป จากเซลล์อื่นๆทั้งที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน รวมทั้งรูปแบบการตอบสนองก็มีความหลากหลายมากกว่าจำนวนปัจจัย ที่มากระตุ้นเซลล์ (Mogilner et al., 2006) ดังจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของการศึกษาเซลล์มะเร็งและเนื้องอก (Kim and Orkin, 2011) ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงผลกระทบในเรื่องของความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา (dynamic process) และ หลากหลาย ในปัจจุบันจึงได้มีคำแนะนำที่สำคัญที่ใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ที่จะศึกษาชีววิทยาของเซลล์เพื่อให้ได้ผล ที่แน่ชัด คือให้ทำการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่างๆในระดับเซลล์เดี่ยวๆ (single-cell analysis) โดยเริ่มตั้งแต่การ คัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงการกำหนดคุณลักษณะทางชีวภาพ และต้องใช้อุปกรณ์ที่สามารถที่จะแยกให้เซลล์แต่ละเซลล์นั้นถูกแยกออกจากกันโดยสมบูรณ์ และต้องไม่มีการสัมผัสกันเพื่อลดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ที่จะ เกิดขึ้น (cell-to-cell interaction) เมื่อเซลล์มีการสัมผัสกัน นอกจากนี้วิธีการต่างๆที่จะนำมาใช้คัดแยกและ จัดเรียงเซลล์ที่จะศึกษาในระดับเซลล์เดี่ยวนั้น ไม่ควรที่จะต้องใช้วิธีการในการเตรียมเซลล์ที่ยุ่งยากหรือต้องใช้สาร ที่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) และจะต้องมีความแม่นยำในการที่จะแยก

เซลล์ที่มีอยู่ใน ตัวอย่างซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่ต้องการอยู่อย่างจำกัด และให้ผลในการศึกษาที่มีความไวสูง (high throughput and sensitivity) รวมทั้งสามารถอำนวยประโยชน์ให้แก่ผู้ที่ศึกษาสามารถทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง และมีขั้นตอนในการใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก

อย่างไรก็ตามวิธีการคัดแยกเซลล์ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถทำให้ผู้วิจัยเข้าถึงการศึกษาเซลล์ เป้าหมายในระดับเซลล์เดี่ยวได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งวิธีการต่างๆที่ใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์ที่มีอยู่ใน ปัจจุบัน (conventional methods) มักจะเป็นการวัดผลที่เกิดจากค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพตาม ธรรมชาติของประชากรของเซลล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่สามารถบอกลงไปได้ชัดเจนว่าเซลล์ใดที่เป็นเซลล์ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านั้นขึ้นมา (Yin and Marshall, 2012) ถึงแม้ว่าจะมีเครื่องมือและวิธีการ บางอย่างที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ที่ระดับเซลล์เดี่ยวได้บ้างก็ตามเช่น การใช้โฟว์ไซโตเมตรี (Flow cytometry) สำหรับคัดแยกเซลล์ หรือการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) การตรวจสอบคุณสมบัติทางพันธุกรรมของเซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (fine-needle aspirated cell) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เมื่อต้องนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ เดี่ยวๆจำนวนมากเช่น การใช้ Flow cytometry จำเป็นต้องใช้แอนติบอดี (antibody) ที่แสดงออกจำเพาะต่อ เซลล์นั้นๆ ซึ่งการใช้แอนติบอดีอาจจะมีผลทำให้วิถีสัญญาณ (signal pathway) ที่ควบคุมกลไกทางชีวภาพที่สำคัญเช่น การกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตมีความผิดปกติได้เมื่อนำเซลล์ที่เก็บรวบรวมได้ด้วยวิธีเหล่านี้มาใช้ ประโยชน์ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่อไป อาจส่งผลให้เกิดการแปรผลที่คลาดเคลื่อนขึ้นได้ นอกจากนี้ที่ สำคัญคือ วิธีการศึกษาเหล่านี้จะสามารถใช้ศึกษาชีวภาพของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งเท่านั้น (single time-point) จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาของเซลล์ที่ต้องการความต่อเนื่องได้ โดยเฉพาะการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาเฉพาะชั่วขณะหนึ่ง (spatiotemporal dynamic change) แต่มีผลสำคัญต่อการตัดสินใจต่อเซลล์ในการตอบสนองและกำหนดชะตาชีวิตของเซลล์ (Yin and Marshall, 2012; Sackmann et al., 2014) ดังนั้นข้อจำกัดต่างๆเหล่านี้ที่มีอยู่จึงมีผลกระทบทำให้ผลการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในปัจจุบันนั้น ส่งผลให้มีความแปรผันต่อผลการศึกษาอย่างมาก เมื่อต้องนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวและเนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ถูกออกแบบมาเพื่อดำเนินการบน เซลล์ที่อยู่ในลักษณะที่เป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ (bulk of cells) และโดยปกติจะมีประชากรของเซลล์ประมาณ 10^3 ถึง 10^6เซลล์ต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง (Chao and Ros, 2008) ดังนั้นเทคนิคเหล่านี้จึงต้องการจำนวนตัวอย่างขนาด ใหญ่

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวในปัจจุบัน มีความสำคัญเพิ่มขึ้น เป็นอย่างมากโดยเฉพาะสำหรับงานวิจัยระดับเซลล์ที่ต้องการความถูกต้องแม่นยำสูง รวมทั้งความเข้าใจในเรื่อง ความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยว จะนำมาซึ่งให้ความเข้าใจอย่างละเอียดในเรื่องการ เปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่มีความซับซ้อน โดยเฉพาะการตัดสินใจของเซลล์ในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า ที่เกิดขึ้น ภายในเซลล์จากกลไกทางชีวเคมีต่างๆ ที่ส่งผลให้เซลล์แต่ละเซลล์มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงตัวเองอยู่ ตลอดเวลาเพื่อความอยู่รอดและมีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการที่สามารถนำมาใช้แยก เซลล์และนำมาใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์แต่ละเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ โดยที่ไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมเซลล์ ก่อนศึกษาที่ซับซ้อน และเป็นอุปกรณ์ที่สามารถให้สภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสมใกล้เคียงกับธรรมชาติที่ ล้อมรอบเซลล์ที่จะศึกษาให้มากที่สุด อีกทั้งสามารถทำให้ผู้ศึกษาเฝ้าติดตามเซลล์ได้ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์จึงเป็นหลักการที่สำคัญ ซึ่งวิธีที่มีความสอดคล้องต่อเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วมาก ที่สุดในปัจจุบันก็คือ การใช้เทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) มาช่วยในการศึกษาเซลล์ในระดับ เซลล์เดี่ยวนั่นเอง

ซึ่งเทคโนโลยีนี้เป็นการเทคนิคเชิงวิศวกรรมชีวภาพที่ใช้หลักการทางฟิสิกส์ ในการควบคุมการ ไหลและพฤติกรรมต่างๆที่เกิดจากคุณสมบัติภายในของของไหล (fluid) ในระดับจุลภาค (microscale) ลงไป (Sackmann et al., 2014) โดยปกติในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์นั้นจะมีขบวนการหลักที่สำคัญอยู่ 4 ขั้นตอน ที่ผู้วิจัยต้องดำเนินการได้แก่ การเก็บตัวอย่างเซลล์ (cell sampling) การคัดแยกและจัดเรียงเซลล์ (cell sorting) ด้วย คุณสมบัติต่างๆของเซลล์ การดักจับและคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ (cell trapping) และการเตรียมเซลล์ก่อนศึกษา (cell treatment) ซึ่งในปัจจุบันพบว่าได้มีการใช้เทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาคมาประยุกต์ใช้เพื่อควบคุม ขั้นตอนต่างๆเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น Kasukurti และคณะ (2011) สามารถทำการแยกเซลล์ที่มีขนาด ต่างกัน โดยการบังคับให้เซลล์จัดเรียงเซลล์และเคลื่อนที่ต่อเนื่องมาทีละเซลล์ โดยใช้ระบบของไหลจุลภาคมาเป็น ตัวควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ มีรายงานแสดงให้เห็นถึงการน าเทคนิคระบบของไหลจุลภาค มาใช้แยกเซลล์ออกจากกันและเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ รวมทั้งสามารถนำเซลล์ชนิดที่สองมาเข้าคู่ (conjugation) กับเซลล์ที่แยกไว้ ซึ่งเป็นวิธีการที่สำคัญที่ใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในเรื่องของปฏิกิริยาและการสื่อสารระหว่าง เซลล์ (cell-to-cell interaction and communication) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทาง ชีวภาพของเซลล์ที่มาสัมผัสกัน (Lecault et al., 2012) เป็นต้น

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าการพัฒนาระบบของไหลจุลภาคมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์นั้นมีข้อดีหลายประการ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเทคนิคนี้ยังเป็นเทคนิคที่ยังอยู่ใน

ระหว่างการ พัฒนาอย่างต่อเนื่องและยังเป็นเทคนิคที่ยังใหม่มากสำหรับประเทศไทย ทำให้องค์ความรู้สำหรับเทคนิคด้านนี้ยังมี ข้อจำกัดอยู่พอสมควร ดังนั้นการเริ่มต้นศึกษาเทคนิคของไหลจุลภาคจึงถือเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีและสำคัญสำหรับ งานวิจัยทางชีวภาพในประเทศไทย โดยความรู้ความเข้าใจในเทคนิคนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทาง ชีววิทยาของเซลล์ได้อย่างกว้างขวางต่อไปได้เป็นอย่างดีในอนาคต อย่างไรก็ตามพฤติกรรมของของไหลในระบบ ของไหลจุลภาคในอุปกรณ์ของไหลจุลภาคหนึ่ง อาจจะมีความแตกต่างกันกับที่เกิดขึ้นในอุปกรณ์อีกอันหนึ่งถึงแม้ว่า จะนำมาใช้ในวัตถุประสงค์เดียวกัน ดังนั้นการนำต้นแบบของอุปกรณ์ของไหลจุลภาคที่มีรายงานอยู่แล้วจาก การศึกษาของผู้วิจัยคณะอื่นๆ อาจจะทำให้ได้รับผลการศึกษาที่ไม่เหมาะสมกับงานที่ศึกษาอยู่ได้ ดังนั้นการใช้ เทคนิคนี้จึงจำเป็นต้องมีการปรับแต่งตัวแปรที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสมกับงานแต่ละงาน โดยสามารถออกแบบ ต้นแบบของอุปกรณ์ขึ้นใหม่หรือปรับแต่งจากต้นแบบเดิมที่เคยถูกศึกษามาก่อนก็ได้ เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับ งานที่กำลังศึกษาอยู่ จากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดสิ่งที่สำคัญที่สุดในชั้นแรกก็คือการพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่สามารถควบคุมการไหลของเซลล์ด้วยระบบของไหลจุลภาค ที่สามารถทำให้เซลล์เกิดจัดเรียงตัวเป็นสายกระแสการไหลของเซลล์ (cellular stream line) ตามขนาดและสามารถทำให้แต่ละสายการไหลแยกออกมาจากกันได้อย่างถูกต้องจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในลำดับแรกๆของการศึกษาเซลล์ ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยขั้นต่อๆไปได้ อย่างไรก็ตามการควบคุมการไหลของเซลล์ในระบบของไหลจุลภาคและทำให้เซลล์เกิดการเรียงตัวเป็น สายกระแสการไหลนั้น จำเป็นต้องอาศัยการประยุกต์ความรู้ทางฟิสิกส์ของของไหลที่ไหลอยู่ในท่อรูปแบบต่างๆเข้า กับความรู้ทางชีววิทยาของเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการไหลของของไหลในท่อโค้งระดับจุลภาค (curvilinear microchannel) นั้นจะให้ผลดีในการทำให้เซลล์จัดเรียงตัวและไหลเป็นสายตามขนาดของเซลล์

ซึ่งหลักการขั้นพื้นฐานเกิดจากของไหลในท่อเหล่านั้น จะต้องมีรูปแบบการไหลเป็นแบบราบเรียบและเป็นชั้นๆ (laminar flow) และจะต้องไม่มีแรงภายนอก (external force) ใดๆ มากระทำกับของไหลนั้นๆ นอกจากแรง เนื่องจากความดันที่ใส่เข้าไปในระบบเท่านั้น ซึ่งความดันที่ใส่เข้าสู่ระบบจะทำให้เกิดการไหลของทั้งของไหลที่เป็น ตัวกลางและส่งผลให้เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลเคลื่อนที่ด้วยแรงเฉือน (shear force) และเมื่อของไหลไหล ผ่านบริเวณโค้งจะส่งผลให้เกิดสนามหมุนวนของแรงตามแนวหน้าตัดของท่อ ดังนั้นเมื่ออนุภาคในของไหลเดินทาง มาถึงสนามหมุนวนนี้ แรงในสนามหมุนวนจะผลักให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าหาผนังของท่อระดับจุลภาค และเมื่อเซลล์ เข้าใกล้ผนังท่อแล้วผนังของท่อจุลภาคก็จะส่งแรงผลักมากระทำต่อเซลล์เพื่อให้เซลล์ออกห่างจากผนัง ซึ่งความ สมดุลของแรงทั้งสองจะส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ตำแหน่งที่เกิดความสมดุลของแรงทั้งสองที่จุดใดจุดหนึ่งขึ้นกับขนาดของ เซลล์หรืออนุภาค และทำให้เซลล์หรืออนุภาคที่มี

ขนาดเดียวกันจะมาอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน และเคลื่อนตัวตามกัน เป็นสายกระแสการไหลได้ (Di Carlo et al., 2007; Kuntaegowdanahalli et al., 2009; Lee et al., 2010) ด้วยเทคโนโลยีในปัจจุบันของระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) นั้นสามารถทำให้นักวิจัยสามารถ สร้างอุปกรณ์ที่ใช้ดักจับเซลล์ (cell trapping) ให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงระดับจุลภาค (microwell) ซึ่งจากนี้ไปใน รายงานนี้จะเรียกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีขนาดเพียง 20-60 μm ได้ ซึ่งอุปกรณ์ต้นแบบเหล่านั้นสามารถนำมา ประยุกต์ใช้ในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์อย่างทันทีต่อสารสื่อ (mediator) ที่กระตุ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (phenotype) ที่มีความแตกต่างกันของ เซลล์ซึ่งอยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกันได้อย่างชัดเจน ภายใต้สภาวะเงื่อนไขทางชีววิทยาที่สามารถควบคุมได้ตาม ต้องการท าให้ผลการศึกษามีความแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ระบบ microfluidics-microwell ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ บ่อยครั้งในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่างๆในปัจจุบันเช่น การสร้าง embryoid body หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์ แบบ 3 มิติ เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ microfluidics-microwell คือความสามารถ ของอุปกรณ์ในการดักจับเซลล์ให้ได้คราวละมากๆ (high throughput cell trapping) และทำให้หลุมเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่ 1 ช่องสามารถบรรจุเซลล์ได้เพียง 1 เซลล์ และยังมีพื้นที่เพียงพอที่จะให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวได้ (Park et al., 2010) รวมทั้งมีความง่ายในการบันทึกภาพผลการทดลอง (imaging capacity) ซึ่งปัญหาเหล่านี้จึงยังเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ระบบ microfluidics-microwell สำหรับศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ ที่จำเป็นต้องได้รับการพัฒนาต่อไป

โครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ดักจับและเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

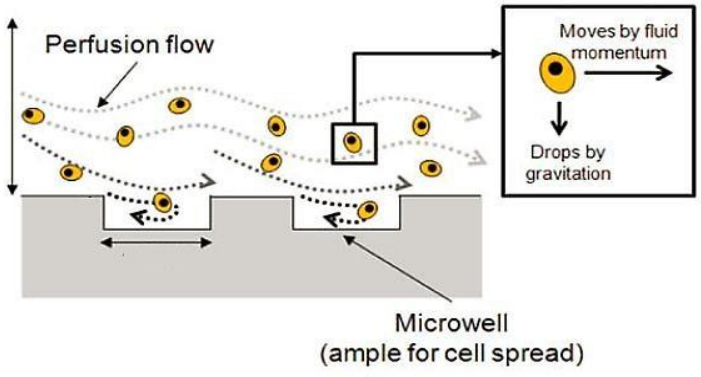
วัตถุประสงค์

เป็นการศึกษาการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาค ที่ภายในมีหลุมเพาะเลี้ยงอยู่ที่พื้นของอุปกรณ์ เพื่อใช้ดักจับอนุภาครวมถึงเซลล์ โดยอาศัยหลักการทำงานทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) ในระบบของไหลจุลภาค โดยขบวนการดักจับจะเป็นขบวนการแบบไม่ใช้สนามพลังงานจากภายนอก (passive) ในการขับเคลื่อนให้เซลล์ไหลลงหลุมเพาะเลี้ยง แต่จะอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ภายในของของไหล (internally physical property) เป็นปัจจัยในการพาเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง พัฒนาประสิทธิภาพเพื่อลดปัญหาจากอิทธิพลของแรงจากภายนอกที่อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์และให้เซลล์มีชีวิตอยู่ตามธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งการศึกษาในขั้นนี้ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้

1.1. การออกแบบอุปกรณ์ (geometrical design of microwell)

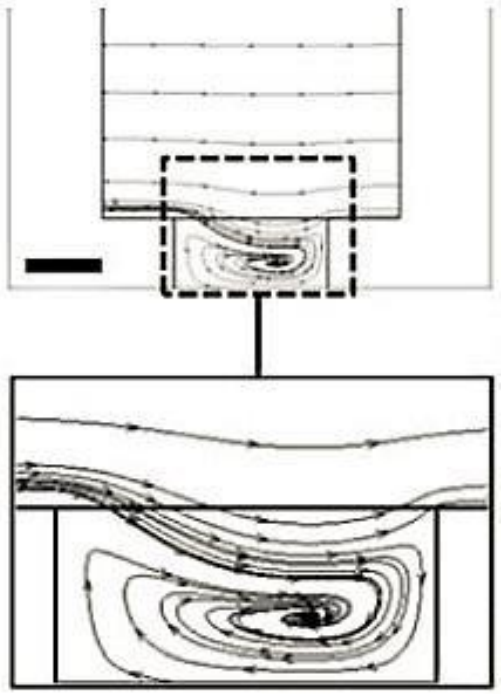
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ในการออกแบบจะใช้หลักเกณฑ์ในการออกแบบโดยกำหนดว่า การไหลของของไหลตัวกลาง (fluid medium) ภายในท่อของอุปกรณ์ที่ออกแบบจะต้องมีลักษณะการไหลแบบจัดเรียงเป็นชั้น (laminar flow) และมีเซลล์ลอยอยู่ในแต่ละชั้นของการไหล ซึ่งเซลล์จะถูกพัดพาให้เคลื่อนที่โดยอาศัยแรงเฉื่อย (inertial force) ของของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ที่เคลื่อนที่ผ่านไปเป็นตัวให้กำเนิดแรงที่จะทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนของการไหล และเมื่อปล่อยให้เซลล์เคลื่อนที่ไปด้วยแรงเฉื่อยได้ระยะหนึ่ง เซลล์จะถูกดึงให้ตกข้ามชั้นของการไหลหลักลงสู่พื้นด้านล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity) ซึ่งหลักการที่กล่าวมาสามารถสรุปให้เห็นได้ ดังรูปที่ 1



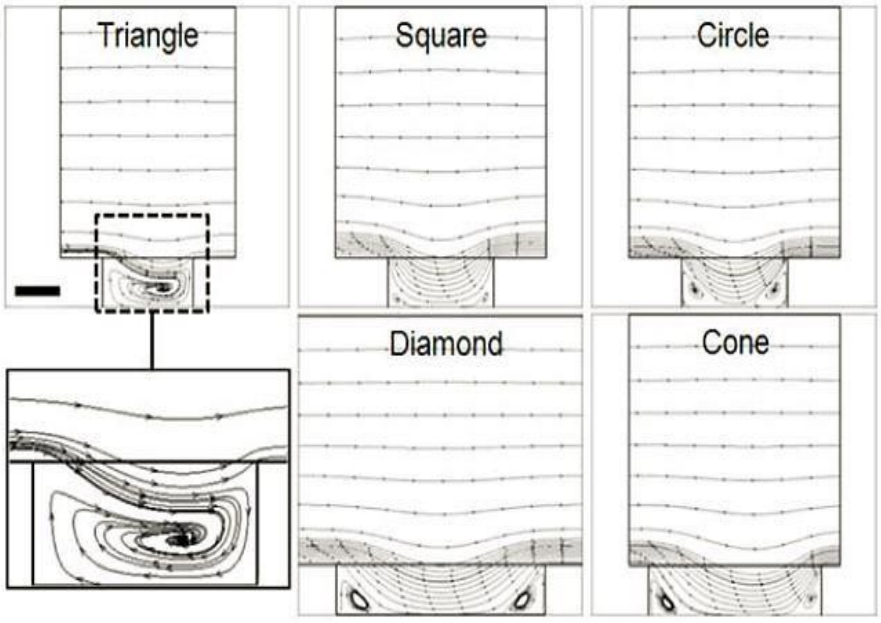
<u>รูปที่ 1</u> แสดงถึงปัจจัยทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) ที่สำคัญได้แก่ แรงเฉื่อย (inertial force) และโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ที่ทำให้เกิดการกระจายการไหล (perfusion flow) ของของไหล ตัวกลางและ ผลของแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity) ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่กระจายตัวอยู่ในชั้นการไหล ในระดับต่างๆในระบบของไหลจุลภาค (ที่มา: ดัดแปลงจาก *Park et al., 2010*)

จากการศึกษาของ Park และคณะ (2010) ด้วยการทำการจำลองการไหลของของไหลตัวกลางด้วยคอมพิวเตอร์ (computational simulation) พบว่าภายในหลุมเพาะเลี้ยง (microwell) เมื่อมีของไหลตัวกลางไหลผ่านลงไปจะทำเกิดการไหลของของไหลตัวกลาง ที่มีลักษณะเป็นการเคลื่อนที่แบบหมุนวน (recirculation flow) อยู่ภายในหลุมเพาะเลี้ยง ซึ่งการไหลแบบหมุนวนนี้จะดึงเอาอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่อยู่ในระนาบเดียวกันกับของไหลตัวกลางที่อยู่ชิดกับหลุมเพาะเลี้ยงไหลลงเข้าสู่หลุมเพาะเลี้ยง ซึ่งหลักการดังกล่าวสามารถสรุปให้เห็นได้ ดัง<u>รูปที่ 2 และ 3</u>



รูปที่ 2 แสดงผลการศึกษาการจำลองการไหลของของไหลตัวกลางด้วยคอมพิวเตอร์ ที่ศึกษาโดย Park และคณะในปี 2010 ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีของไหลตัวกลางที่มีระดับชั้นการไหลที่อยู่ชิดกับหลุมเพาะเลี้ยงไหล (microwell) และเคลื่อนที่ผ่านหลุมเพาะเลี้ยง ของไหลตัวกลางในระดับชั้นการไหลดังกล่าวจะมี การเคลื่อนที่ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของของไหลตัวกลางมีการเคลื่อนที่แบบหมุน และส่งผลให้อนุภาคและเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆบริเวณหลุมเพาะนั้นๆไหลลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงได้ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)

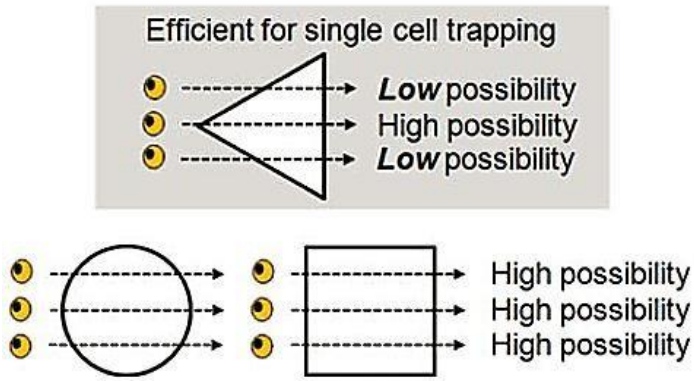
นอกจากนี้ผลจากการศึกษาการจำลองการไหลด้วยคอมพิวเตอร์ของ Park และคณะ (2010) ยังพบอีกว่า ลักษณะทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละรูปแบบ นั้นมีผลต่อความแรงในการเกิดการไหลแบบหมุนเวียนของ ของไหลตัวกลาง (recirculation flow) ภายในหลุมเพาะเลี้ยง ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงสามเหลี่ยมนั้น จะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางได้แรงที่สุดเมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงแบบอื่นๆ เช่น วงกลมหรือสี่เหลี่ยมจัตุรัส ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการศึกษาของ Park และคณะ ที่ทำการจำลองการเกิดการไหลแบบหมุนเวียนของของไหลตัวกลาง (recirculation flow) ด้วยคอมพิวเตอร์ที่เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิต (geometry) แบบต่างๆ ผลของการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบ

ต่างๆ จะมีผลต่อ ความแรงในการเกิดการไหลแบบหมุนเวียน โดยที่หลุมเพาะเลี้ยงแบบรูปสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบ หมุนวนได้แรงที่สุด เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงอื่นๆ ได้แก่ วงกลม (circle) สี่เหลี่ยมจัตุรัส (square) รูป สามเหลี่ยม (diamond) และรูปกรวย (cone) (ที่มา: ดัดแปลงจาก *Park et al., 2010*)

และผลการศึกษาของ Park และคณะ (2010) ยังแสดงให้เห็นอีกว่ารูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงนั้นมีส่วนในการกำหนดประสิทธิภาพของหลุมเพาะเลี้ยงต่อการดักจับอนุภาคและเซลล์ โดยเพิ่มโอกาสในการดักจับเซลล์เดี่ยว (single cell trapping) มากกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตแบบอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการไหลของเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์บรรจุอยู่แล้วได้ดีกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงแบบอื่นๆเช่นกัน ดังแสดงใน <u>รูปที่ 4</u> ดังนั้นหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมจึงเป็นรูปทรงทางเรขาคณิตที่ถูกเลือกใช้ในการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาค เพื่อใช้ดักจับเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้



<u>รูปที่ 4</u> แสดงอิทธิพลของรูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงที่มีต่อความน่าจะเป็นในการดักจับเซลล์ให้อยู่ ในหลุมเพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 1: 1 (single trapping efficacy หรือ S.T.E.) โดยพบว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรง ทางเรขาคณิตแบบสามเหลี่ยมนั้นมีค่า S.T.E. สูง ดังนั้นจึงประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เพียงเซลล์เดียว รวมทั้ง ป้องกันการไหลของเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์บรรจุอยู่แล้วได้ดีกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรง แบบวงกลมและสี่เหลี่ยมจตุรัส (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)

1.2. การจำลองการทำงานของอุปกรณ์ (Simulation)

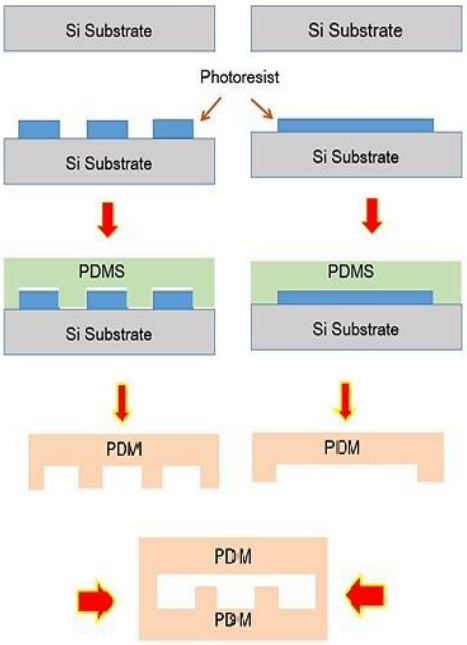
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ในการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคสำหรับการดักจับเซลล์เดี่ยวในครั้งนี้ ได้ทำการจำลองการไหลแบบหมุนวนในหลุมเพาะเลี้ยงรูปสามเหลี่ยมด้วยคอมพิวเตอร์ (computerized simulation of circulation flow in triangular microwell) เพื่อทำนายประสิทธิภาพของอุปกรณ์ โดยในการศึกษาจะทำการจำลองความเป็นไปได้ในการเกิดที่จะเกิดการไหลแบบหมุนวนภายในหลุมเพาะเลี้ยง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ COMSOL™ Multiphysics (Comsol, USA) รุ่น 6.0 โดยกำหนดให้หลุมเพาะเลี้ยงมีรูปทรงทางเรขาคณิตเป็นรูปสามเหลี่ยม และมีความยาวเส้นรอบรูปของรูปสามเหลี่ยมแต่ละด้านเท่ากับ 40 μm และมีความลึก 30 μm

1.3. การสร้างอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาจากต้นแบบ (device fabrication) เพื่อดักเซลล์และเพาะเลี้ยง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เป็นขั้นตอนที่นำต้นแบบที่ได้รับการออกแบบไว้ มาทำการสร้างเป็นตัวอุปกรณ์ ด้วยวิธี soft-lithography โดยต้นแบบที่สร้างไว้จะถูกถ่ายแบบลงบนแผ่นเวเฟอร์ชนิดซิลิกอน (silicon wafer) ที่ใช้สำหรับออกแบบและสร้าง ชิ้นส่วนอุปกรณ์อิเลคทรอนิคส์แบบวงจรรวม (integrated circuit หรือ IC) หลังจากนั้นลวดลายต่างๆของระบบ ท่อและหลุมเพาะเลี้ยงจะถูกกัดเซาะให้เกิดเป็นรูปขึ้นมา (etching) ตามรูปแบบลวดลายที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งจะทำให้ได้แม่พิมพ์ซิลิกอน (silicon mold) สำหรับสร้างชิ้นงานขึ้นมา หลังจากนั้นจะใช้โพลีเมอร์เหลวชนิด polydimethyl siloxane (PDMS) (Sigma-Aldrich, USA) ที่เมื่อแข็งตัวจะเป็นสารโพลีเมอร์ที่มีความยืดหยุ่นและมีความใสแบบกระจกทำให้แสงสามารถทะลุผ่านได้เทลงบนแม่พิมพ์ที่สร้างขึ้นมา เมื่อปล่อยให้ PDMS แข็งตัวแล้ว จะทำการลอกแผ่น PDMS ดังกล่าวออกจากแม่พิมพ์ และนำมาประกบติดกันแผ่น PDMS ที่มีลวดลายในส่วนต่างๆ ของอุปกรณ์และทำการเชื่อมแผ่น PDMS แต่ละส่วนให้ติดกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน (oxygen plasma) ซึ่งขั้นตอนในการสร้างและประกอบอุปกรณ์ด้วยวิธี soft-lithography สามารถสรุปได้ ดังรูปที่ 5



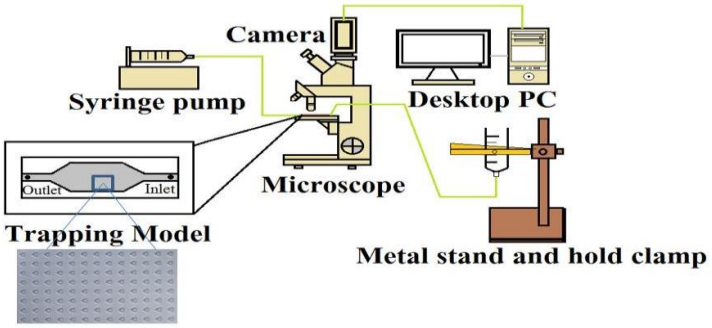
<u>รูปที่ 5</u> แสดงขั้นตอนในการสร้างและประกอบ (fabrication) อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ดักจับเซลล์ด้วย เทคนิค soft-lithography ซึ่งแม่พิมพ์จะถูกสร้างด้วยแผ่นเวเฟอร์ชนิดซิลิกอน (silicon wafer) ที่ใช้ในการสร้าง ชิ้นส่วนอุปกรณ์อิเลคทรอนิกส์ชนิดวงจรรวม (IC) และตัวอุปกรณ์ถูกสร้างด้วยสารโพลีเมอร์ชนิด polydimethyl siloxane (PDMS) และชิ้นส่วนของอุปกรณ์แต่ละส่วนจะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน (oxygen plasma)

1.4. การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์ และการติดตั้งชุดอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างขึ้นมาจะถูกเชื่อมต่อเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ใช้ใน การทดลองครั้งนี้ ซึ่งจะประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope) (Olympus, Japan) ที่ ติดตั้งกล้องบันทึกภาพวีดีโอแบบดิจิตอล (digital video) ที่มีความละเอียด 3 ล้านจุด (3 million pixels) (Motic, China) สำหรับใช้บันทึกภาพการไหลของเซลล์และการดักจับที่เกิดขึ้นภายในอุปกรณ์ และส่งภาพเข้าสู่เครื่อง คอมพิวเตอร์เพื่อทำการประมวลผลภาพ (image processing) โดยที่อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคจะถูกวางลงบน ฐานของกล้องจุลทรรศน์ โดยที่ปลายด้านหนึ่งของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับ

กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุเซลล์ด้วยท่อซิลิโคน (silicone tube) ที่ช่องทางเข้า (inlet) โดยกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์จะถูกยึดไว้กับ เสาแขวนในลักษณะตั้งฉากกับพื้น และในส่วนของช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับ กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรด้วยท่อซิลิโคน ที่เชื่อมต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้ (automated syringe pump) รุ่น Fusion-F100 (Chemyx, USA) โดยทำการตั้งค่าให้ปั๊มทำงานเดินถอยหลัง เพื่อดูดของไหลตัวกลางและเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ การติดตั้งระบบเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆที่ใช้ในการทดลอง สามารถแสดงให้เห็นใน ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 เป็นภาพจำลองการติดตั้งอุปกรณ์ (instrumentation) ที่ใช้ในการทดลองเพื่อดักจับเซลล์ โดยอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างขึ้นมา โดยอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง กล้องบันทึกภาพวีดีโอแบบดิจิตอล ชุดเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ทำการประมวลผลภาพ โดยที่อุปกรณ์จะถูกวางลงบนกล้องจุลทรรศน์และเชื่อมปลายด้านหนึ่งของอุปกรณ์เข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์ และในส่วนของช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่ต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้

1.5. การดักจับเซลล์มะเร็งด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

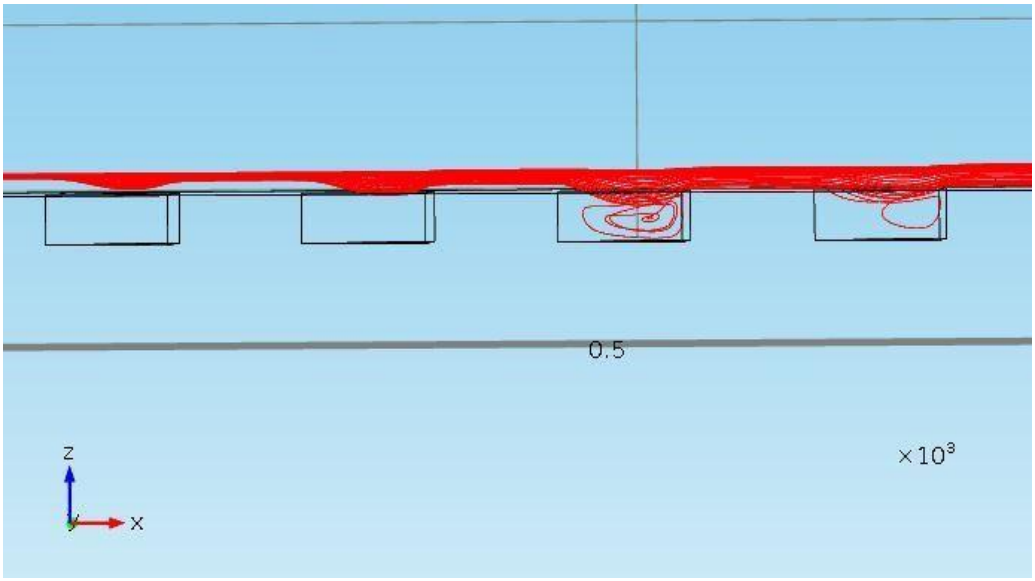
ทำการทดลองการใช้อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อทดลองดักจับเซลล์มะเร็งจริง โดยเซลล์ที่นำมาใช้จะเป็นเซลล์มะเร็งผิวหนังสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ โดยเริ่มจากการแยกเซลล์มะเร็งออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ด้วยเอนไซม์ trypsin โดยตัวอย่างก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังของสุนัขสดที่เก็บได้นั้น จะถูกตัดออกเป็นชิ้นขนาดน้ำหนักประมาณ 1 กรัม (ขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร) และถูกย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย

trypsin (trypsinization) โดยเติม 0.25% Trypsin ใน 0.01% EDTA ใน 500 µl PBS ลงในชิ้นเนื้อเยื่อ ใส่ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 % fetal calf serum (FCS) ปริมาณ 1 ml จากนั้นเซลล์มะเร็งจะถูกนำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เพื่อแยกเซลล์มะเร็งให้บริสุทธิ์ แล้วทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS อีก 2 ครั้ง และจึงเริ่มดำเนินการทดลอง โดยใช้ syringe pump เพื่อดูดสารแขวนลอยเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.1 ml ต่อชั่วโมงแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ชั่วโมง ทำการสังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ได้ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการชะล้างเซลล์แขวนลอยที่คงค้างอยู่ในระบบออกจนหมด ด้วยสารละลาย PBS โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.01 ml ต่อนาที

ผลการทดลอง

ผลการจำลองความเป็นไปได้ในการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation flow) ในหลุมเพาะเลี้ยง

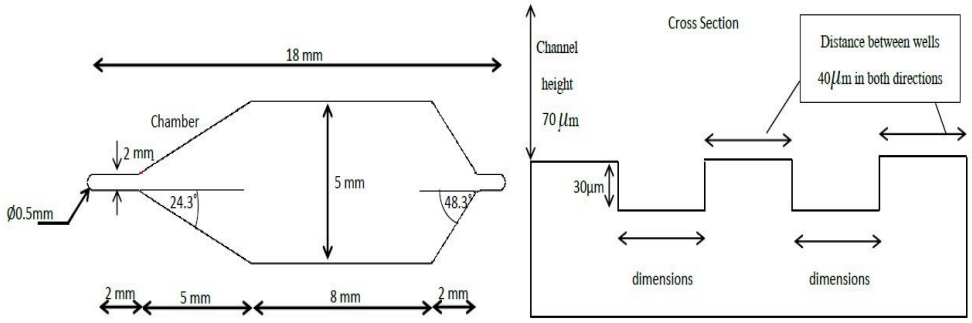
ผลการจำลองการทำงานของอุปกรณ์ด้วยโปรแกรม COMSOL™ Multiphysics (Comsol, USA) เพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการเกิดการไหลแบบหมุนวนในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการที่ใช้สำหรับดึงเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง จากการศึกษาพบว่าเมื่อของไหลตัวกลางเคลื่อนที่มาถึงบริเวณพื้นของอุปกรณ์แล้ว ถ้าบริเวณนั้นมีหลุมเพาะเลี้ยงอยู่ ของไหลตัวกลางที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเลี้ยวเบนและไหลลง สู่หลุมเพาะเลี้ยงและเกิดเป็นการไหลแบบหมุนวนขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยงขึ้น ซึ่งการไหลแบบหมุนวนนี้จะสามารถช่วยดึงเซลล์ที่อยู่ในแนวการไหลให้ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงได้ ลักษณะการเกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนสามารถจำลองให้เห็นได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ดังรูปที่ 7



<u>รูปที่ 7</u> แสดงความเป็นไปได้และลักษณะของการไหลวนของของเหลวตัวกลาง (recirculation flow) ที่ เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ที่ได้จากการจำลองด้วยระบบคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม COMSOL™ Multiphysics

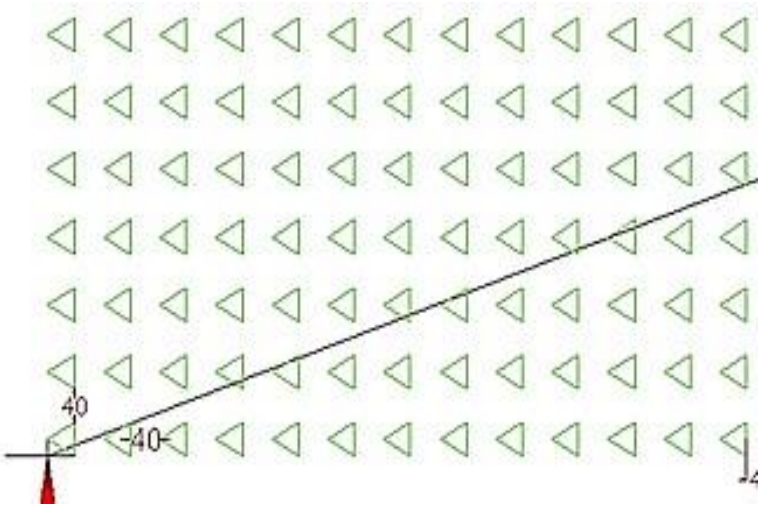
ผลการออกแบบและสร้างอุปกรณ์

เมื่อได้ทำการจำลองความเป็นไปได้ ในการเกิดรูปแบบการไหลวนของของไหลตัวกลางในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมแล้ว ผลการศึกษาดังกล่าวได้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเกิดการไหลแบบหมุนวนภายใต้ค่าพารามิเตอร์เชิงมิติ (dimensional parameter) ของหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมตามที่กำหนด จากนั้นจึงได้ทำการออกแบบและเขียนแบบอุปกรณ์โดยใช้ซอฟท์แวร์เขียนแบบ AutoCAD™ (Autodesk, USA) ในการเขียนแบบพิมพ์เขียว (blueprint) ของอุปกรณ์ต้นแบบ ซึ่งแสดงให้เห็น ดัง<u>รูปที่ 8</u>



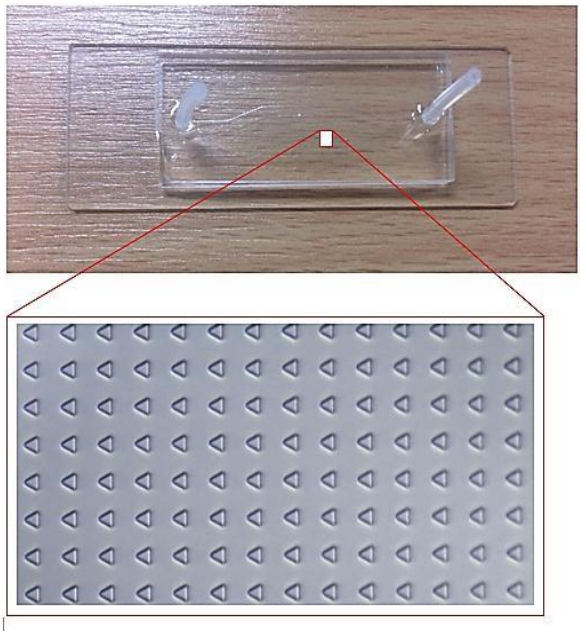
<u>รูปที่ 8</u> แสดงภาพแบบภาพพิมพ์เขียว (blueprint) ที่เขียนแบบด้วยโปรแกรม AutoCAD™ ซึ่งแบบพิมพ์เขียวที่ได้จะนำไปใช้สร้างแม่พิมพ์ซิลิกอน (silicon mold) ที่ใช้สำหรับสร้างและประกอบอุปกรณ์ต่อไป ลักษณะของอุปกรณ์ประกอบไปด้วยสองส่วนหลักที่ถูกเชื่อมติดกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน ซึ่งส่วนประกอบหลักทั้งสองส่วนได้แก่ ส่วนที่เป็นช่องการหลัก (main flow channel) ซึ่งทำหน้าที่เป็น ช่องผ่านเข้าออกของของไหลตัวกลางและเซลล์ โดยทำการลดความสูงจากเดิมที่เคยได้รายงานไว้ในอุปกรณ์ของ Park และคณะ (2010) จาก 160 μm เหลือ 70 μm เพื่อเพิ่มโอกาสให้เซลล์อยู่ระดับชั้นของการไหลของของไหล ตัวกลางที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น โดยที่ปลายของช่องหลักด้านหนึ่งจะมีช่องทางเข้าของของ ไหลตัวกลางและเซลล์ (inlet) จำนวน 1 ช่องซึ่งจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ และช่องทางออก (outlet) จำนวน 1 ช่องซึ่งจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่เชื่อมต่อกับปั๊มอัตโนมัติ และภายในช่องการไหลหลักจะมีลักษณะเป็นช่องทางเดินของของไหลตัวกลางที่มีลักษณะตามภาคตัดขวาง

เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ในส่วนที่สองของอุปกรณ์จะเป็นส่วนที่มีชุดของหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ที่มีการวางตัวต่อกันเป็นแถวยาวและแต่ละแถววางตัวขนานกันไป (microwell array) ซึ่งโดยแต่ละหลุมเพาะเลี้ยงในแต่ละแถวจะอยู่ห่างกัน 40 μm และแต่ละแถวก็อยู่ห่างกัน 40 μmเช่นกัน ส่วนขนาดของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุม จะความยาวของด้านสามเหลี่ยมเท่ากับ 40 μm และมีความลึกเท่ากับ 30 μm ตามลำดับ ลักษณะการเรียงตัวของชุดของหลุมเพาะเลี้ยงสามารถแสดงให้เห็นได้ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงการเรียงตัวของชุดหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม (triangular microwell array) ที่อยู่ที่พื้นด้านล่างของอุปกรณ์ ที่ทำหน้าที่ดักจับเซลล์ โดยแต่ละหลุมเพาะเลี้ยงในแต่ละแถวจะอยู่ห่างกัน 40 μm ส่วนขนาดของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุมจะมีขนาดความยาวของด้านสามเหลี่ยมเท่ากับ 40 μm และมีความลึกเท่ากับ 30 μm ตามลำดับ

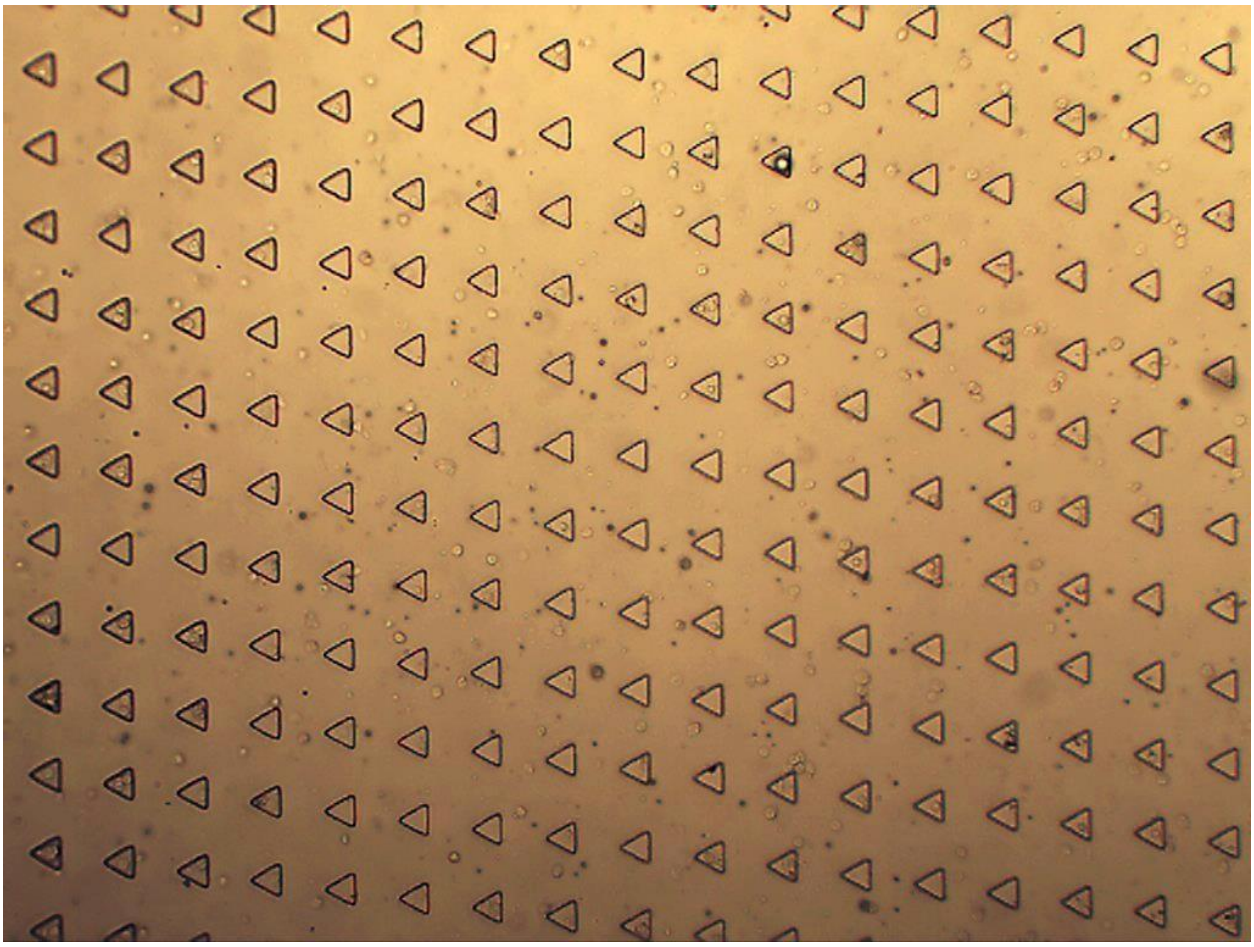
โดยอุปกรณ์ที่สร้างและประกอบขึ้นมาในครั้งนี้ ถูกสร้างขึ้นมาด้วยเทคนิค soft lithography โดยใช้สารโพลีเมอร์ประเภท polydimethyl siloxane (PDMS) สำหรับสร้างเป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถ สร้างและประกอบอุปกรณ์ขึ้นมาได้เป็นผลสำเร็จด้วยเทคนิคดังกล่าว และได้อุปกรณ์ที่มีลักษณะดังรูปที่ 10



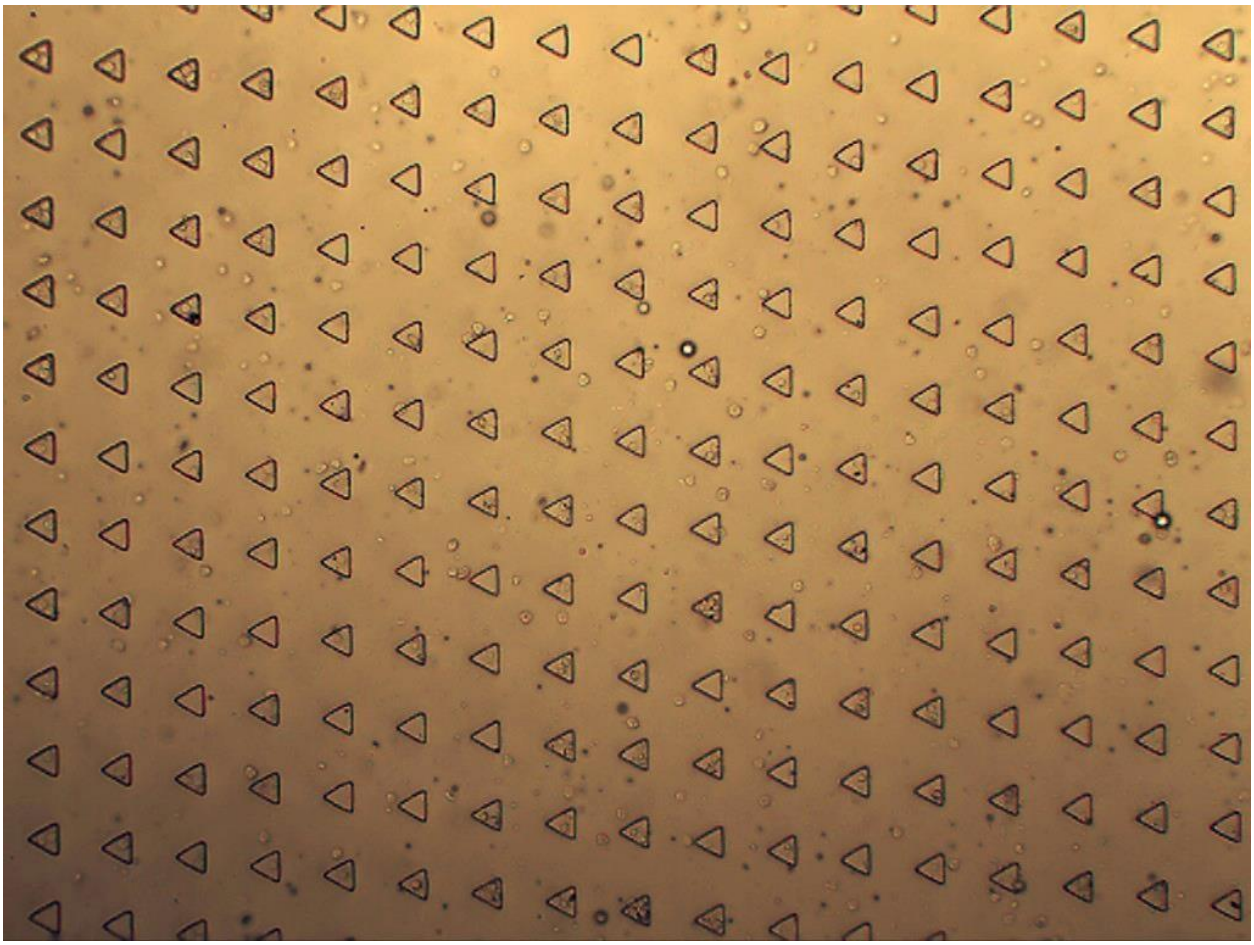
<u>รูปที่10</u> แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างและประกอบขึ้นมา ด้วยเทคนิค softlithography ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยภาพขยายจะแสดงให้เห็นถึงชุดของหลุมเพาะเลี้ยงรูปสามเหลี่ยมที่ จัดเรียงตัวอยู่ในส่วนที่สองของอุปกรณ์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์

ผลการใช้อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคในการดักจับเซลล์เนื้องอกชนิดกลมชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข

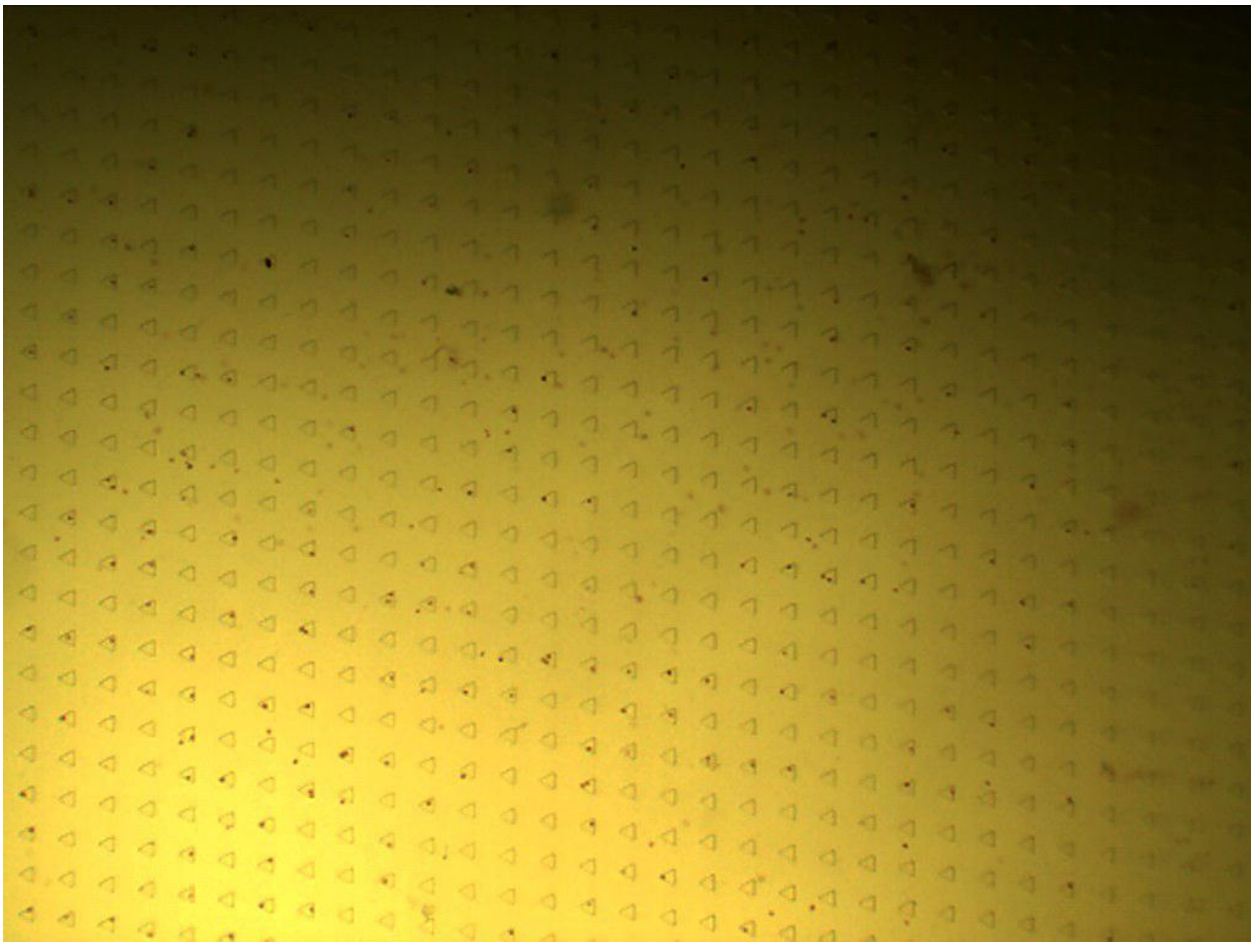
จากผลการทดลองพบว่าอุปกรณ์ดักจับเซลล์ที่สร้างขึ้นมา มีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เดี่ยวของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ โดยอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นนั้นมีความสามารถในการดักจับเซลล์มาสต์เซลล์จำนวน 1 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์ คิดเป็นร้อยละ 29.83, 27.78 และ 33.89 ตามลำดับ ความสามารถในการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ จำนวน 2 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์คิด เป็นร้อยละ 7.20, 9.77 และ 10.11 ตามลำดับ และมีความสามารถในการดักจับเซลล์มาสต์จำนวนมากกว่าหรือ เท่ากับ 3 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์คิดเป็นร้อยละ 2.56 2.68 และ 3.55 ตามลำดับ โดยลักษณะของการดักจับเซลล์มาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์ สามารถแสดงให้เห็นได้ ดัง<u>รูปที่ 11-12</u> ตามลำดับ



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งมาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านหน้าของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 200X) โดยเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์จะมีสักษณะรูปทรงกลมไม่ติดสีอยู่ในหลุม



<u>รูปที่ 12</u> แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยง<u>บริเวณตรงกลาง</u>ของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 200X)



รูปที่ 13 แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านท้ายของอุปกรณ์ (กำลังขยาย 100X)

ซึ่งประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขสามารถสรุปได้ ดังตารางที่ 1

	ไม่มีเซลล์	1 เซลล์	2 เซลล์	≥ 3 เซลล์	รวม
ด้านหน้า	638	315	76	27	1,056
ร้อยละ	60.41667	29.82955	7.19697	2.556818	100
ตรงกลาง	624	290	102	28	1,044
ร้อยละ	59.77011	27.77778	9.770115	2.681992	100
ด้านหลัง	503	325	97	34	959
ร้อยละ	52.45047	33.88947	10.1147	3.54536	100

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขในที่พบในแต่ละช่วงของอุปกรณ์ พบเซลล์ถูกจับเป็น ลักษณะเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่ด้านหลังและด้านหน้าของอุปกรณ์ ค่าเฉลี่ยเซลล์เดี่ยวที่ดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลม ได้ร้อยละ 30

สรุปผลและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 1

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็น ถึงผลสำเร็จในการออกแบบและประกอบอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidics-based device) ที่สามารถนำมาใช้ดักจับอนุภาคที่แขวนลอยในของไหลตัวกลางได้แก่ เม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm เซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ที่มีขนาดในช่วง 10-20 μm และเซลล์ Jukat cell line ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการออกแบบอุปกรณ์นั้นจะใช้หลักการขั้นพื้นฐานทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) โดย Park และคณะ (2010) มาเป็นปัจจัยหลักในการพิจารณา โดยหลักการทำงานของอุปกรณ์จะเป็นการทำงานโดยที่ไม่ต้องประยุกต์ใช้สนามของแรงจากภายนอก (external force field) เป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่ของอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลตัวกลางจะมีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนการไหลของของไหลตัวกลางด้วยแรงเฉื่อย (inertial force) การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัม ของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่อนุภาคแต่ละตัวจะถูกดึงให้ตกลงสู่พื้นล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force) ที่กระทำต่ออนุภาค เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงอนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation force) ของของไหลตัวกลางเกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยง นอกจากนี้รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่มีความแรงที่สุด และเพิ่มความน่าจะเป็นในการที่จะดักจับอนุภาครวมทั้งเซลล์เป้าหมายให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงเพียงอนุภาคเดียว เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตอื่นๆ เช่น วงกลมและสี่เหลี่ยมจัตุรัส

ก่อนที่จะทำการออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการทำการจำลองให้เห็นถึงความน่าจะเป็น ในการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางเกิดขึ้น โดยในการจำลองจะกำหนดให้ หลุมเพาะเลี้ยงมีรูปทรงแบบสามเหลี่ยมที่มีความยาวของด้านสามเหลี่ยมเท่ากับ 40 μm และความลึก 30 μm ซึ่งจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่า ความแรงของการไหลแบบหมุนวน

จะมีขนาดที่เพียงพอที่จะดึงเอาอนุภาคลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง จากหลักการดังกล่าวทั้งหมดจึงนำมาสู่การออกแบบ และประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้โดยอุปกรณ์ได้ถูกประกอบด้วยวิธี soft-lithography โดยใช้ PDMS ทำหน้าที่เป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมาจะประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก ได้แก่ ช่องการไหลหลัก (main flow channel) สำหรับให้ของไหลตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีความสูงของช่องอยู่ที่ 70 μm และมีความกว้างเท่ากับ 500 μm โดยที่ปลายของอุปกรณ์ด้านหนึ่งจะต่อกับช่องทางเข้า inlet) จำนวน 1 ช่องและช่องทางออก (outlet) จะอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของอุปกรณ์ ภายหลังที่ติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับระบบควบคุมแล้ว โดยในชั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ polystyrene bead ขนาด 10 μm โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 ml ต่อชั่วโมง อย่างต่อเนื่องเพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมี ความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้ ผลจากการทดลองพบว่าอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ดักจับ เม็ดโพลีเมอร์ ได้โดยมีประสิทธิภาพของการดักจับอนุภาคที่บริเวณด้านหน้าคิดเป็น 63.25 เปอร์เซ็นต์ ตรงกลางคิด เป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์และด้านหลังคิดเป็น 19.67 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 20% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด อย่างไรก็ตามวิธีการนับดังกล่าวเป็นวิธีนับที่ถูกนำเสนอโดย Park และคณะ (2010) ซึ่งไม่สามารถสะท้อนประสิทธิภาพของอุปกรณ์ได้อย่างแท้จริง ต่อมาได้ทดลองการใช้อุปกรณ์ในการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัข โดยทำการทดลองแบบเดียวกับการทดลองโดยการใช้เม็ดโพลีเมอร์ polystyrene bead ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ คิดเป็น 22% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับในการทดลองด้วย polystyrene bead จากผลการทดลองทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี

อย่างไรก็ตามในอนาคต ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่องในส่วนของพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงแก้ไขอุปกรณ์ไปในอนาคต เพื่อทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ที่สูงขึ้นต่อไป

โครงการย่อยที่ 2

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้น การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ในอุปกรณ์ ประกอบด้วย 3 โครงการย่อยดังนี้

2.1 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

2.2 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ด้วยวิธีการดักจับเซลล์ใน แบบต่างๆ

2.3 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ บนอุปกรณ์ที่ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

2.1 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

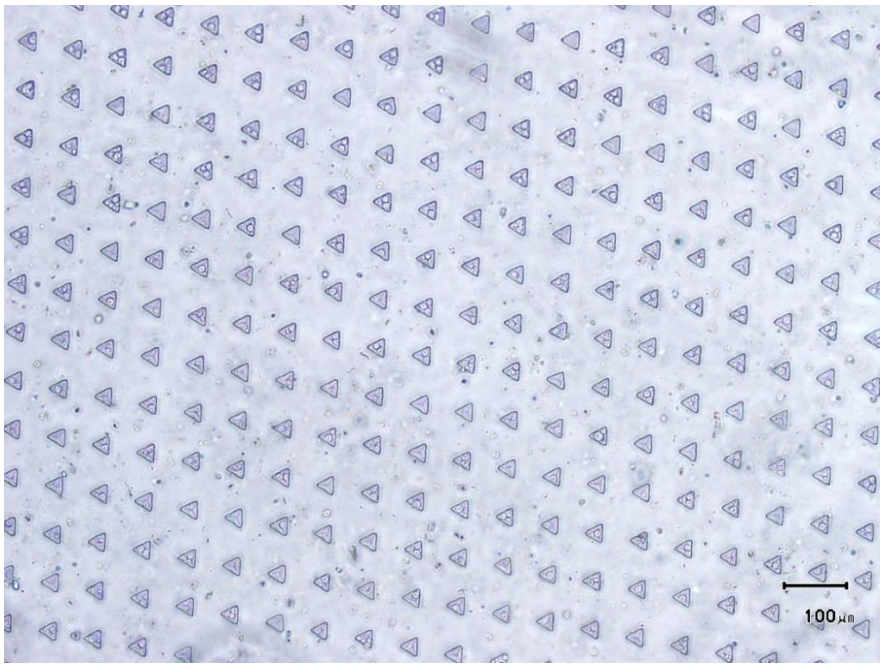
วัสดุและวิธีการ

ในขั้นตอนนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่เป็นเซลล์ไลน์ (cell line) ชนิด Jurkat cell ภายหลังจากที่เซลล์ได้ถูกดักจับเซลล์ให้อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยวในอุปกรณ์ดักจับเซลล์ เพื่อทำการศึกษาถึงรูปร่างลักษณะรวมทั้งพฤติกรรมทางชีวภาพบางส่วนของเซลล์มะเร็งเหล่านั้นและทำการตรวจสอบความมีชีวิต (cell vitality) ของเซลล์ที่ถูกดักจับและเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ด้วยวิธีการ Trypan blue dye exclusion assay

วิธีการ Trypan blue dye exclusion assay

ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้ นำตัวอย่างเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวลิมโฟไซท์ชนิดเฉียบพลันของมนุษย์ (human acute T-cell leukemia) ชนิด Jurkat cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลมคล้ายคลึงกับเซลล์ในอุดมคติ (ideal cell) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่เก็บได้จากหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral blood) ของผู้ป่วยที่เป็นโรค และผ่านขบวนการทางวิทยาศาสตร์เพื่อสร้างเป็นเซลล์ไลน์ มาเพาะเลี้ยงใน T-25 flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% v/v ของ fetal bovine serum (FBS) ผสมกับ 1% (v/v) ของยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (cultivation cabinet) ภายใต้สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาทำการทดลองดักจับเซลล์ Jurkat โดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำเป็นสารแขวนลอยของเซลล์ที่มีความ

เข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ $1.5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยก่อนทำการดักจับเซลล์ด้วยอุปกรณ์ เซลล์ Jurket ที่นำมาทดลองจะถูกตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสีย้อม trypan blue โดยนำสารแขวนลอยของเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับ 0.4% Trypan blue (HycloneTM, GE Healthcare Life Sciences, USA) จำนวน 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 3 นาที แล้วตรวจนับเซลล์ที่ติดสีบน hemocytometer ภายหลังการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์แล้ว ทำการนำสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้มาทำการดักจับด้วยอุปกรณ์ โดยทำการปล่อยสารแขวนลอยเซลล์ให้ไหลเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยปั๊มอัตโนมัติ ด้วยอัตราการไหลแบบต่อเนื่องที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเซลล์ในส่วนที่ไม่ถูกดักจับจะถูกล้างออกด้วย PBS หลังจากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์เดี่ยวที่ดักจับได้ และถ่ายภาพลักษณะของการดักจับเซลล์ภายในหลุมดักจับ (Microwell) ต่อจากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ดักจับ โดยทำการประเมินร้อยละของเซลล์เดี่ยวที่ถูกดักจับเทียบกับจำนวนหลุมดักจับที่มีจำนวนโดยเฉลี่ยที่ 12,480 หลุม ซึ่งวิธีการนับทำโดยทำการแบ่งพื้นที่บริเวณหลุมดักจับออกเป็น 16 ส่วนโดยใช้กริด (grid) แล้วทำการนับเซลล์ในกริดจำนวน 8 ช่อง **ดังรูปที่ 14**



รูปที่ 14 แสดงภาพพื้นที่บริเวณที่ทำการนับเซลล์ในอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

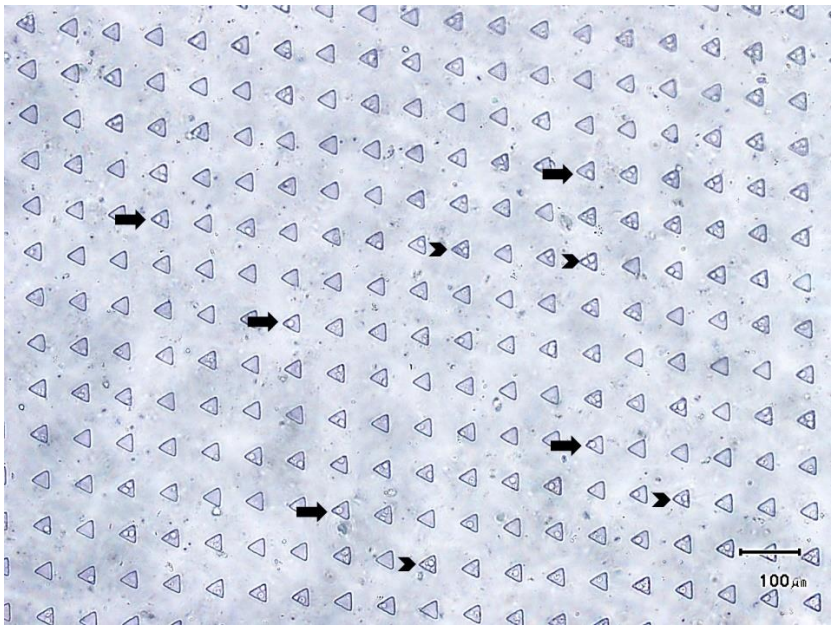
จากนั้นแล้วจึงทำการการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกดักจับบนอุปกรณ์ รวมทั้งตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการทดสอบหาความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมระดับจุลภาค

(microenvironment) ของอุปกรณ์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกดักจับและเพาะเลี้ยงภายในอุปกรณ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการหมุนเวียนอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มอัตโนมัติด้วยอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังผ่านการเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ ตามช่วงระยะเวลาที่กำหนดไว้ด้วยสี trypan blue โดยทำการผสม 0.4% Trypan blue (HycloneTM, GE Healthcare Life Sciences, USA) จำนวน 500 ไมโครลิตรใน PBS 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยPBS โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการย้อมสี Trypan blue ที่เตรียมไว้โดยการแทนที่ PBS ด้วยสี Trypan blue ด้วยอัตราการไหลเดียวกัน ทำการย้อมสี Trypan blue นาน 5 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย PBS จึงตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat **บนอุปกรณ์และการตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์**

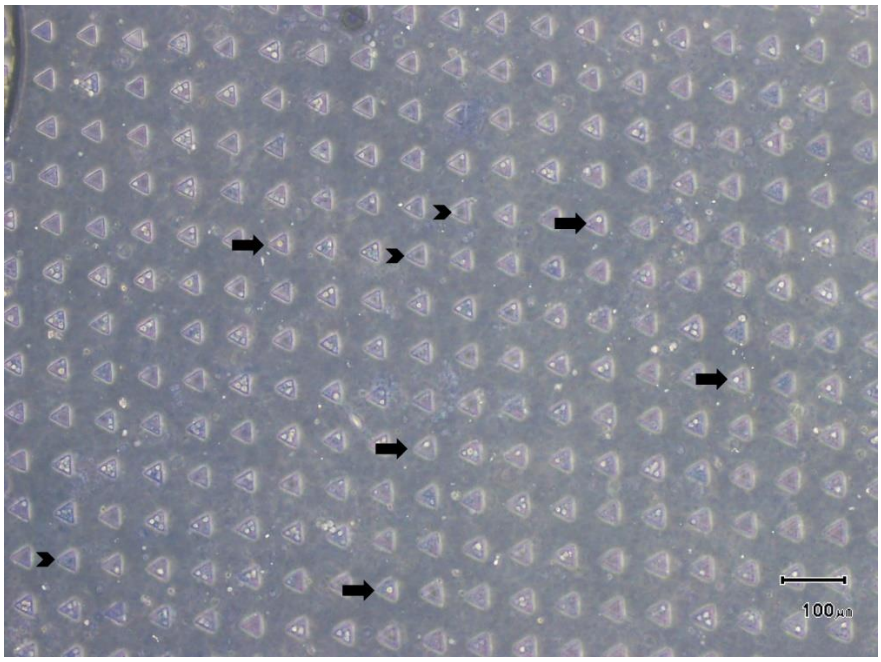
ผลการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะการทดลองที่กำหนด อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ Jurkat ได้ 42.36% คิดเป็นจำนวนหลุมดักจับที่ดักจับเซลล์จำนวน 2,660 หลุม โดยสามารถแยกเป็นหลุมที่ดักจับเซลล์เดี่ยวได้จำนวน 1,310 หลุม และเป็นหลุมที่ดักจับเซลล์ได้มากกว่า 1 เซลล์ขึ้นไปจำนวน 749 หลุมคิดเป็น 49.175 และ 27.50% ของจำนวนหลุมดักจับทั้งหมด ตามลำดับ ลักษณะการดักจับเซลล์ของอุปกรณ์สามารถแสดงให้เห็น **ดังรูปที่ 15**



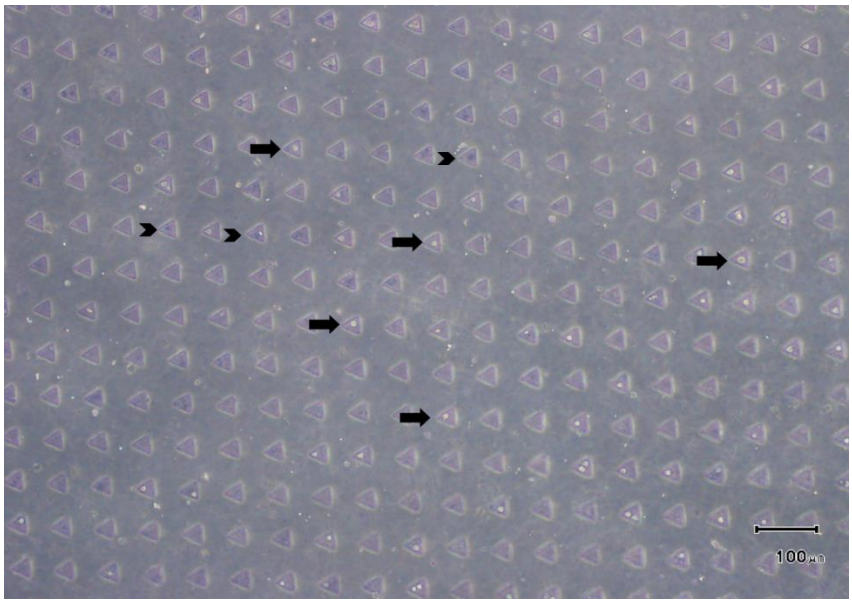
<u>รูปที่ 15</u> แสดงภาพลักษณะของเซลล์ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์ โดยมีทั้งเซลล์เดี่ยว (ลูกศร) และหลายเซลล์ (หัวลูกศร)

1.

นอกจากนี้จากการตรวจสอบความมีชีวิต (viability) ของเซลล์ด้วยเทคนิค trypan blue dye exclusion assay ภายหลังที่ถูกเพาะเลี้ยงอยู่ในอุปกรณ์พบว่า ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์เดี่ยว Jurkat ที่เพาะเลี้ยงยังมีความมีชีวิตอยู่จำนวนทั้งสิ้น 1,044 และ 344 เซลล์ตามลำดับ จากจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ถูกดักจับได้จำนวน 1,310 เซลล์ หรือคิดเป็น 79% และ 48.44% ตามลำดับ **<u>ดังรูปที่ 16 และ 17</u>** ตามลำดับ



รูปที่ 16 แสดงภาพผลการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอุปกรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี (ลูกศร) แต่เซลล์ตายจะย้อมติดสีฟ้า (หัวลูกศร)



รูปที่ 17 แสดงภาพผลการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอุปกรณ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี (ลูกศร) แต่เซลล์ตายจะย้อมติดสีฟ้า (หัวลูกศร)

2.2 การทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat cell line บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ด้วยวิธีการดักจับเซลล์ในแบบต่างๆ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวด้วยระบบของไหลจุลภาคได้ใช้ในการทดลอง เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวลิมโฟไซท์ชนิดเฉียบพลันของมนุษย์ (human acute T-cell leukemia) ชนิด Jurkat cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลมคล้ายคลึงกับเซลล์ในอุดมคติ โดยศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของอุปกรณ์ในการดักจับ และการเลี้ยงระหว่างวิธีปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคประกอบไปด้วย 2 ชั้น ชั้นบนคือช่องทางหลัก ขนาด 5x15 มิลลิเมตร ความสูง 70 ไมโครเมตร ส่วนชั้นล่างประกอบด้วยหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่าเรียงกันจำนวน 12,480 ไมโครเวลล์ โดยความสูงของรูปสามเหลี่ยมตามแนวระนาบเท่ากับ 40 ไมโครเมตร ความลึก 30 ไมโครเมตร จัดเรียงเป็นรูปแบบทิศทางเฉียงลงด้านล่าง อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคนี้ถูกผลิตขึ้นจากโพลีเมอร์เหลวชนิดโพลีไดเมททิลไซโลเซน (PDMS) ด้วยเทคนิค soft lithography จากโครงการย่อยที่ 1

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

2. เซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวลิมโฟไซท์ชนิดเฉียบพลันของมนุษย์ (human acute T-cell leukemia) Jurkat Cell line ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ใช้ในการศึกษาถูกเลี้ยงใน T-25 flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (11875-093; Invitrogen, U.S.A.) เสริมด้วย 10% (v/v) fetal bovine serum (10270-098; Invitrogen, U.S.A.) และ 1% (v/v) penicillin/streptomycin (15140-122; Invitrogen, U.S.A.)
3. **การโหลดเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์**

   ใช้สายสวนหลอดเลือดดำ 18G ความยาว 1.25 นิ้ว ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร และต่อเข้ากับอุปกรณ์ดักจับเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร จะทำการค่อยๆปล่อยเซลล์ด้วยอัตรา 0.2 มิลลิลิตร/ชั่วโมง โดยอาศัย syringe pump machine เพื่อควบคุมอัตราการไหลให้คงที่
4. **วิธีการดักจับเซลล์**

   3.1 การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีปกติ เซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการโหลดจะมีความเข้มข้น 1.5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อัตราการมีชีวิต $\geq$ 90% โดยใช้สีย้อม Trypan Blue ในการทดสอบการมีชีวิตของ

เซลล์ โหลดเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหลต่อเนื่อง 0.25 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ใช้เวลา 20 นาที/ช่องทางหลัก โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันที่ 37°C และ 5% CO_2

3.2 การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) เซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการโหลดจะมีความเข้มข้น 1.5×106 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อัตราการมีชีวิต ≥ 90% โดยใช้สีย้อม Trypan Blue ในการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ โหลดเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหลต่อเนื่อง 0.25 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ใช้เวลา 20 นาที/ช่องทางหลัก และเสริมการหมุนเหวี่ยง 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งใช้ความเร็วในการเหวี่ยง 1,000 rpm/rcf เป็นเวลา 2 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4°C

5. การประเมินผลการศึกษา

ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ Inverted Phase Contrast Microscope (Olympus CKX41) กำลังขยาย 100 เท่า ด้วยการสุ่มถ่ายภาพ 35 พื้นที่/ช่องทางหลัก คิดเป็น 8,750 ไมโครเวลล์ หรือ ประมาณ 70% ของจำนวนไมโครเวลล์ทั้งหมด/ช่องทางหลัก ซึ่งแบ่งการประเมินผลในไมโครเวลล์จะแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ แบ่งตามจำนวนเซลล์ที่ดักจับได้ (เซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์) และแบ่งจากการมีชีวิตของเซลล์ในไมโครเวลล์ โดยใช้สีย้อม Trypan Blue ในการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ อัตราการโหลดของสีย้อมต่อช่องทางหลักคือ 0.25 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เวลา 1-3 นาที เซลล์ที่ตายจะให้ผลบวกโดยการติดสีย้อม Trypan Blue โดยจะประเมินการมีชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในอุปกรณ์ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง

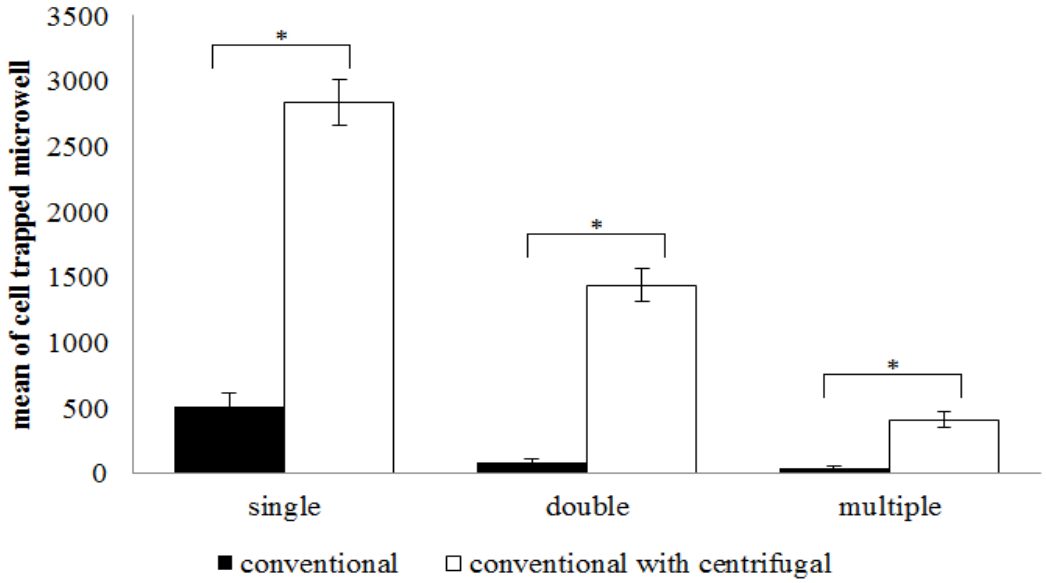
5. สถิติที่ใช้ในการศึกษา

จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์ จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้ Student's t-test ของ PROC TTEST SAS Software ในการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มีชีวิต (จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์) ที่ถูกดักจับกับวิธีที่แตกต่างกันในเวลาก่อนการทดลอง และใช้ Chi square method ในการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับกับวิธีที่แตกต่างกันในทุกช่วงเวลา นอกจากนี้ยังใช้ Logistic regression statistic method ในเปรียบเทียบการศึกษาความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับกับวิธีที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา

6. ผลการศึกษา

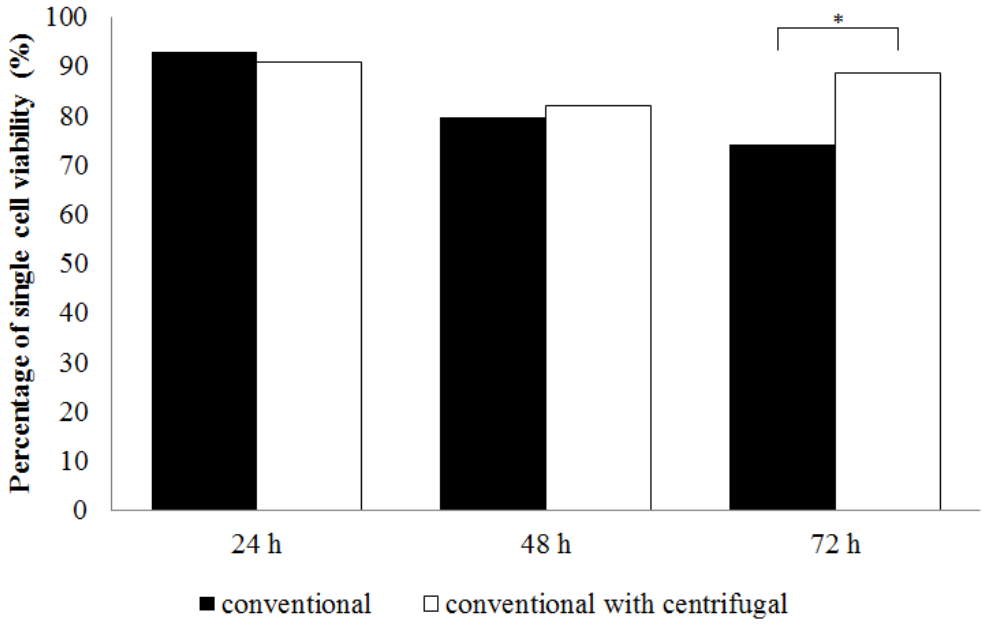
ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มีชีวิต (จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์) ที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในเวลาก่อนการทดลอง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM) จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หลายเซลล์ ในวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติ คือ 504.00±100.38, 81.33±25.69 และ 34.67±19.97 ตามลำดับ ส่วนจำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หลายเซลล์ ในวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยง คือ 2834.3±172.74, 1434.70±125.01 และ 405.67±56.69

ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า จำนวนเซลล์ของวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงมีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ของวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)* **ดังรูปที่ 18**



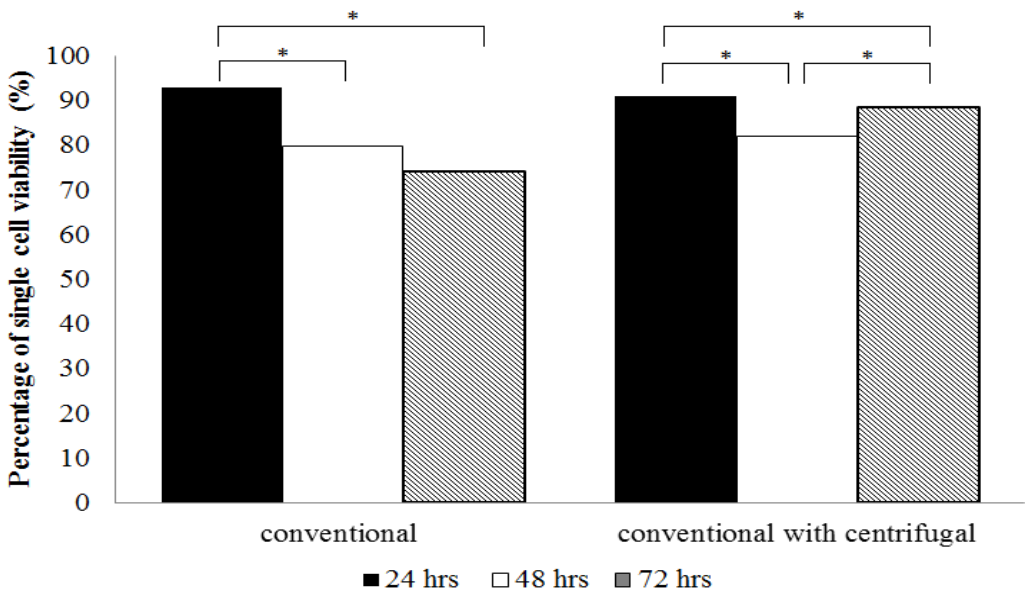
รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มีชีวิต (จำนวนเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และหลายเซลล์) ที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในเวลาก่อนการทดลอง (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM) *(p<0.05)*

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง คือ 92.9% (771/830) 79.7% (417/523) และ 74.1% (735/992) ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง คือ 91.0% (8115/8917) 82.1% (1260/1534) และ 88.6% (2182/2463) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงเปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงมีเปอร์เซ็นต์มากกว่าเปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)* **ดังรูปที่ 19**



<u>รูปที่ 19</u> แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง *($p<0.05$)*

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในแต่ละช่วงเวลา แสดงให้เห็นว่าเซลล์เดี่ยวมีชีวิตของทั้ง 2 วิธีมีเปอร์เซ็นต์สูงที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง แต่เปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตลดลงในช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น ในวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงกับ 48 ชั่วโมงและที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงกับ 72 ชั่วโมง ส่วนวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยง เปอร์เซ็นเซลล์เดี่ยวมีชีวิตมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบในทุกช่วงเวลา *($p<0.05$)* **<u>ดังรูปที่ 20</u>**



<u>รูปที่ 20</u> แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวมีชีวิตที่ถูกดักจับระหว่างวิธีเลี้ยงเซลล์ปกติกับวิธีปกติที่เสริมด้วยการหมุนเหวี่ยงในแต่ละช่วงเวลา *($p<0.05$)*

2.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสท์เซลล์จากสุนัข (canine mast cell tumor) บนอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidics-based device) และการตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

การศึกษาความหลากหลายของชนิดของเซลล์มะเร็ง มีความสำคัญในการพัฒนาสำหรับการใช้งานอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค เพื่อความสามารถในการดักจับและเลี้ยงเซลล์ เซลล์มะเร็งของสุนัขชนิด canine mast cell tumor จึงถูกนำมาทดสอบ เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้มีอุบัติการณ์ที่สูงในสัตว์เลี้ยง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ในขั้นตอนนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดมาสท์เซลล์ของสุนัข หรือ cMCT (canine mast cell tumor; cMCT) เก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งที่ได้รับการผ่าตัดออกจากสุนัขป่วย โดยได้รับการอนุญาตจากเจ้าของสุนัขป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายหลังจากที่เซลล์ได้ถูกดักจับให้อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยวในอุปกรณ์ดักจับเซลล์ เพื่อทำการศึกษาถึงรูปร่างลักษณะ รวมทั้งพฤติกรรมทางชีวภาพบางส่วนของเซลล์มะเร็งเหล่านั้น

และทำการตรวจสอบความมีชีวิต (cell viability) ของเซลล์ที่ถูกดักจับและเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ด้วยวิธีการ Trypan blue dye exclusion assay ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

นำตัวอย่างเซลล์ cMCT ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลมคล้ายคลึงกับเซลล์ในอุดมคติ (ideal cell) โดยเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่เก็บได้จากก้อนมะเร็งที่ผิวหนังของสุนัข และผ่านกระบวนการเก็บตัวอย่างเซลล์ให้อยู่ในรูป cell suspension จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle *Medium*) high glucose ที่มี 10% v/v ของ fetal bovine serum (FBS) ผสมกับ 1% (v/v) ของยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin และ 1% (v/v) ของ glutamine โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (cultivation cabinet) ภายใต้สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C

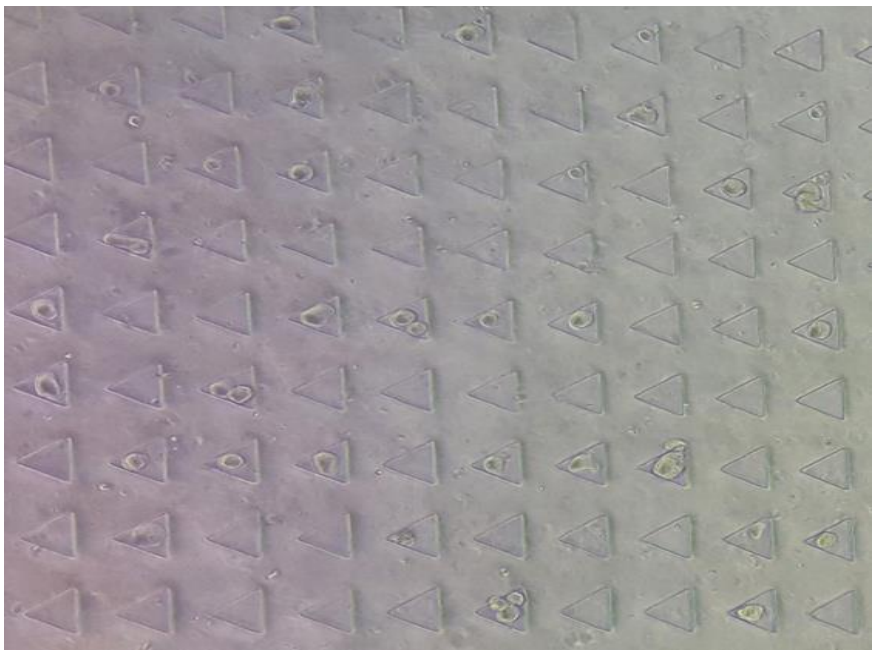
ต่อมาทำการทดลองดักจับเซลล์ cMCT โดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำเป็นสารแขวนลอยของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ $1.5x10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยก่อนทำการดักจับเซลล์ด้วยอุปกรณ์เซลล์ cMCT ที่นำมาทดลองจะถูกตรวจสอบความมีชีวิต ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยนำสารแขวนลอยของเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับ 0.4% Trypan blue (HycloneTM, GE Healthcare Life Sciences, USA) จำนวน 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 3 นาที แล้วตรวจนับเซลล์ที่ติดสีบน hemocytometer ภายหลังการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์แล้ว ทำการนำสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้มาทำการดักจับด้วยอุปกรณ์ โดยทำการปล่อยสารแขวนลอยเซลล์ให้ไหลเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยปั๊มอัตโนมัติ ด้วยอัตราการไหลแบบต่อเนื่องที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเซลล์ในส่วนที่ไม่ถูกดักจับจะถูกล้างออกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์เดี่ยวที่ดักจับได้ และถ่ายภาพลักษณะของการดักจับเซลล์ภายในหลุมดักจับ (Microwell)

จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกดักจับบนอุปกรณ์ รวมทั้งตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการทดสอบหาความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมระดับจุลภาค (microenvironment) ของอุปกรณ์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกดักจับและเพาะเลี้ยงภายในอุปกรณ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มอัตโนมัติด้วยอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังผ่านการเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion assay โดยทำการผสม 0.4% Trypan blue (HycloneTM, GE Healthcare Life Sciences, USA) จำนวน 500 ไมโครลิตรใน PBS 500 ไมโครลิตร

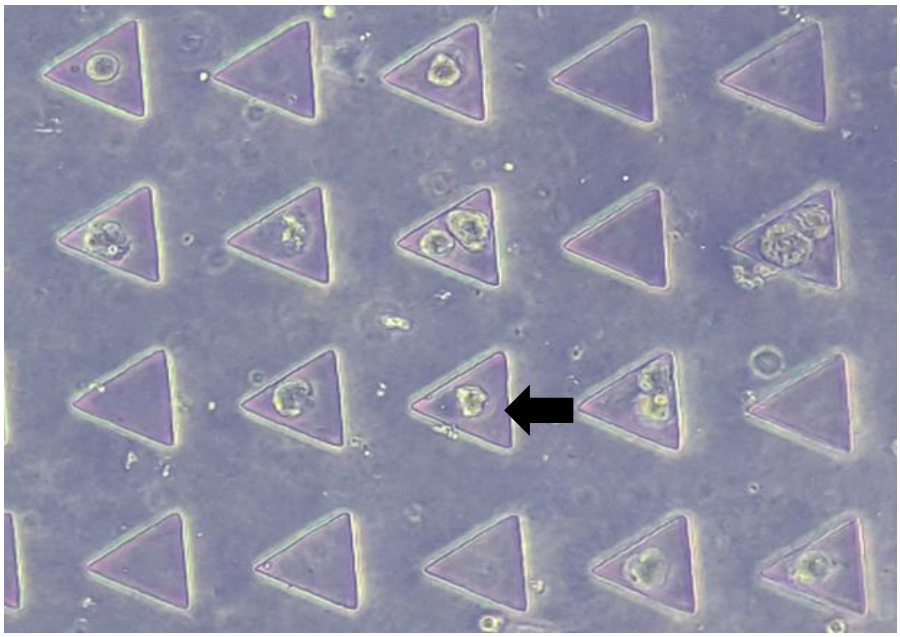
จากนั้นทำการแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารดังกล่าว โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย PBS จากนั้นจึงทำการตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ cMCT บนอุปกรณ์และการตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์

ผลการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะการทดลองที่กำหนด อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ cMCT **ดังรูปที่ 21** แต่เซลล์ cMCT ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในอุปกรณ์ได้ และเริ่มตายเมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 24-48 ชั่วโมง **ดังรูปที่ 22**



รูปที่ 21 แสดงภาพลักษณะของเซลล์ cMCT ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์



<u>รูปที่ 22</u> แสดงภาพลักษณะของเซลล์ cMCT ที่ถูกดักจับได้จากอุปกรณ์ ในชั่วโมงที่ 72 พบว่าเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจากเดิมและพบเซลล์ตาย (ลูกศร)

สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 2

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็น ถึงผลสำเร็จในการออกแบบและประกอบอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidics-based device) ที่สามารถนำมาใช้ดักจับอนุภาคที่แขวนลอยในของไหลตัวกลาง โดยใช้เซลล์ไลน์ Jukat cell line ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการออกแบบอุปกรณ์นั้นจะใช้หลักการขั้นพื้นฐานทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) โดย Park และคณะ (2010) มาเป็นปัจจัยหลักในการพิจารณา โดยหลักการทำงานของอุปกรณ์จะเป็นการทำงานโดยที่ไม่ต้องประยุกต์ใช้สนามของแรงจากภายนอก (external force field) เป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่ของอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลตัวกลางจะมีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนการไหลของของไหลตัวกลางด้วยแรงเฉื่อย (inertial force) การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่อนุภาคแต่ละตัวจะถูกดึงให้ตกลงสู่พื้นล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force) ที่กระทำต่ออนุภาค เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงอนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation force) ของของไหลตัวกลางเกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยง นอกจากนี้รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่มีความแรงที่สุด และเพิ่มความ

น่าจะเป็นในการที่จะดักจับอนุภาครวมทั้งเซลล์เป้าหมายให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงเพียงอนุภาคเดียว เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตอื่นๆ เช่น วงกลมและสี่เหลี่ยมจัตุรัส

ก่อนที่จะทำการออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการทำการจำลองให้เห็นถึงความน่าจะเป็น ในการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางเกิดขึ้น โดยในการจำลองจะกำหนดให้ หลุมเพาะเลี้ยงมีรูปทรงแบบสามเหลี่ยมที่มีความยาวของด้านสามเหลี่ยมเท่ากับ 40 μm และความลึก 30 μm ซึ่งจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่า ความแรงของการไหลแบบหมุนวนจะมีขนาดที่เพียงพอที่จะดึงเอาอนุภาคลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง จากหลักการดังกล่าวทั้งหมดจึงนำมาสู่การออกแบบ และประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้โดยอุปกรณ์ได้ถูกประกอบด้วยวิธี soft-lithography โดยใช้ PDMS ทำหน้าที่เป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมาจะประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก ได้แก่ ช่องการไหลหลัก (main flow channel) สำหรับให้ของไหลตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีความสูงของช่องอยู่ที่ 70 μm และมีความกว้างเท่ากับ 500 μm โดยที่ปลายของอุปกรณ์ด้านหนึ่งจะต่อกับช่องทางเข้า inlet) จำนวน 1 ช่องและช่องทางออก (outlet) จะอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของอุปกรณ์ ภายหลังที่ติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับระบบควบคุมแล้ว โดยในชั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ polystyrene bead ขนาด 10 μm โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 ml ต่อชั่วโมง อย่างต่อเนื่องเพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมี ความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้ ผลจากการทดลองพบว่าอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ดักจับ เม็ดโพลีเมอร์ ได้โดยมีประสิทธิภาพของการดักจับอนุภาคที่บริเวณด้านหน้าคิดเป็น 63.25 เปอร์เซ็นต์ ตรงกลางคิด เป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์และด้านหลังคิดเป็น 19.67 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 20% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด อย่างไรก็ตามวิธีการนับดังกล่าวเป็นวิธีนับที่ถูกนำเสนอโดย Park และคณะ (2010) ซึ่งไม่สามารถสะท้อนประสิทธิภาพของอุปกรณ์ได้อย่างแท้จริง ต่อมาได้ทดลองการใช้อุปกรณ์ในการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัข โดยทำการทดลองแบบเดียวกับการทดลองโดยการใช้เม็ดโพลีเมอร์ polystyrene bead ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ คิดเป็น 22% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับในการทดลองด้วย polystyrene bead **(อ้างอิงจากผลการทดลองในปีที่ 1)** จากผลการทดลองทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี

ในการศึกษาปีที่ 2 นี้ การดักจับและเพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat ผลการทดลองพบว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ PDMS เป็นวัสดุในการสร้างอุปกรณ์นั้น มีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ละเลี้ยง

เซลล์ leukemia cell line ชนิด Jurkat cell ได้ โดยมีอัตราการดักจับเซลล์เดี่ยวอยู่ที่ 49.17% เนื่องจากหลุมดักจับรูปทรงสามเหลี่ยมที่ออกแบบไว้ มีความสามารถในการสร้างการไหลแบบหมุนวนภายในหลุมได้เป็นอย่างดี รวมทั้งสามารถช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์อื่นๆตกลงมาในหลุมดักจับที่มีเซลล์อยู่แล้วได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคแบบ passive hydrodynamic โดยไม่มีการใช้สนามของแรงจากภายนอก ยังช่วยลดความเสี่ยงในการที่จะทำให้เซลล์ที่ถูกดักจับและเพาะเลี้ยงเปลี่ยนคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological property) ของเซลล์

จากการทดสอบความมีชีวิตอยู่ (viability) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมาในครั้งนี้ ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% พบว่า Jurkat cell ที่ถูกเพาะเลี้ยงสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 48-72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าว อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์ที่เลี้ยงมีจำนวนลดลงตามชั่วโมงที่ใช้ศึกษา ดังนั้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงแก้ไขอุปกรณ์ ไปในอนาคต เพื่อทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์และเพาะเลี้ยงที่สูงขึ้นต่อไป รวมทั้งควรมีการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และการทำงานของเซลล์ (cell function) ของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมาในครั้งนี้ เพื่อเพิ่มความถูกต้องในประสิทธิภาพของอุปกรณ์ รวมทั้งควรทำการทดสอบอุปกรณ์กับเซลล์ชนิดอื่นๆด้วย เพื่อดูผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์กับผลในการศึกษาครั้งนี้ ก่อนที่จะนำอุปกรณ์นี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยระดับเซลล์เดี่ยวต่อไป

ในส่วนของการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat บนอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ด้วยวิธีการดักจับเซลล์ในแบบต่างๆนั้น พบว่า วิธีการดักจับเซลล์ปกติร่วมกับวิธีหมุนเหวี่ยงมีจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงที่สามารถดักจับเซลล์ได้มากกว่าวิธีแบบปกติอย่างมีนัยสำคัญในทุกรูปแบบของการดักจับเซลล์ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงของแต่ละวิธีนั้น เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคจะถูกนำมาย้อมด้วยสีทริปแพนบลูที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อประเมินการมีชีวิตรอดของเซลล์ เซลล์เดี่ยวที่ถูกดักจับภายใต้อุปกรณ์ในแต่ละช่วงเวลาจะถูกนับด้วยวิธีการเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ระหว่างสองวิธี พบว่าการดักจับเซลล์ด้วยวิธีปกติร่วมกับวิธีหมุนเหวี่ยงแสดงเปอร์เซ็นต์มีชีวิตรอดที่สูงกกว่าวิธีปกติที่เวลา 48 ชั่วโมง และ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ทั้งสองวิธียังแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตรอดสูงที่เวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การมี

ชีวิตรอดที่ 48 และ 72 ชั่วโมงนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยสรุปแล้วการเพิ่มวิธีหมุนเหวี่ยงร่วมกับวิธีปกติมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ ในส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ซึ่งสูงที่ 24 ชั่วโมงแรกของทั้งสองวิธีนั้น ในเวลาต่อมาได้มีค่าที่ลดหลั่นกันตามเวลาที่ทำการทดลอง สาเหตุการลดลงดังกล่าวอาจจะมาจากสภาพแวดล้อมภายในหลุมเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม ขาดการสื่อสารระหว่างเซลล์ รวมทั้งอาจจะมีการเพิ่มขึ้นของของเสียจากการใช้พลังงานของเซลล์

สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด canine mast cell tumor บนอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค และตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์นั้น พบว่าอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค สามารถนำมาใช้ดักจับเซลล์ cMCT ที่มีขนาดในช่วง 10-20 μm ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่สามารถเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในระยะยาวได้ อาจเนื่องจากมีสภาพสิ่งแวดล้อมระดับจุลภาคไม่เหมาะสม เช่น เซลล์ขาดการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-cell communication) เซลล์อาจมีความต้องการสารประเภทโกรทแฟคเตอร์ (growth factors) และปัจจัยที่ช่วยในการดำรงชีพ (survival factors) ต่าง ๆ จากเซลล์ข้างเคียง และสารอาหารไม่สามารถลงไปยังบริเวณ microwells ได้ รวมไปถึงไม่สามารถกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic waste) ของเซลล์ภายใน microwell ได้ ดังนั้นเซลล์ cMCT ที่ถูกดักจับในอุปกรณ์นี้ จึงไม่สามารถเติบโตและแบ่งเซลล์ต่อไปได้

ปัญหาและอุปสรรคของงานวิจัยในครั้งนี้

ปัญหาและอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ ด้วยข้อจำกัดของอุปกรณ์ คือ เซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิสามารถมีชีวิตอยู่ได้เพียงระยะสั้นประมาณ 72 ชั่วโมงเท่านั้น โดยหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 72 ชั่วโมงเซลล์จะเริ่มมีอัตราการตายที่สูงเกินกว่า 50% ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการมีอัตราส่วนระหว่าง surface area to volume (SAV) ratio ที่สูงเกินไป ทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) ภายในอุปกรณ์มีปริมาตรน้อย เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์และพื้นที่ ดังนั้นจึงอาจทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตและการเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมไปถึงความถี่ในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อาจเว้นระยะห่างระหว่างการเปลี่ยนนานเกินไป ทำให้เกิดการสะสมของ metabolic waste สูงภายในอุปกรณ์ ร่วมกับการที่แรงดันจากการเปลี่ยนอาหารด้วย syringe pump ในอัตราเร็วดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการขับของเสียที่สะสมค้างอยู่ในบริเวณด้านล่างของหลุมดักจับ จึงทำให้ส่งผลเสียต่อการมีชีวิตอยู่และการเจริญเติบโตของเซลล์

ข้อเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา

แนวทางการแก้ไขปัญหาของโครงการวิจัยนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวในอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างด้วยวัสดุ PDMS เพื่อศึกษาถึงรูปร่าง ลักษณะ และพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์ที่แยกได้ การพัฒนาให้สามารถเลี้ยงเซลล์ได้นานขึ้น คือ ปรับรูปแบบอุปกรณ์เพื่อให้มีค่า SAV ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง เช่นการปรับความสูงของ main channel ให้สูงขึ้น เพื่อให้มีค่า SAV ที่ต่ำลงร่วมกับการปรับและหาระยะเวลาความถี่ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยอาจต้องทำการเปลี่ยนอาหารให้ถี่ขึ้นจากทุก 24 ชั่วโมงเป็นทุก 8-12 ชั่วโมง หรือปรับให้มีการ flow อาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดเวลา (continuous flow) เป็นต้น เพื่อเป็นการล้างของเสียที่สะสมอยู่ในอุปกรณ์ออก และเป็นการนำเอาสารอาหารใหม่และ oxygen ให้แก่เซลล์เพาะเลี้ยง ปรับขนาดของหลุมดักจับเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้เซลล์อยู่เป็นกลุ่มเล็กๆ หรือมากกว่า 1 เซลล์ และเกิดการสื่อสารระหว่างเซลล์ รวมทั้งการพัฒนากล่องควบคุมอุณหภูมิเพื่อเลี้ยงเซลล์บนกล้องจุลทัศน์เพื่อศึกษาพฤติกรรมของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้คือ ความสามารถในการใช้องค์ความรู้ของการไหลของของไหล มาออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมการไหลของของไหลจุลภาค เพื่อให้เกิดการจัดเรียงตัวของเซลล์ในของไหล นั้นให้เป็นสายของกระแสการไหลของเซลล์ ที่แยกออกจากกันตามขนาดของเซลล์ เพื่อทำการจัดเรียงเซลล์และคัด แยกเซลล์แต่ละชนิดออกมา ให้ได้ตามแต่ละขนาดที่ต้องการอย่างถูกต้องและเซลล์ที่ได้ยังมีชีวิตอยู่ และมี ความสามารถที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงให้มีการเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่นานขึ้น รวมทั้งสามารถนำเซลล์เหล่านั้นมาศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาต่างๆของเซลล์ ในระดับเซลล์เดี่ยวได้ต่อไป

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการศึกษาที่ได้จะถูกถ่ายทอด หรือถูกอ้างอิงไปสู่คณะวิจัยอื่นๆที่ต้องการคัดแยกเซลล์ต่างๆให้อยู่ในรูป ของเซลล์เดี่ยวอย่างสมบูรณ์และเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ รวมทั้งสามารถที่จะนำเซลล์เหล่านี้มาวิเคราะห์คุณสมบัติทาง ชีวภาพในลักษณะเซลล์เดี่ยวได้ รวมทั้งองค์ความรู้และเทคนิคในการออกแบบจะสามารถถูกถ่ายทอดและ ประยุกต์ใช้ในงานทางวิศวกรรมของไหลระดับจุลภาคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

อัจฉริยา ไศละสูต 2556 บทที่ 6 เซลล์วิทยาวินิจฉัย และ เซลล์วิทยาของเนื้องอก และ บทที่ 7 การประยุกต์ใช้เซลล์วิทยาวินิจฉัยทางคลินิก ใน สมพร เตชะงามสุวรรณ นพดล พิพารัตน์ บรรณาธิการ พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 3 หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ห้างหุ้นส่วนจ ากัด ปอยท์ กราฟิค หน้า 145-156 และหน้า 171-191.

Ailles L.E. and Weissman I.L. 2007. Cancer stem cells in solid tumors. Curr Opin Biotech. 18: 460-466.

Batchelor, E., Kann, M. G., Przytycka, T. M., Raphael, B. J. and Wojtowicz, D. 2013. Modeling cell heterogeneity: from single-cell variations to mixed cells. Biocomputing. 445-450.

Bhagat, A.A.S., Sathyakumar S. Kuntaegowdanahalli, S.S. and Papautsky, I. 2008. Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration. Lab Chip. 8: 1906-1914.

Chao, TC. and Ros, A. 2008. Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. J R Soc Interface. 5: S139-150.

Clevers H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med. 17(3): 313-319.

Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins R. G. and Tone, M. 2007. Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. PNAS. 104(48): 1889218897.

Dick J.E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. Blood. 112(13): 47934807.

Heppner G.H. 1984. Tumor Heterogeneity. Cancer Res. 44: 2259-2265.

Kasukurti A., Potcoava M., Desai S.A., Eggleton C. and Marr D.W.M. 2011. Singlecell isolation using a DVD optical pickup. Opt Exp. 19(11).

Kim J. and Orkin S.H. 2011. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. Genome Med. 3:75.

Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S, Kumarb, G. and Papautsky, I. 2009. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. Lab Chip. 9: 2973-2980.

Lecault, V., White, A. K., Singhal, A. and Hansen, C. L. 2012. Microfluidic single cell analysis: from promise to practice. Curr Opin Chem Biol, 16: 381-390.

Lee, W., Aminia, H. Stonec, H. A. and Di Carlo, D. 2010. Dynamic self-assembly and control of microfluidic particle crystals. 2010. PNAS. 107(52): 22413-22418.

Lobo N.A., Shimono Y., Qian D. and Clarke M.F. 2007. The Biology of Cancer Stem Cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 23:675-99.

Marusyk A., Almendro V. and Polyak K. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer. Nat Rev Can. 12: 323-334.

Marysyk A. and Polyak K. 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. Biochi Biophy Acta. 1805: 105-117.

Michor F. and Polyak K. 2010. The origins and implications of intratumor heterogeneity. Cancer Prev Res. 3: 1361-1364.

Mogilner A, Wollman RA and Marshall WF. 2006. Quantitative modeling review in cell biology: what is it good for?. Dev Cell. 11: 279-287.

Nilsson J., Evander M., Hammarström B., and Laurell T. 2009. Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. Analyt Chimi Acta. 649: 141–157.

O'Brien A.C., Kreso A. and Dick J.E., PhD. 2009. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. Semin Radiat Oncol. 19: 71-77.

Park JY., Morgan M, Sachs AN, Samorezov J, Teller R, Shen Y, Kenneth J, Pienta KJ and Takayama S. 2010. Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation. Microfluid Nanofluid. 8: 263-268.

Rota L.M., Lazzarino D.A., Ziegler A.N., LeRoith D. and Wood L.T. 2012. Determining Mammosphere-Forming Potential: Application of the limiting dilution analysis. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 17: 119-123.

Russom, A., Gupta, A. K., Gupta, A.K., Nagrath, S. Di Carlo, D. Edd, J.F. and Toner, Mehmet. 2009. Different inertial focusing of particles in curved low-aspect-ration microchannels. New J Phys. 11: 1-9.

Sackmann E. K., Fulton A. L. and Beebe D. J. 2014. The present and future role of microfluidics in biomedical research. Nature. 507: 181-189.

Sailasuta, A., Ketpun, D., Piyaviriyakul, P., Theerawatanasirikul, S., Theewasutrakul, P. and Rungsipipat, A. 2014 "The Relevance of CD117-Immunocytochemistry Staining Patterns to Mutational Exon-11 in c-kit Detected by PCR from Fine-Needle Aspirated Canine Mast Cell Tumor

Cells," Veterinary Medicine International, vol. 2014, Article ID 787498, 8 pages, doi:10.1155/2014/787498.

Tang D.G. 2012. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res. 22: 457-472.

Tirino V., Desiderio V., Paino F., De Rosa A., Papaccio F., La Noce M., Laino L., De Francesco F. and Papaccio G. 2013. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. FASEB. 27: 1-3.

Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J.V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J.J, Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G.J., Wöhrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H.E., Andreeff M. and Eaves C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. Nat Rev Can. 12: 767-775.

Wu, M. and Singh, A. K. 2011. Single-cell protein analysis. Curr Opin Biotechnol. 23: 1-6.

Yin, H. and Marshall, D. 2012. Microfluidics for single cell analysis. Curr Opin Biotechnol. 23: 110-119.

ภาคผนวก

ผลงานวิชาการเผยแพร่ในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ และตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

บทความวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ จำนวน 16 เรื่อง

1. D. Ketpun, T. Suwannaphan, S. Bhanpattanakul, A. Sailasuta, P. Piyaviriyakul, A. Pimpin, W. Srituravanich, W. Sripumkhai, and W. Jeamsaksiri. The effect of extensional fluid stress (EFS) on mechanical morphology of single canine cutaneous mast cell tumor (MCT) cells after passively inertial sorting through an Archimedean Spiral Microchannel. Proceeding of the 8th LOC-Microfluidics & Microarrays World Conference 2016. 26-28 September 2016. San Diego Marriot Mission Valley, San Diego, USA (International).
2. Ampol Kamnerdsook, Werayut Srituravanich, Alongkorn Pimpin, Prapruddee Piyaviriyakul, Achariya Sailasuta, Wutthinan Jeamsaksiri and Witsaroot Sripumkhai, 2017, “Design of contraction-expansion microchannels for particle-sorting with five-micrometer resolution,” The 2017 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON-2017), Hokkaido, Japan (International).
3. Prapuddee Piyawiriyakul, Achariya Sailasuta Alongkorn Pimpin, Wutthinun Jeamsaksiri, Wisaroot Sriphumkhai, Sariya Auswakarn, 2017 Application of Microfluidic Chip in Veterinary Science, The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2017) : Research in Practice, Bangkok, Thailand. P. S69-S70 (International)
4. Achariya Sailasuta, Prapuddee Piyawiriyakul, Theerayut Kaewamatawong, Pathrakrit Theewasutrakul, Dettachai Ketpun, Sudchaya Bhanpattanakul, Alongkorn Pimpin, Werayut Srituravanich, Tewan Tongmanee, , Attawut. Thanomsridetchai, Thammawit Suwannaphan, Wutthinan Jeamsaksiri, Wisaroot Sripumkhai, Jeerawut Juntawong, Jakrapong Supadech, Win Bunjongpru, Mayuree Chanasakulniyom, , 2017, “Innovation of Microfluidics-base devices in single cell analysis of Canine Round Cell Tumors,” The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2017) : Research in Practice, Bangkok, Thailand. P. S61-S62. (International)
5. Alongkorn Pimpin, Werayut Srituravanich, Wutthinun Jeamsaksiri and Achariya Sailasuta, 2017, “Microfluidic devices in biomedical research – The present and future,” The 16th Chulalongkorn

University Veterinary Conference (CUVC 2017) : Research in Practice, Bangkok, Thailand. P. S63-S64. (International)

6. W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, P. Patamung, J. Supadech, C. Hruanun, and A. Poyai. 2017, "Microfluidics chip fabrication process and its application," The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2017) : Research in Practice, Bangkok, Thailand. P. S65-S68. (International)
7. S. Bhanpattanakul, A. Sailasuta, P. Piyaviriyakul, T. Kaewamatawong, T. Theewasutrakul, D. Ketpun, A. Pinpim, W. Sriturawanich, T. Tongmanee, A. Thanomsridetchai, T. Suwannaphan, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, J. Juntawong, J. Supadech, W. Bunjongpru, M. Chanasakulniyom, 2017. "Potential of In-House Polydimethylsiloxane Microfluidic Device on Single – Cell Trapping and Culturing of Leukemia Cell Line" The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2017) : Research in Practice, Bangkok, Thailand. P. 319-321 (International) (Best Research Award)
8. อำพล กำเหนิดสุข, อลงกรณ์ พิมพ์พิณ, วีระยุทธ ศรีธุระวานิช, ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล, อัจฉริยา ไศละสูต, วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศิริ, วิศรุต ศรีพุ่มไข่ และ ภัทรลักษณ์ ปัถมัง ,2017, "การคัดแยกอนุภาคตามขนาดด้วยท่อหน้าตัดแบบย่อและขยาย," การประชุมวิชาการเครือข่ายวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3 , จังหวัดนครนายก ประเทศไทย
9. T. Wongpakham, W. Sripumkhai, W. Jeamsaksiri T. Tharasanit, W. Srituravanich and A. Pimpin 2018, A preparation of 2D and 3D gelatin scaffolds for cell culture in a microfluidic platform, APCOT 2018 (The 9th Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology, HKUST, Hongkong , 24th -27th June, 2018. (International)
10. S. Bhanpattanakul, A. Sailasuta, P. Piyaviriyakul, T. Kaewamatawong, P. Theewasutrakul, D. Ketpun, A. Pinpim, W. Srituravanich, T. Tongmanee, T. Suwannaphan, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, P. Pattamang, M. Chanasakulniyom 2018. In-house Polydimethylsiloxane Microfluidic Device on Single-cell trapping and culturing of Leukemia cell line: cellular study and analysis, APCOT 2018 (The 9th Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology, HKUST, Hongkong, 24th -27th June, 2018. (International)

11. Thammawit Suwannaphan, Alongkorn Pimpin, Achariya Sailasuta, Prapruddee Piyaviriyakul, Sudchaya Bhanpattanakul, Dettachai Ketpun and Wutthinan Jeamsaksiri 2018, Effects of Extensional and Shear Stresses on Cells– The Case Study of White Blood Cells in A Setup of Spiral Microchannels, APCOT 2018 (The 9th Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology, HKUST, Hongkong, 24th -27th June, 2018. (International)
12. S. Bhanpattanakul, T. Wongpakham C. Tawatcharaporn, T. Siha-umphai, M. Sinsiriphan, A. Chalermchuang, P. Piyaviriyakul, M. Chanasakulniyom, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, A. Pimpin, A. Sailasuta and T. Kaewamatawong 2019, Comparison of single cell culturing efficacy in different loading methods on polydime thylsiloxane Microfluidic Device System.The **19**th ISWAVLD**2019 (**The **19**th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), Chiang Mai, Thailand,**19**th **-22**nd June, 2019. (International)
13. T. Wongpakham, T. Tharasanit, W. Srituravanich, W. Jeamsaksiri, A. Sailasuta, and A. Pimpin 2019, Microwell Arrays for the Spheroid Aggregation and Formation of Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. The 19th ISWAVLD 2019 (The 19th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), Chiang Mai, Thailand,19th -22nd June, 2019. (International)
14. T. Siha-umpha, C. Tawatcharaporn, M. Sinsiriphan A. Chalermchuang, S. Bhanpattanakul, T. Wongpakham, P. Piyaviriyakul, M. Chanasakulniyom, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, A. Pinpim, A. Sailasuta and T. Kaewamatawong 2019, Comparison of cell trapping efficacy in different loading methods on Polydimethylsiloxane Microfluidic Device system. The 19th ISWAVLD2019 (The 19th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), Chiang Mai, Thailand,19th -22nd June, 2019. (International)
15. P. Yingprathanphon, T. Wongpakham, W. Situravanich, A. Sailasuta and A. Pimpin 2019. New Approach to Trap Cells in A Microwell Array – Filling and Dragging Technique. The **19**th ISWAVLD**2019 (**The **19**th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), Chiang Mai, Thailand,19**th** -22**nd** June, 2019. (International)

16. T. Suwannaphan, A. Pimpin, A. Sailasuta, P. Piyaviriyakul, S. Bhanpattanakul, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai and A. Kamnerdsook 2019. Investigation of White Blood Cells in A Contraction–Expansion Microchannel Array —Trypan Blue, SEM and Wright's Stain. The 19th ISWAVLD 2019 **(**The **19**th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), Chiang Mai, Thailand, **19**th **-22**nd June, 2019. (International)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการต่างประเทศ จำนวน 2 เรื่อง

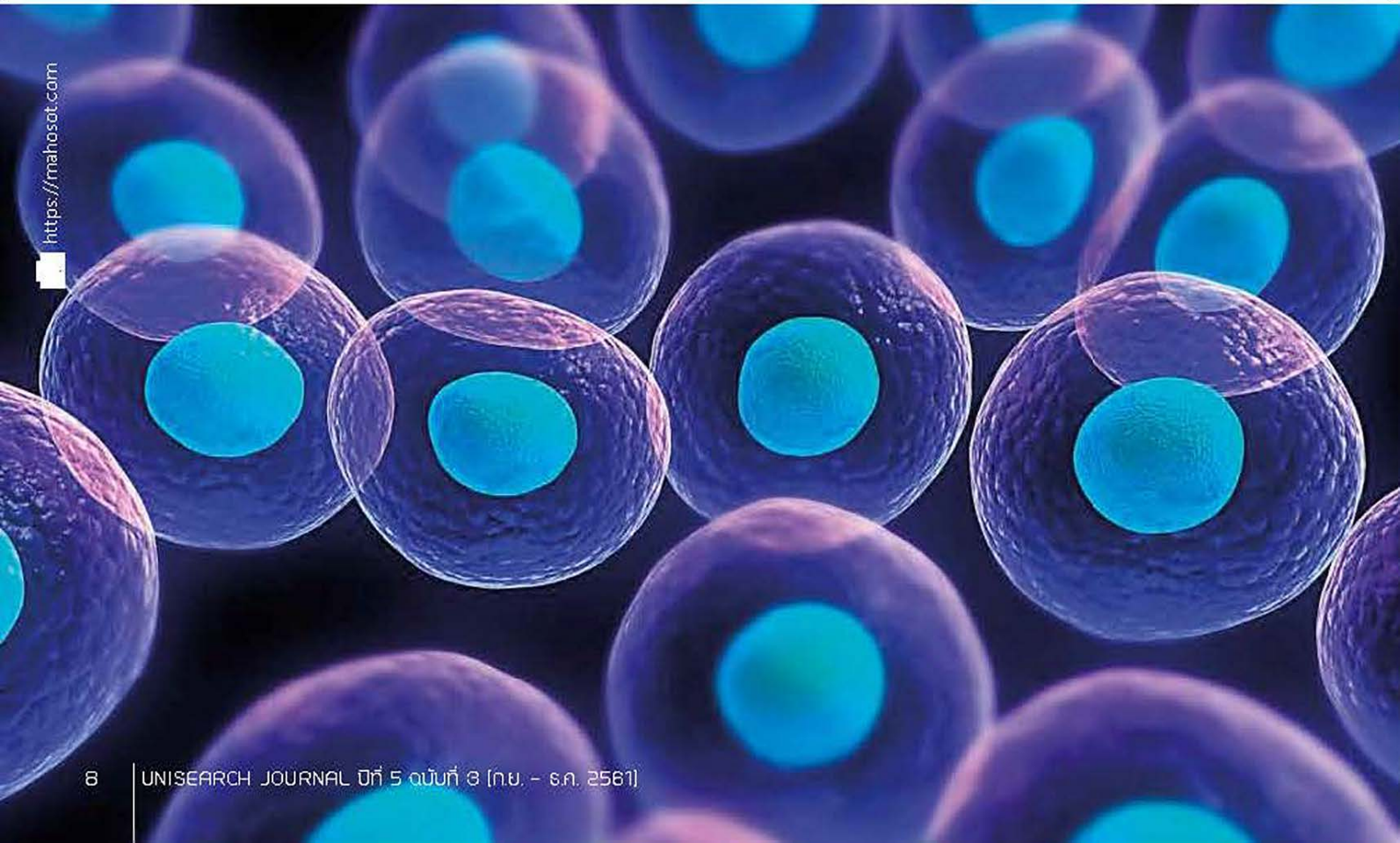
1. Attawut Thanormsridetchai, Dettachai Ketpun, Werayut Srituravanich, Prapruddee Piyaviriyakul, Achariya Sailasuta, Wutthinan Jeamsaksiri, Witsaroot Sripumkhai, Alongkorn Pimpin. 2017. Focusing and sorting of multiple-sized beads and cells using low-aspect- ratio spiral microchannels. Journal of Mechanical Science and Technology. Vol. 31(11). pp 5397-5405. DOI: https://doi.org/10.1007/s12206-017-1034-z. {IF: 1.128 (2016), 1.182 (5- Year); SCImago SJR: 0.59 (2016)}
2. Dettachai Ketpun, Achariya Sailasuta, Thammawit Suwannaphan, Sudchaya Bhanpattanakul, Alongkorn Pimpin, Werayut Srituravanich, Witsaroot Sripumkhai, Wutthinan Jeamsaksiri, and Prapruddee Piyaviriyakul. 2017. The Viability of Single Cancer Cells after Exposure to Hydrodynamic Shear Stresses in a Spiral Microchannel: A Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Model. Micromacines, Special Issue 2017 "Microfluidics for Circulating Biomarkers". Vol. 9(9). pp. 1-19. DOI: 10.3390/mi9010009. { IF: 1.833 (2016), 1.918 (5-Year); SCImago SJR: 0.382 (2016)}

นวัตกรรมการพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคสำหรับคัดแยก จัดเก็บ และเพาะเลี้ยง เซลล์มะเร็งในรูปเซลล์เดี่ยว เพื่อศึกษาพฤติกรรมทางชีวภาพเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัข

https://cdn.petbarn.com.au

ศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไศละสูต[1],
รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์[1],
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล[2]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลงกรณ์ พิมพ์พิณ[3], ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระยุทธ ศรีธุระวานิช[3],
ดร. วุฒินันท์ เจียมศักดิ์คีรี[4], นายวิศรุต ศรีพุ่มไข่[4], ดร. วิน บรรจงปรุ[4], นายจักรพงษ์ ศุภเดช[4],
นายจิรวัฒน์ จันต๊ะวงค์[4], นายชาญเดช หรูอนันต์[4],
อาจารย์ ดร. มยุรี ชนะสกุลนิยม[5]

[1]หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[4]ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
[5]ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล



https://mahosot.com

บทนำ

โครงการนี้เป็นนวัตกรรมการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน โดยประยุกต์เทคโนโลยีการสร้างระบบขนาดจุลภาคและความรู้ทางวิศวกรรมเครื่องกลในส่วนของการออกแบบระบบของไหลจุลภาค เพื่อสร้างองค์ความรู้เชิงบูรณาการทางชีววิทยาระดับเซลล์เดี่ยว การศึกษาได้ใช้เซลล์มะเร็งชนิดกลเสนัยเป็นต้นแบบ องค์ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์มะเร็งทั้งในมนุษย์และสัตว์ในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการเจริญและงอกขยายที่ผิดปกติของเซลล์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่มีความสำคัญในลำดับต้น ๆ ทั้งในมนุษย์และในสัตว์เลี้ยง และมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่อง อีกทั้งยังไม่มีวิธีการใดที่ใช้ในการรักษาโรคดังกล่าวให้หายขาดได้ในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาด้านพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งมีความสำคัญอย่างมาก

อย่างไรก็ตาม ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญที่สุดในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งในปัจจุบันและยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญต่อเนื่องต่อไปในอนาคต คือเรื่องของความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ (cellular heterogeneity) ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง รวมทั้งความแตกต่างทางด้านพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) ของเซลล์เหล่านี้ซึ่งสามารถเกิดขึ้นทั้งภายในก้อนเนื้องอกและมะเร็งเดียวกัน (intratumour heterogeneity) หรือเกิดความแตกต่างอย่างหลากหลายระหว่างเนื้องอกและมะเร็งที่ต่างชนิดกัน (intertumour heterogeneity)

ตัวอย่างของความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจน เช่น ลักษณะของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งที่มาจากก้อนเดียวกันแต่ต่างบริเวณกัน หรือที่มาจากเนื้องอกชนิดเดียวกันแต่มาจากผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่ต่างกันนั้น จะพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphologic appearance) และการเปลี่ยนแปลงในทางชีววิทยา เช่น การกลายพันธุ์ หรือการทำงานทางชีวเคมี (biochemical function) มักจะมีความแตกต่างกัน (Heppner, 1984; Marusyk and Polyak, 2010; Michor and Polyak, 2010; Marusyk et al., 2012) ซึ่งปัญหาเหล่านี้มีอิทธิพลและเป็นอุปสรรคอย่างมากต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง รวมถึงการกำหนดแผนในการรักษาโรคอีกด้วย

ความหลากหลายของสมบัติที่ผิดปกติเหล่านี้อาจจะนำมาซึ่งการแปลผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผิดพลาด ถึงแม้จะนำมาใช้ศึกษาเนื้องอกและมะเร็งที่เป็นชนิดเดียวกันแต่มีกลไกความผิดปกติที่เกิดแตกต่างกันภายในเซลล์ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดที่สุดในปัจจุบันได้แก่ การให้สารเคมีบำบัดโดยอาศัยการแปรผลทางชีวภาพของเซลล์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่อยู่ในก้อนเป็นปัจจัยในการตัดสินใจโดยไม่คำนึงถึงเซลล์ที่เป็นส่วนน้อยแต่มีความสำคัญในการที่เซลล์นั้นอาจจะเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ในก้อนมะเร็งเหล่านั้น ด้วยข้อจำกัดนี้อาจทำให้สารเคมีบำบัดที่ใช้สามารถทำลายได้เฉพาะเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่แสดงผลในการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งที่เป็นจุดกำเนิดได้ ทำให้การรักษาไม่ได้ผลและมักพบการงอกของก้อนมะเร็งใหม่ที่จุดเดิม (recurrence) ได้บ่อยอีกด้วย

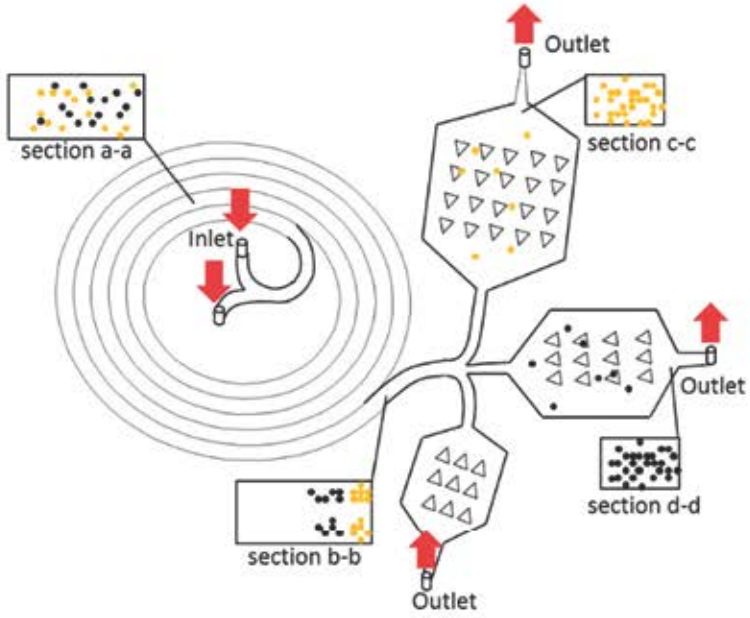
การพัฒนาระบบการศึกษาเซลล์ที่สามารถนำไปใช้ศึกษาเซลล์เนื้องอกและมะเร็งเป้าหมายในระดับเซลล์เดี่ยวได้จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะสามารถแก้ไขปัญหาที่กล่าวมาได้ การศึกษาเริ่มจากการพัฒนาวิธีที่ใช้ในการทำให้เซลล์ที่เก็บมาได้ในตัวอย่างกระจายตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เพื่อลดอิทธิพลจากการสื่อสารระหว่างกัน (cell-to-cell communication) ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ที่กำลังศึกษา นอกจากนั้นวิธีการที่ใช้ต้องไม่ผ่านกระบวนการเตรียมเซลล์ที่นานหรือมากเกินความจำเป็นอย่างที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์หรือบางครั้งอาจรุนแรงถึงขั้นทำให้เซลล์ที่ต้องการศึกษาตาย ส่งผลให้ผลการศึกษาและวิเคราะห์มีความผิดพลาดเกิดขึ้น นอกจากนี้การที่จะศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยวได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องพัฒนาระบบที่ใช้ในการศึกษาเซลล์ที่มีความสามารถที่จะจัดแบ่งเซลล์ออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามขนาดได้ และต้องพัฒนาระบบที่สามารถดักจับเซลล์แบบเดี่ยวไว้ในบริเวณจำกัดที่ใช้ศึกษาได้ ซึ่งโดยปกติเทคนิคในระดับมหภาคที่ใช้อยู่ในปัจจุบันไม่สามารถตอบโจทย์เหล่านี้ได้ทั้งหมด จึงไม่ให้ผลการศึกษาที่แม่นยำได้

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า การเกิดความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ในก้อนเนื้องอกและมะเร็งนั้น เป็นอุปสรรคต่อการที่จะศึกษาให้เข้าใจถึงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกและมะเร็งที่แฝงอยู่ โดยเฉพาะเรื่องของการระบุตัวของเซลล์เหล่านี้ รวมทั้งเทคนิคและวิธีการระดับมหภาคที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติและวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส เป็นต้น ซึ่งยังไม่สามารถตอบสนองต่องานวิจัยเพื่อให้ได้รับผลลัพธ์ที่ถูกต้อง ดังนั้นเพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจอันถูกต้องและเป็นการลดปัจจัยที่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่จะศึกษา จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเซลล์เนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยว และเทคนิคของไหลในระดับจุลภาคน่าจะเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในปัจจุบัน สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวต่อไป (Nilsson et al., 2009)

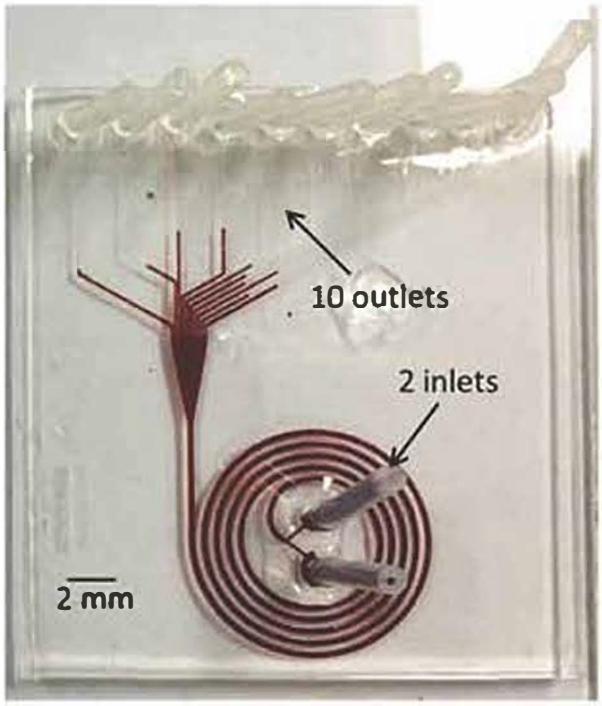
โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนานวัตกรรมอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคสำหรับคัดแยกเซลล์โดยการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ที่ใช้หลักการทางระบบของไหลจุลภาค ที่มีความสามารถคัดแยกและกระจายเซลล์ที่จะศึกษาให้อยู่ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ และสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่มีความสามารถในการจัดเก็บเซลล์ที่ถูกแยกเหล่านี้ให้อยู่ในช่องจัดเก็บในลักษณะหนึ่งเซลล์ต่อหนึ่งช่อง ตามช่วงขนาดของเซลล์ โดยมีเงื่อนไขว่าเซลล์ที่จัดเก็บได้ต้องมีสภาพความมีชีวิตอยู่ (cell viability) และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ในภายหลังได้ ส่วนประกอบของระบบเบื้องต้นประกอบด้วย ส่วนคัดแยกเซลล์ตามขนาดและส่วนดักจับเซลล์เพื่อใช้ในการเลี้ยงและตรวจสอบสมบัติของเซลล์ ในส่วนการคัดแยกเซลล์จะเป็นท่อขดเกลียวที่ต่อกับส่วนดักจับเซลล์ในหลุมจุลภาครูปสามเหลี่ยม ระบบที่พัฒนาขึ้นจะมีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 1 โดยผลสำเร็จที่เกิดขึ้นจะนำมาซึ่งประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในส่วนของการศึกษาพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์ต่าง ๆ ต่อไป

อุปกรณ์คัดแยกเซลล์มะเร็งตามขนาดด้วยระบบของไหลจุลภาค

การพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่ประยุกต์ความรู้เชิงฟิสิกส์ของการไหล โดยการสร้างและทดสอบระบบของไหลจุลภาค เพื่อควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของเม็ดโพลีเมอร์ชนิดโพลีสไตรีน (polystyrene polymer) และทำให้เม็ดโพลีเมอร์มีการเคลื่อนที่เป็นสายกระแสการไหลตามขนาดและแยกออกจากกันตามขนาดได้อย่างถูกต้อง ประกอบไปด้วยท่อสำหรับของไหลที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของท่ออยู่ที่ 130 ไมโครเมตร มีความกว้างเท่ากับ 500 ไมโครเมตร ท่อทั้งหมดจะขดเป็นรูปเกลียว



ภาพที่ 1 ระบบของไหลจุลภาคที่ใช้คัดแยกเซลล์ตามขนาดและดักจับเซลล์ในหลุมจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยม เพื่อใช้เลี้ยงและตรวจสอบสมบัติของเซลล์
ที่มา : อลงกรณ์ พิมพ์พิณ ออกแบบเมื่อ 8 มิถุนายน 2561



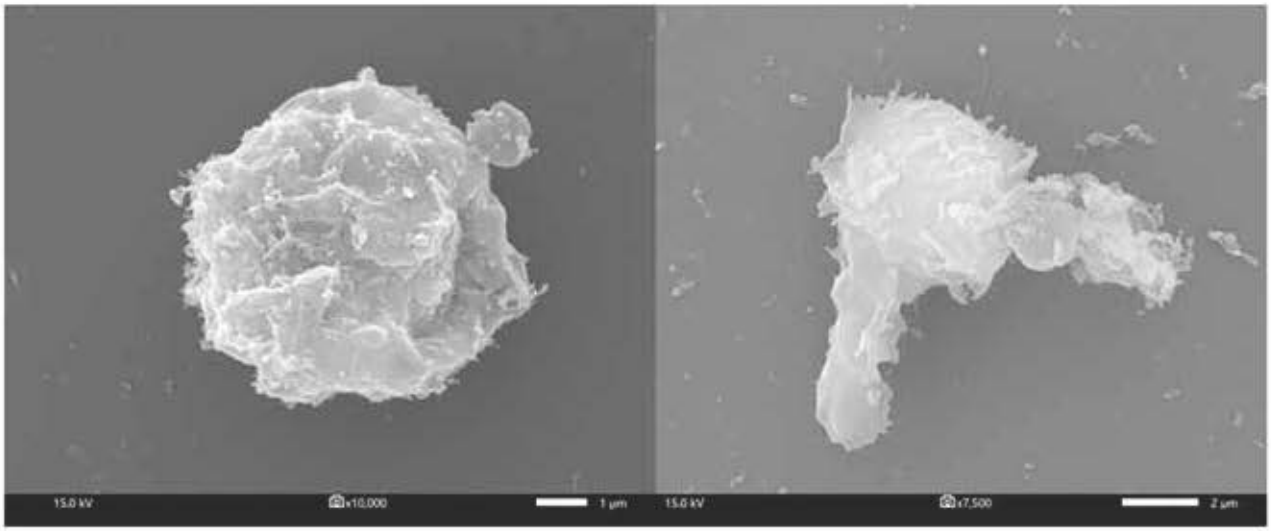
ภาพที่ 2 ท่อขดเกลียวสำหรับการคัดแยกขนาดเซลล์มะเร็งเป็นระบบของไหลจุลภาคครูปร่างขดเกลียว
ที่มา : อลงกรณ์ พิมพ์พิณ ถ่ายภาพเมื่อ 5 พฤษภาคม 2561

จำนวน 5 วง และมีระยะห่างระหว่างวงรอบ (interspace) ที่อยู่ติดกันอยู่ที่ 500 ไมโครเมตร มีรัศมีรวมของความโค้งของท่อทั้งหมดอยู่ที่ 10 มิลลิเมตร และมีอัตราส่วนของขนาดของอนุภาคที่ใช้ศึกษาแต่ละขนาดต่อความสูงของท่อมากกว่าหรือเท่ากับ 0.07 โดยอุปกรณ์มีท่อทางเข้าจำนวน 2 ท่อ ซึ่งท่อแรกจะต่อสารแขวนลอยของอนุภาค และอีกท่อหนึ่งจะต่อกับสารละลายบัฟเฟอร์ โดยสารแขวนลอยและบัฟเฟอร์จะถูกฉีดเข้าสู่อุปกรณ์โดยปั๊มอัตโนมัติ ที่ปลายของท่อรอบสุดท้ายจะมีลักษณะขยายออกโดยมีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่ 2 มิลลิเมตร และต่อเข้ากับช่องออกย่อยจำนวน 10 ช่อง (ภาพที่ 2)

การศึกษานี้จะใช้อัตราการไหลอยู่ในช่วง 0.5-2 มิลลิลิตรต่อนาที เม็ดโพลีเมอร์ที่ใช้มีขนาด 5, 10, 15 และ 20 ไมโครเมตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมามีความสามารถทำให้เกิดการแยกเม็ดโพลีเมอร์ที่มีขนาดแตกต่างและปนอยู่ด้วยกันออกจากกันได้ (Thanormsridetchai et al., 2017) ส่วนการศึกษาในเซลล์มะเร็งชนิดกลมในสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ ใช้ขนาดของมาสต์เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันและมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 ไมโครเมตร ผลการทดลองพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะถูกคัดแยกได้และมีแนวโน้มของการคัดแยกขนาดใกล้เคียงกับการทดลองด้วยอนุภาคโพลีเมอร์ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองยังพบว่ามีการเกาะของเซลล์ตามผนังท่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาของเยื่อหุ้มเซลล์กับวัสดุท่อทำให้มีการเกาะติดรวมทั้งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีชีวิต และยังพบเศษเซลล์ (debris) ในสารแขวนลอยที่ทางออกอีกด้วย ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลของการนับเซลล์มะเร็งที่ออกมาจากท่อที่พบว่า จำนวนของเซลล์ลดลงประมาณครึ่งหนึ่งและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากผ่านอุปกรณ์แยกเซลล์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 30 เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากแรงเค้นของการไหลภายในท่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสมดุลจึงทำให้ผนังเซลล์เสียหายหรือเซลล์ตายได้ (ภาพที่ 3) แสดงลักษณะของผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ปกติซึ่งนำมาใช้ทดสอบเปรียบเทียบ และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เสียหายหลังจากผ่านระบบท่อจุลภาค ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการทำงานและผลกระทบของเซลล์จึงเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (Ketpun et al., 2018)

อุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

การศึกษาส่วนนี้ได้ออกแบบและทดสอบระบบเพื่อใช้ดักจับเม็ดโพลีสไตรีนและเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ลงหลุมเพาะเลี้ยง โดยอาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ของการไหลเองในการพาเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงจุลภาคในการศึกษา



ภาพที่ 3 เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและที่เสียรูปจากแรงเค้นของการไหล
ที่มา : ธรรมวิทย์ สุวรรณพันธุ์ ถ่ายภาพเมื่อ 4 มิถุนายน 2561

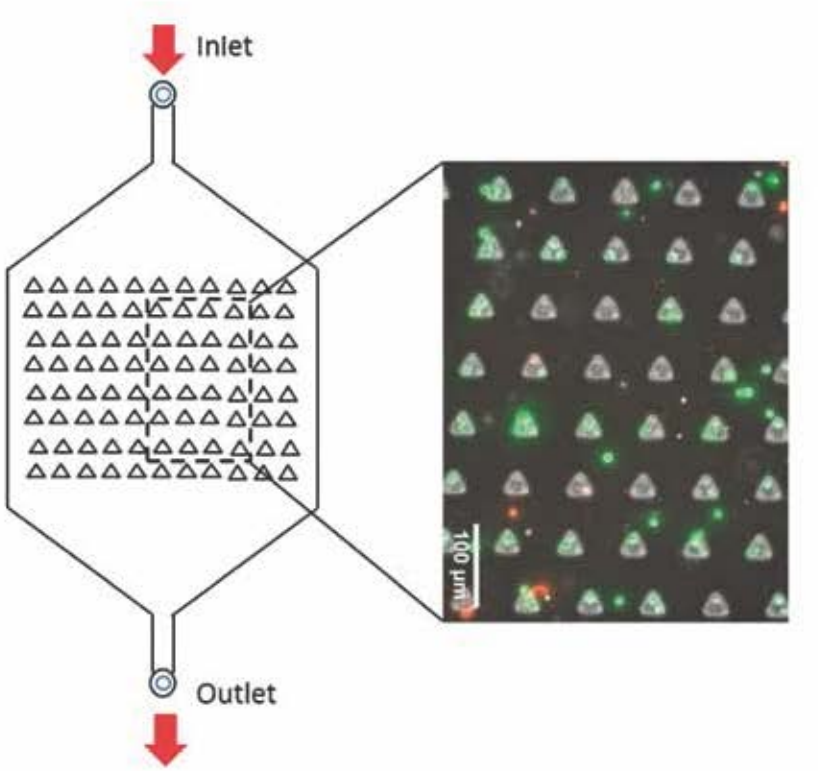
ได้ใช้เม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 ไมโครเมตร และเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ที่มีขนาดในช่วง 10-20 ไมโครเมตร (ภาพที่ 3) โดยมีหลุมจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยมเพื่อดักจับเซลล์ หลักการทำงานของอุปกรณ์จะอาศัยแรงของการไหลเองเป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยง อนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากการไหลแบบหมุนวน (recirculation flow) ของของไหลตัวกลางที่เกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยงเอง โดยหลุมรูปทรงแบบสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่แรงที่สุดและดักจับดีที่สุด (Park et al., 2010)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก ได้แก่ ช่องการไหลหลักสำหรับให้ของไหลตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยมีความสูง 70 ไมโครเมตร และมีความกว้าง 500 ไมโครเมตร โดยปลายแต่ละด้านของอุปกรณ์จะต่อกับช่องทางเข้าและช่องทางออก หลุมจุลภาคที่ใช้เป็นรูปทรงสามเหลี่ยมด้านเท่ามีขนาด 40 ไมโครเมตร และมีความลึก 30 ไมโครเมตร

ในขั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 ไมโครเมตร โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง เพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมีความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้ แล้วจึงนำไปทดสอบกับเซลล์ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน ผลการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 30 ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมดอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี (กำหนดไว้ที่ร้อยละ 45) และพบว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ อย่างไรก็ตามในอนาคตยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ที่สูงขึ้นต่อไป

ผลที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้คือ องค์ความรู้เชิงกลศาสตร์การไหลเพื่อออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมการไหลและอนุภาคระดับจุลภาค และนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดเรียงตัวและแยกเซลล์ออกจากกันตามขนาด รวมทั้งดักจับเซลล์ในหลุมเพาะเลี้ยงโดยที่เซลล์ยังสามารถที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงให้มีการเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่นานขึ้น และสามารถนำเซลล์เหล่านั้นมาศึกษาสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวได้ องค์ความรู้เหล่านี้ยังสามารถนำไปถ่ายทอดเทคโนโลยี และใช้อ้างอิงในคณะวิจัยอื่น ๆ ที่ต้องการคัดแยกเซลล์ให้อยู่ในรูปของเซลล์เดี่ยวอย่างสมบูรณ์ และศึกษาสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ได้

ผลงานวิจัยนี้เป็นนวัตกรรมสร้างอุปกรณ์ Lab on the Chip (LOC) ใช้คัดแยกและดักจับเซลล์ด้วยระบบของไหลจุลภาคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ดักจับเซลล์โดยใช้เซลล์มะเร็งรูปร่างกลมในสุนัขเป็นรูปแบบการศึกษาเปรียบเทียบเป็นครั้งแรกโดยการบูรณาการองค์ความรู้ข้ามศาสตร์ทั้งทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี พัฒนาอุปกรณ์ที่เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์เซลล์เดี่ยว สร้างองค์ความรู้พื้นฐานด้านชีววิทยาเซลล์ที่สามารถพัฒนาต่อยอด



ภาพที่ 4 ระบบหลุมสามเหลี่ยมขนาดจุลภาคเพื่อดักจับเซลล์มะเร็ง และภาพถ่ายเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายในหลุมจุลภาค
ที่มา : สุชญา พันธ์พัฒนกุล และ เทพฤทธิ์ วงค์ภาคำ ออกแบบเมื่อ 22 เมษายน 2561

วิเคราะห์เซลล์เป้าหมายชนิดต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาและเฝ้าระวังโรคมะเร็งที่ทันสมัย สอดคล้องกับวาระแห่งชาติของประเทศไทย Thailand 4.0

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของผลการศึกษาวิจัยโครงการ ***"การพัฒนาเครื่องมือขนาดเล็กในการแยกเซลล์มะเร็งให้เป็นเซลล์เดี่ยวและรักษาโรคมะเร็ง"*** ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาจากโครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก ประจำปี 2557 กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากรัฐบาลประเภทผลผลิตเพื่อสร้างองค์ความรู้ โครงการวิจัยพื้นฐานประจำปีงบประมาณ 2558 และ 2560-2561 โครงการแผนพัฒนาวิชาการจุฬาฯ สร้างเสริมพลังจุฬาฯ ก้าวสู่ศตวรรษที่ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (อุปกรณ์การแพทย์ชาญฉลาด) รวมทั้งการสนับสนุนการศึกษาทดลองจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคมะเร็งในสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิงและบรรณานุกรม

Heppner, G. H. 1984. Tumor Heterogeneity. Cancer Research 44 (6): 2259-2265.

Ketpun, D., Sailasuta, A., Suwannaphan, T., Bhanpattanakul, S., Pimpin, A., Srituravanich, W., Sripumkhai, W., Jeamsaksiri, W., and Piyaviriyakul, P. 2018. The Viability of Single Cancer Cells after Exposure to Hydrodynamic Shear Stresses in a Spiral Microchannel: A Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Model. Micromachines 9 (1): 9; doi:10.3390/mi9010009.

Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? Nature Reviews Cancer 12 (5): 323-334.

Marusyk, A., and Polyak, K. 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. Biochimica et Biophysica Acta 1805 (1): 105-117.

Michor, F., and Polyak, K. 2010. The origins and implications of intratumor heterogeneity. Cancer Prevention Research (Philadelphia) 3 (11): 1361-1364.

Nilsson, J., Evander, M., Hammarström, B., and Laurell, T. 2009. Review of cell and Particle trapping in microfluidic systems. Analytica Chimica Acta 649: 141–157.

Park J. Y., Morgan, M., Sachs, A. N., Samorezov, J., Teller, R., Shen, Y., Pienta, K. J., and Takayama, S. 2010. Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation. Microfluidics and Nanofluidics 8 (2): 263-268.

Thanormsridetchai, A., Ketpun, D., Srituravanich, W., Piyaviriyakul, P., Sailasuta, A., Jeamsaksiri, W., Sripumkhai, W., and Pimpin. A. 2017. Focusing and sorting of multiple-sized beads and cells using low-aspect- ratio spiral microchannels. Journal of Mechanical Science Technology 31 (11): 5397-5405.