

การศึกษาความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้าของเซลล์เดี่ยว

Study of Electrical Crossover Frequency of Single Cells

นิศรุต พันธุ์ศิริ¹ นิติพงศ์ ปานกลาง² กิตติภพ วิจิตรบุญลพประดิษฐ์³ และ บุญชัย เตชะอำนาจ³

¹ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี nisarut.p@ubu.ac.th*

²ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

³ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้า (f_{R0}) ของเซลล์เดี่ยว สำหรับบ่งชี้คุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ที่อาจนำไปใช้ในการจำแนกหรือประเมินสภาวะของเซลล์ได้ การทดลองใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระบบของไหลจุลภาค โดยปรับสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลางภายนอกเซลล์ คณะผู้วิจัยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระแสความต้านทาน เพื่อหา f_{R0} พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโฟรีติก (f_{DEPO}) ผลการทดลองพบว่า f_{R0} มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มค่าสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลางภายนอกเซลล์ โดยสัมพันธ์กับ f_{DEPO} อย่างไรก็ดี ตัวกลางที่สภาวะสภาพนำไฟฟ้าสูง f_{R0} จะมีค่ามากกว่า f_{DEPO} อย่างชัดเจน วิธีการนี้มีข้อได้เปรียบ เมื่อเปรียบเทียบกับ f_{DEPO} โดยสามารถตรวจวัดเซลล์จำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมชีวเวชในอนาคต

คำสำคัญ: ความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้า ความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโฟรีติก ไมโครฟลูอิดิกส์ เซลล์เดี่ยว

Abstract

This study aims to investigate the electrical crossover frequency (f_{R0}) of single cells as an indicator of their electrical properties, which may be applied to classify cell or assess cell conditions. Mammalian cells were tested in a microfluidic system with varied extracellular medium conductivities. We analyzed changes in resistive current to determine f_{R0} and compared it with the dielectrophoretic crossover frequency (f_{DEPO}). The results show that f_{R0} increases with higher extracellular conductivity and correlates with f_{DEPO} . However, at high medium conductivity, f_{R0} is clearly higher than f_{DEPO} . Compared with the dielectrophoretic approach, this method offers the advantage that it can analyze a large number of cells in short time and shows strong potential for future applications in biomedical engineering.

Keywords: Electrical Crossover Frequency, Dielectrophoretic Crossover Frequency, Microfluidics, Single-cell

1. บทนำ

การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์เดี่ยวมีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาทางชีววิทยาและการแพทย์ เช่น การจำแนกชนิดเซลล์ [1] การประเมินสภาวะของเซลล์ [2] และการตรวจหาโรค [3] หนึ่งในพารามิเตอร์ทางกลศาสตร์ไฟฟ้าที่สำคัญคือ ความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโฟรีติก (Dielectrophoretic Crossover Frequency) ซึ่งเป็นความถี่ที่ทิศทางการของแรง Dielectrophoretic (แรง DEP) กระทำต่อเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง [4] การวัดค่าความถี่นี้สามารถนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึมได้

วิธีการวัดความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโฟรีติก อาศัยการสังเกตพฤติกรรมเคลื่อนที่ของเซลล์ภายใต้สนามไฟฟ้าที่เปลี่ยนความถี่ อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์เซลล์จำนวนมาก ซึ่งต้องใช้เวลานาน หรือละเลยข้อมูลจากเซลล์ที่ไม่ตอบสนองต่อแรง DEP ชัดเจน ซึ่งสะท้อนถึงความหลากหลายภายในประชากรเซลล์ได้

บทความนี้นำเสนอการประมาณค่าความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้าในเซลล์เดี่ยว โดยตรวจจับการเปลี่ยนแปลงกระแสความต้านทาน (Resistive current, I_R) การวัด I_R ทำด้วยเครื่องขยายแบบล็อกอิน (Lock-in Amplifier, LIA) ทั้งในกรณีที่ไม่มีเซลล์และมีเซลล์ผ่านแคปประหว่งอิเล็กโตรดในระบบของไหลจุลภาค การวัดกระแสไฟฟ้าได้รับการออกแบบมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์เซลล์จำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว คณะผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะสเปกโทรสโคปีของ I_R กับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยใช้สภาพนำไฟฟ้าของตัวกลางค่าต่างๆ นอกเซลล์. ผลลัพธ์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโฟรีติก จุดมุ่งหมายหลักคือการแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวิธีตรวจสอบกระแส I_R สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของเซลล์สิ่งมีชีวิตในระดับเซลล์เดี่ยว และเป็นแนวทางสำหรับการประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิศวกรรมชีวเวชต่อไป

2. ทฤษฎี

2.1 อิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปี

อิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคสำคัญในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยใช้สัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ต่างๆ

*ผู้ประพันธ์บรรณกิจ

เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดเซลล์และประเมินสภาวะของเซลล์ ซึ่งนำมาใช้ในระบบของไหลจุลภาค [5, 6] เมื่อพิจารณาเซลล์เคลื่อนที่ผ่านช่องทางการวัด ซึ่งเป็นแกประหว่างอิเล็กโทรดคู่ขนานในระบบของไหลจุลภาค จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของอิมพีแดนซ์ไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรด [7] วงจรสมมูลไฟฟ้าโดยประมาณของเซลล์และตัวกลางของเหลวระหว่างอิเล็กโทรดสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 1 อิมพีแดนซ์ระหว่างอิเล็กโทรดประกอบด้วย ความจุไฟฟ้า C_m ของเยื่อหุ้มเซลล์, ความต้านทาน R_c และความจุไฟฟ้า C_c ภายในเซลล์, ความต้านทาน R_{sol} และความจุไฟฟ้า C_{sol} ของสารละลายนอกเซลล์, ความจุไฟฟ้า C_{dl} ระหว่างอิเล็กโทรดและของเหลว

ในระบบไฟฟ้ากระแสสลับ เมื่อป้อนสัญญาณแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับเข้าไปยังวงจรหรือระบบที่ประกอบด้วยความต้านทานหรือความเก็บประจุ เช่น สารแขวนลอยเซลล์ กระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่าน (I_T) จะเป็นปริมาณเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยสองส่วนหลัก คือ กระแสความต้านทาน (I_R) ที่มีเฟสเดียวกับแรงดันไฟฟ้าที่ป้อน และกระแสความเก็บประจุ (I_C) ที่ทำมุม 90° นำหน้าแรงดันไฟฟ้าที่ป้อนเข้าไป กระแสไฟฟ้ารวมเชิงซ้อน I_T แสดงได้เป็น

$$I_T = I_R + jI_C \quad (1)$$

เมื่อ j คือหน่วยจินตภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับกระแส I_T ระหว่างสภาวะที่ไม่มีเซลล์และมีเซลล์ในแกประหว่างอิเล็กโทรด การเปลี่ยนแปลงขนาดกระแสความต้านทาน ΔI_R นิยามจาก I_{R1} เมื่อมีเซลล์ผ่าน และขนาดกระแสพื้นหลัง I_{R0} (ไม่มีเซลล์)

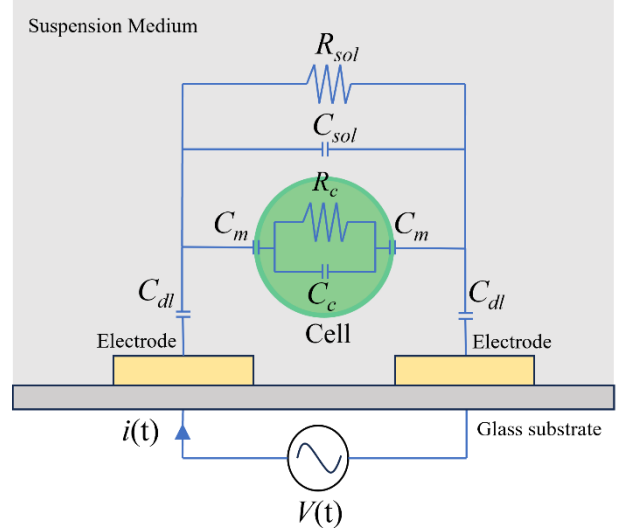
$$\Delta I_R = I_{R1} - I_{R0} \quad (2)$$

พิจารณาวงจรสมมูลโดยประมาณในรูปที่ 1 I_{R1} ในกรณีความถี่ต่ำ รีแอกแตนซ์ของ C_m สูง ทำให้แขนง (branch) ผ่านเซลล์มีอิมพีแดนซ์สูง. กระแสจึงไหลอ้อมผ่านแขนงตัวกลางภายนอกเซลล์เป็นหลัก ส่งผลให้ I_{R1} ที่เกิดจากเซลล์ลดลงจากกระแสพื้นหลัง I_{R0} . ในกรณีความถี่สูง รีแอกแตนซ์ของ C_m ลดลง กระแสไหลผ่านภายในเซลล์มากขึ้น พร้อมกับอิมพีแดนซ์ของ C_{dl} และ C_{sol} ที่ลดลง ส่งผลให้ I_{R1} เพิ่มขึ้นจากกระแสพื้นหลัง พฤติกรรมของกระแส I_{R1} ดังกล่าว ทำให้เกิดความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้าได้ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อ 2.3

2.2 แรงแรง DEP

แรงแรง DEP (F_{DEP}) เป็นแรงทางไฟฟ้าที่กระทำกับอนุภาคเป็นกลางทางไฟฟ้า แรงแรง DEP ขึ้นกับคุณสมบัติไดโพลทริกของอนุภาคและตัวกลางภายนอก พิจารณาอนุภาครัศมี r ภายใต้สนามไฟฟ้าภายนอก E . F_{DEP} มีค่าเท่ากับ [4]

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_{sol} \text{Re}[CM] \nabla E^2 \quad (3)$$



รูปที่ 1 อิมพีแดนซ์ของเซลล์และตัวกลางของเหลวระหว่างอิเล็กโทรดขณะมีเซลล์เคลื่อนที่ผ่าน

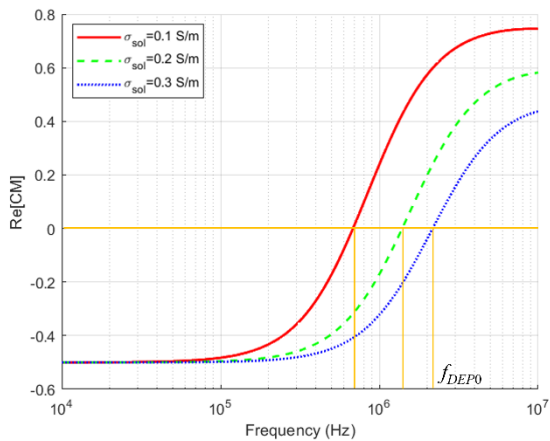
เมื่อ ϵ_{sol} คือค่าสภาพยอมของตัวกลางภายนอก และ CM คือ Clausius-Mossotti factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ [4]

$$CM = \frac{\epsilon_c^* - \epsilon_{sol}^*}{\epsilon_c^* + 2\epsilon_{sol}^*} \quad (4)$$

เมื่อ ϵ_{sol}^* และ ϵ_c^* คือค่าสภาพยอมเชิงซ้อนของตัวกลางภายนอกและอนุภาค ตามลำดับ $\epsilon^* = \epsilon - j \frac{\sigma}{2\pi f}$ โดย σ คือสภาพนำไฟฟ้า และ f คือความถี่ของแรงดันไฟฟ้า ทิศทางของแรงแรง DEP ถูกกำหนดโดยส่วนจริงของ CM $\text{Re}[CM] > 0$ บ่งบอกถึง DEP แบบบวก (pDEP) และ $\text{Re}[CM] < 0$ บ่งบอกถึง DEP แบบลบ (nDEP) [4] อนุภาคที่ถูกกระทำด้วยแรงแรง pDEP และ nDEP จะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีความเครียดสนามไฟฟ้าสูงขึ้นและต่ำลง ตามลำดับ

2.3 ความถี่ครอสโอเวอร์

รูปที่ 2 แสดงค่า $\text{Re}[CM]$ ของ Clausius-Mossotti factor เป็นฟังก์ชันความถี่ไฟฟ้า สำหรับเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ ขนาดเซลล์มีค่าเท่ากับ $12.55 \mu\text{m}$ สภาพนำไฟฟ้าภายในเซลล์ $\sigma_c = 0.86 \text{ S/m}$ สภาพยอมของไฮโดรลัสซิม $\epsilon_c = 60\epsilon_0$, สภาพยอมของตัวกลางภายนอก $\epsilon_{sol} = 78\epsilon_0$, ค่าความจุไฟฟ้าของเซลล์เมมเบรน $C_m = 0.005 \text{ F/m}$ และ $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$ เซลล์อยู่ในสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลางภายนอกเซลล์ σ_{sol} ที่แตกต่างกันคือ 0.1, 0.2 และ 0.3 S/m เมื่อพิจารณา $\text{Re}[CM] = 0$ ในสมการที่ (4) เป็นจุดที่ทำให้แรงแรง DEP เปลี่ยนทิศ ที่ความถี่ค่าหนึ่ง ซึ่งความถี่นี้ก็คือ f_{DEP0} ทั้งนี้พิจารณา σ_{sol} เมื่อค่า σ_{sol} มีค่าสูงขึ้น f_{DEP0} ก็มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน f_{DEP0} สามารถใช้ในการจำแนกและแยกชนิดเซลล์ หรือประเมินสภาวะของเซลล์ได้ [8, 9]



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\text{Re}[\text{CM}]$ ของเซลล์ที่
กับความถี่ทางไฟฟ้า σ_{sol} แตกต่างกัน

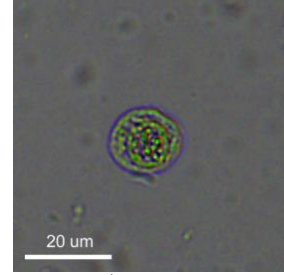
ความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้า (f_{RO}) มีนิยามเป็นความถี่ทางไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดกระแสความต้านทาน $\Delta I_R = 0$ เนื่องจาก CM สัมพันธ์กับไดโพลเหนี่ยวนำของเซลล์ ซึ่งกำหนดการกระจายของกระแสไฟฟ้าในช่องตรวจวัด การเปลี่ยนผ่านศูนย์ของ ΔI_R สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองเชิงไดโพลเทริกของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวกลาง งานวิจัยนี้จึงทดลองหา f_{RO} และนำความสัมพันธ์ของ f_{RO} กับสภาพนำไฟฟ้าภายนอกเซลล์ มาเปรียบเทียบกับ f_{DEP0}

3. การทดลอง

3.1 ตัวอย่างเซลล์

การทดลองใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Sandos inbred mouse (SIM)-derived 6-thioguanine- and ouabain-resistant (STO) ดังแสดงในรูปที่ 3 เซลล์ถูกจัดเตรียมโดยภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชีววิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สารเพาะเลี้ยงประกอบด้วย DMEM high glucose เสริมด้วย NaHCO_3 3.7 g/L, Fetal Bovine Serum 10% v/v L-glutamine 1% v/v และ Antibiotic-Antimycotic 1% v/v เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้เพาะที่มี CO_2 5% ขนาดเฉลี่ยของเซลล์ในสารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 12.55 μm ตัวอย่างถูกเตรียมให้มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์/ml สำหรับการทดลอง

ผู้วิจัยได้เปลี่ยนสารแขวนลอยที่เข้ากับเซลล์ STO เป็นสารแขวนลอยไอโซโทนิก (ความเข้มข้น 300 mM) ประกอบด้วย D-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ในน้ำขจัดไอออน เพื่อทดลองวัดอิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปีและทดลอง DEP สารแขวนลอยถูกปรับสภาพนำไฟฟ้า σ_{sol} ให้เท่ากับ 0.004, 0.02, 0.1, 0.2, และ 0.3 S/m ด้วย Phosphate Buffered Saline ผู้วิจัยได้เปลี่ยนสารแขวนลอยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง ก่อนจะนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองต่อไป



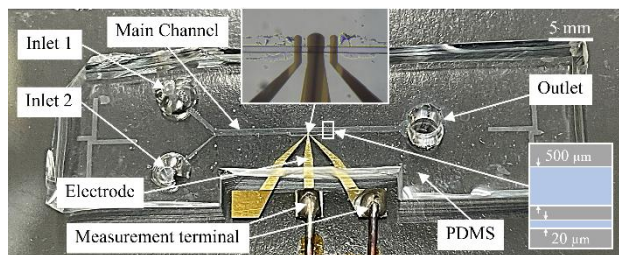
รูปที่ 3 เซลล์ STO

3.2 อุปกรณ์สำหรับวัดอิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปี

คณะผู้วิจัยจัดทำอุปกรณ์ของไหลจุลภาคเพื่อใช้ในการทดลองดังรูปที่ 4 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคประกอบด้วย องค์ประกอบหลัก 2 ส่วน ได้แก่ ช่องทางไหลจุลภาค และอิเล็กโทรดทองแบบระนาบ ขนาดแกน 20 μm สำหรับกระตุ้นและรับรู้กระแสไฟฟ้า (ใช้เพียงอิเล็กโทรดตำแหน่งกลางและขวาในรูปที่ 4) ช่องทางไหลจุลภาค Polydimethylsiloxane (PDMS, KE-106, Shin-Etsu) ลึกลง 30 μm หล่อขึ้นรูปจากแม่แบบที่ทำจากฟิล์มไวแสงแบบลบ (SU-8 10, MicroChem) ด้วยเทคนิคซอฟต์แวร์ลิโทกราฟี (Soft-Lithography) ช่องทางไหลจุลภาคมีช่องทางไหลหลักกว้าง 500 μm และช่องทางไหลการวัดกว้าง 20 μm ช่องทางไหลการวัดแยกจากช่องทางไหลหลักเพื่อนำเซลล์ STO ให้เคลื่อนที่ผ่านบริเวณอิเล็กโทรดคู่ขนาน การจัดเรียงช่องทางลักษณะนี้ช่วยให้เซลล์เคลื่อนที่ผ่านจุดตรวจจับได้อย่างต่อเนื่องด้วยความเร็วที่ไม่สูงเกินไป เพื่อให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงกระแส I_R เมื่อเซลล์เคลื่อนที่ผ่านแกปอิเล็กโทรด

3.3 ระบบทดลองสำหรับวัดอิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปี

ระบบการทดลองแสดงในรูปที่ 5 ระบบประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 4 ส่วน ได้แก่ (1) อุปกรณ์ของไหลจุลภาค ซึ่งมีช่องทางเข้า 2 ช่อง และช่องทางออก 1 ช่อง เพื่อควบคุมการไหลของสารแขวนลอยเซลล์, (2) กล้องจุลทรรศน์ที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ทำหน้าที่สังเกตการณ์การเคลื่อนที่ของเซลล์ภายในช่องทางไหล, (3) ระบบวัดกระแสไฟฟ้า ประกอบด้วยไมโครอิเล็กโทรด เครื่อง LIA (MLFI 5 MHz, Zurich Instrument) สำหรับการวัดค่ากระแสไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรด และ (4) เครื่องควบคุมการไหลของตัวอย่าง (Flow EZ, Fluigent) ด้วยการปรับความดันในช่องของทางไหล สารแขวนลอยที่ปราศจากเซลล์และสารแขวนลอยเซลล์ STO ถูกป้อนเข้าสู่ระบบด้วยช่อง Inlet 1 และ 2 ตามลำดับ อิเล็กโทรดถูกกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับ 500 mV_{rms} ความถี่ 20 kHz - 5 MHz จากเครื่อง LIA. กระแสความต้านทาน I_R ที่วัดด้วยเครื่อง LIA ถูกบันทึกเป็นช่วงเวลาครั้งละ 60 วินาที โดยมีค่า Sampling rate = 13.57 kSa/s I_R ถูกประมวลผลเป็น ΔI_R ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างของกระแส I_R จากกระแสพื้นหลัง



รูปที่ 4 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคสำหรับวัดอิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปี

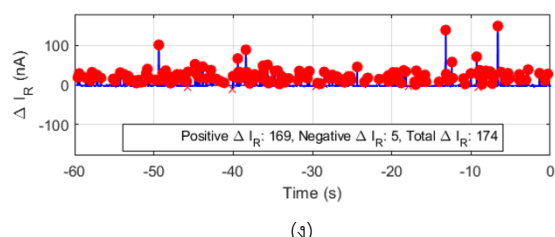
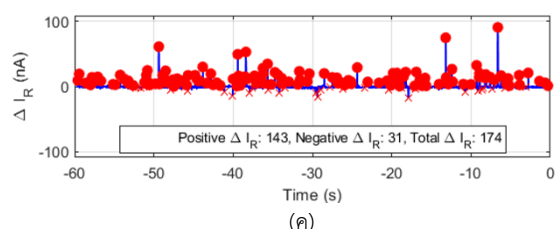
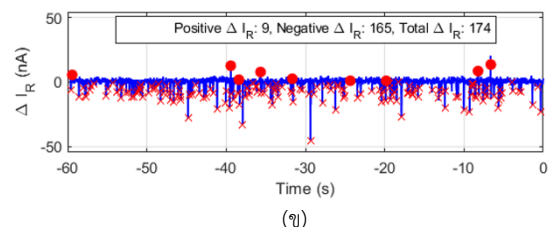
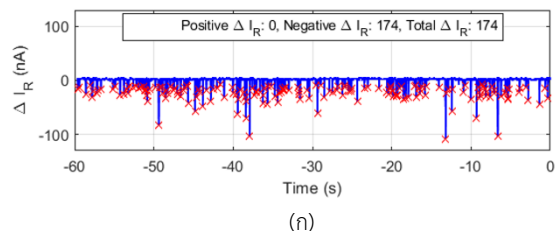
4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลง ΔI_R ตามความถี่ไฟฟ้า

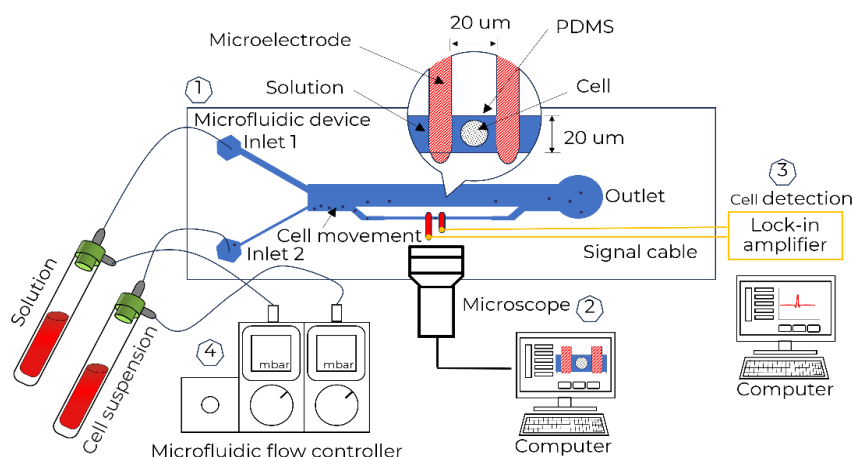
รูปที่ 6 แสดงตัวอย่างพฤติกรรมของกระแส ΔI_R ที่ความถี่ 20, 100, 200 และ 400 kHz ของเซลล์ในตัวกลางที่มี $\sigma_{sol} = 0.004$ S/m แกน y ของกราฟในรูปที่ 6 เป็นขนาดของ ΔI_R เมื่อมีเซลล์เคลื่อนที่ผ่านช่องแคบระหว่างอิเล็กโทรด แกน x เป็นเวลาที่บันทึก. ขนาดกระแส ΔI_R แสดงเป็นเส้นทึบสีน้ำเงิน สัญลักษณ์ “O” และ “X” ระบุเซลล์ที่แสดง $\Delta I_R > 0$ และ $\Delta I_R < 0$ ตามลำดับ จำนวนเซลล์ที่แสดงค่า ΔI_R เป็นบวกและลบในช่วงเวลา 60 วินาทีที่บันทึกข้อมูล ถูกระบุไว้ในแต่ละรูป

ΔI_R ณ ความถี่ 20 kHz ในรูปที่ 6(ก) ถูกใช้เพื่อการตรวจนับเซลล์ คือ พิจารณา $|\Delta I_R| > \pm 1SD$ (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของกระแสพื้นหลัง ที่ 20 kHz เซลล์ปกติจะแสดง ΔI_R ที่เป็นลบ รูปที่ 6(ก) แสดงข้อมูลจากเซลล์จำนวน 174 เซลล์ โดยไม่พบค่ายอดบวกของ ΔI_R

เราเริ่มสังเกตพบพฤติกรรมของ ΔI_R ค่าบวกที่ 100 kHz ในรูปที่ 6(ข). ที่ 200 kHz มี ΔI_R ค่าบวก 143 เซลล์ ในรูปที่ 6(ค) หรือ 82% ของเซลล์ในข้อมูลชุดนี้ รูปที่ 6(ง) ที่ 400 kHz มี ΔI_R ค่าบวกประมาณ 97% จากผลการทดลองดังกล่าว เราสามารถประมาณความถี่คrossover ทางไฟฟ้า f_{R0} ของเซลล์ STO ได้ โดยจะกล่าวรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.2



รูปที่ 6 ΔI_R ที่ความถี่ต่างๆ ของเซลล์ STO
ในตัวกลางที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.004 S/m
(ก) 20 kHz (ข) 100 kHz (ค) 200 Hz (ง) 400 kHz



รูปที่ 5 ระบบวัดกระแส I_R

รูปที่ 7 แสดงค่า ΔI_R ที่ความถี่ 20 kHz ภายในตัวกลางที่มี σ_{sol} แตกต่างกันได้จากการทดลองจำนวน 32,111 เซลล์ ΔI_R มีแนวโน้มลดลง (มีค่าลบมากขึ้น) ตามการเพิ่มขึ้นของสภาพนำไฟฟ้าตัวกลาง และมีความแปรปรวนที่สูงขึ้นอย่างชัดเจน การเปลี่ยนแปลง ΔI_R เกิดจากสัดส่วนของอิมพีแดนซ์เซลล์ต่ออิมพีแดนซ์ตัวกลางที่เปลี่ยน ยิ่งตัวกลางนำไฟฟ้าได้ดี (ความนำสูง) ผลกระทบของเซลล์ที่ขวางกระแสก็ยิ่งเด่นชัดขึ้น

4.2 f_{R0} ของเซลล์ STO แต่ละสภาพนำไฟฟ้านอกเซลล์ต่างๆ

ข้อมูล ΔI_R ที่ได้จากการทดลองสามารถนำมาวิเคราะห์หาค่า f_{R0} ของแต่ละเซลล์ได้ ในกรณีที่ ΔI_R เปลี่ยนเครื่องหมายจากลบเป็นบวก

หาก ΔI_R เปลี่ยนจากค่าลบ ΔI_{R1} เป็นค่าบวก ΔI_{R2} เมื่อความถี่เปลี่ยนจาก f_1 เป็น f_2 f_{R0} ของแต่ละเซลล์ประมาณด้วยฟังก์ชันเชิงเส้นดังสมการ

$$f_{R0} = f_1 + \left(\frac{\Delta I_{R1}}{\Delta I_{R2} - \Delta I_{R1}} \right) \times (f_2 - f_1) \quad (5)$$

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า f_{R0} ของเซลล์ STO ที่สภาพนำไฟฟ้านอกเซลล์ σ_{sol} แตกต่างกันได้ จากตารางที่ 1 เราพบว่าเมื่อ σ_{sol} เพิ่มขึ้นจาก 0.004 S/m ไปเป็น 0.300 S/m ค่าเฉลี่ย f_{R0} (เฉลี่ย f_{R0} จากทุกเซลล์ที่สามารถหาได้) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจาก 149 kHz เป็น 1806 kHz จำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ f_{R0} ได้ มาจากเซลล์ที่แสดง ΔI_R เปลี่ยนเครื่องหมายจากลบเป็นบวก ในช่วงความถี่ที่กำหนด นอกจากนี้ ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าที่ σ_{sol} ต่ำ เช่น 0.004 S/m เซลล์ส่วนใหญ่ประมาณ 95% ของเซลล์ที่ทดลอง สามารถหา f_{R0} ได้ แต่สัดส่วนนี้ลดลงเหลือ 76-77% ที่ σ_{sol} สูง ยิ่งไปกว่านั้น SD ของ f_{R0} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก 55 kHz เป็น 799 kHz ตามการเพิ่มขึ้นของ σ_{sol} โดยรวมแล้ว ผลการทดลองนี้ยืนยันถึงอิทธิพลของสภาพนำไฟฟ้าภายนอกต่อ f_{R0} ของเซลล์ STO และความหลากหลายของเซลล์ในแต่ละสภาพ

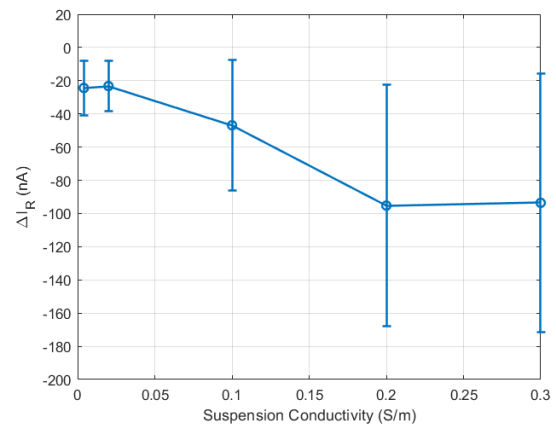
4.3 f_{DEPO} ของเซลล์ STO แต่ละสภาพนำไฟฟ้านอกเซลล์ต่างๆ

f_{DEPO} ได้จากการสังเกตพฤติกรรมของการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่แสดง pDEP และ nDEP ในแต่ละสภาพนำไฟฟ้านอกเซลล์ σ_{sol} การทดลองใช้อิเล็กโทรดทองสองขั้วที่มีแก๊ป 50 μm ระหว่างอิเล็กโทรด อิเล็กโทรดถูกกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับ 5 V_p จากเครื่องกำเนิดสัญญาณ (TGF4242, Aim-TTi) การสังเกตพฤติกรรมของเซลล์ทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse e200, Nikon) และกล้อง CCD (WAT-231s2, Watec) ตัวอย่างเซลล์ STO ในสารแขวนลอยถูกหยดลงบนช่องแก๊ปของอิเล็กโทรด จากนั้นผู้วิจัยใช้ความถี่ไฟฟ้าค่าสูง เพื่อให้เซลล์แสดงพฤติกรรม pDEP ค่า f_{DEPO} ได้จากการลดความถี่ไฟฟ้าลงครั้งละ 10 kHz จนพบพฤติกรรม nDEP ของเซลล์ รูปที่ 8(ก) และ (ข) แสดงเซลล์ที่เคลื่อนที่ไปยัง

บริเวณที่มีสนามไฟฟ้าสูงด้วย pDEP และเซลล์เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสนามไฟฟ้าต่ำด้วย nDEP ตามลำดับ

4.4 การเปรียบเทียบระหว่าง f_{R0} และ f_{DEPO}

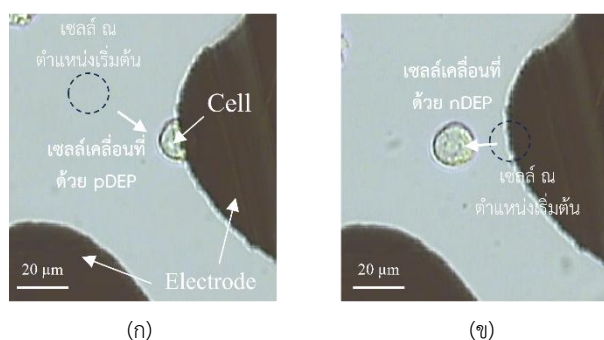
รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้า (f_{R0}) และความถี่ครอสโอเวอร์ไดอิเล็กโตรโพรติก (f_{DEPO}) ที่ σ_{sol} ค่าต่างๆ f_{R0} และ f_{DEPO} เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนแบบไม่เชิงเส้นเมื่อ σ_{sol} เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ที่ค่า σ_{sol} สูง (0.2 S/m และ 0.3 S/m) ค่า f_{R0} มีค่าสูงกว่า f_{DEPO} อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเป็นผลจากสมดุลของอิมพีแดนซ์ระหว่างเซลล์และตัวกลางที่ต่างกัน นอกจากนี้ ยังมีการเพิ่มขึ้นของค่า SD ในทั้งสองชุดข้อมูลที่เพิ่มขึ้นตามสภาพนำไฟฟ้าของตัวกลาง การวิเคราะห์ f_{R0} เหมาะสำหรับการประเมินพฤติกรรมของเซลล์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ที่ต้องการปริมาณงานสูง และไม่ขึ้นกับพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของเซลล์ นอกจากนี้ การวัด f_{R0} เป็นแบบ real-time เพราะตรวจจับสัญญาณไฟฟ้าโดยตรงจากเซลล์จำนวนมากได้รวดเร็ว ต่างจากการวัด f_{DEPO} ที่ต้องอาศัยการปรับความถี่และสังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งใช้เวลานาน มีข้อสังเกต สำหรับงานวิจัยนี้ว่า LIA ที่ใช้สามารถวัดสัญญาณได้ 4 ความถี่ การเลือกช่วงความถี่ให้ครอบคลุมและเหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการประมาณหา f_{R0} หากเลือกความถี่ที่ไม่เหมาะสม การประมาณค่าเชิงเส้นจะคลาดเคลื่อนสูง การกระจายค่าความถี่ที่ครอบคลุมทั้งช่วงความถี่ต่ำและสูงที่ใกล้เคียงกับ f_{R0} ต้องพิจารณาสภาพนำไฟฟ้าของสารแขวนลอยเซลล์ประกอบด้วย



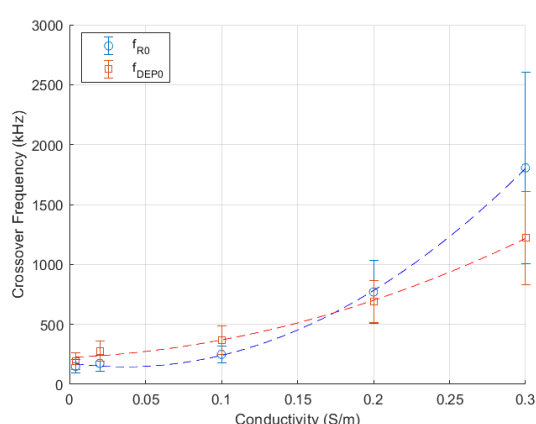
รูปที่ 7 ΔI_R ที่ความถี่ 20 kHz เมื่อแปรสภาพนำไฟฟ้าภายนอกเซลล์

ตารางที่ 1 ความถี่ครอสโอเวอร์ทางไฟฟ้า f_{R0} ของเซลล์ STO ที่สภาพนำไฟฟ้านอกเซลล์ σ_{sol} แตกต่างกันได้

σ_{sol} (S/m)	จำนวนเซลล์		สัดส่วนของเซลล์ที่หา f_{R0} ได้ (%)	f_{R0} (kHz)	
	ทั้งหมด	วิเคราะห์ f_{R0} ได้		ค่าเฉลี่ย	SD
0.004	6,855	6,527	95	149	55
0.020	5,954	5,309	89	175	68
0.100	6,846	6,512	95	249	73
0.200	6,188	4,723	76	770	262
0.300	6,168	4,780	77	1,806	799



รูปที่ 8 การเคลื่อนที่ของเซลล์ STO ด้วยแรง DEP (n) pDEP (ข) nDEP



รูปที่ 9 ลักษณะสมบัติ f_{R0} และ f_{DEP0} เป็นฟังก์ชันของสภาพนำไฟฟ้าภายนอกเซลล์

5. สรุป

งานวิจัยนี้หาค่าความถี่คrossoverโอเวอร์ทางไฟฟ้า (f_{R0}) จากการวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสความต้านทาน (ΔI_R) ด้วย LIA ในระบบของไหลจุลภาค f_{R0} มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามสภาพนำไฟฟ้าภายนอกของสารแขวนลอย f_{R0} จะมีลักษณะสมบัติตามสภาพนำไฟฟ้าภายนอกเซลล์ที่คล้ายกับความถี่คrossoverไดอิเล็กโตรโฟเรติก f_{DEP0} ทั้งนี้ f_{R0} มีค่าสูงกว่า f_{DEP0} มากที่สภาพนำไฟฟ้าสูง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าทดลองหา f_{DEP0} การทดลองหา f_{R0} มีข้อได้เปรียบด้านความเร็วในการวิเคราะห์เซลล์จำนวนมาก วิธีการที่นำเสนอจึงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการศึกษาคูณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เดี่ยวในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.น.สพ. ดร.ธีรวัฒน์ ธาราชา นิต สพ.ญ. ดร.วิภากรานต์ กัลยาณธรรม และ สพ.ญ. ดร.ลธิณธรรณ อุดมธัญยสิทธิ์ (ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ศาสตราจารย์ ดร.อรพรรณชัยลาภกุล และ รศ. ดร.อภิชาติ อิมมัม (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) นางสาวชนันธร ชนนนวรร และ ดร.มติ ห่อประทุม (ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ). งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (เลขที่สัญญา N42A660947) และทุนวิจัยและสร้างนวัตกรรมมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

- [1] M. Alshareef, N. Metrakos, E. J. Perez, F. Azer, F. Yang, X. Yang, and G. Wang, "Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 1, p. 011803, 2013.
- [2] H. S. Moon, K. C. Kim, Y. N. Kim, and S. G. Kim, "A microfluidic platform for simultaneous monitoring of the cell morphology and electrical impedance using an on-chip lens-free microscopy," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1118–1126, 2011.
- [3] P. Gascoyne, J. Satayavivad, and M. Ruchirawat, "Microfluidic approaches to malaria detection," *Acta Tropica*, vol. 89, no. 3, pp. 357–369, 2004.
- [4] T. B. Jones, *Electromechanics of particles*. Cambridge University Press, 2005.
- [5] N. Panklang, K. Vijitnukoonpradit, C. Putapornitip, K. Chotivanich, M. Nakano, M. Horprathum, and B. Techaumnat, "Study on the dielectrophoretic characteristics of malaria-infected red blood cells," *Electrophoresis*, vol. 44, no. 23, pp. 1837–1846, 2023.
- [6] N. Panklang, B. Techaumnat, N. Tanthanuch, K. Chotivanich, M. Horprathum, and M. Nakano, "On-Chip Impedance Spectroscopy of Malaria-Infected Red Blood Cells," *Sensors*, vol. 24, no. 10, p. 3186, 2024.
- [7] S. Gawad, L. Schild, and Ph. Renaud, "Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing," *Lab on a Chip*, vol. 1, no. 1, pp. 76–82, 2001.
- [8] M. Nakano, R. Nakabayashi, R. Koyama, M. Inaba, and J. Suehiro, "Dielectrophoresis Low and High Crossover Frequencies of Cancerous Exosomes," *Electrophoresis*, vol. 46, pp. 1–9, 2025.
- [9] Z. Tian, X. Wang, and J. Chen, "On-chip dielectrophoretic single-cell manipulation," *Microsystems & Nanoengineering*, vol. 10, no. 117, pp. 1–28, 2024.