

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

โดยภาพรวมของงานวิจัยนี้ มีการใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็งในสภาพเลี้ยง เพื่อทดสอบวิธีการตรวจผลกระทบของยา หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการควบคุมเซลล์มะเร็งโดยผ่านวัฏจักรของเซลล์ซึ่งใช้เทคนิคการตรวจวัดขนาดของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งในการประเมินประสิทธิภาพเทียบกับข้อมูลการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์ ดังนั้นการทบทวนเอกสารงานวิจัยที่จะทำให้ครอบคลุมเนื้อหางานวิจัยจึงจำเป็นต้องกล่าวถึงหัวข้อต่างๆ ใน 8 หัวข้อคือ (1) เซลล์เชื้อสายที่ใช้ในการวิจัย (2) ยามาตรฐาน cisplatin (3) วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) (4) การตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ (5) การตายของเซลล์ (6) การตรวจสอบอะพอโทซิสของเซลล์ในสภาพเลี้ยง (7) การตรวจสอบวัฏจักรเซลล์โดยเทคนิค flow cytometry (8) การตรวจสอบการควบคุมวัฏจักรเซลล์ในเซลล์เชื้อสาย HeLa, A549 และ NCI-H1299 เมื่อได้รับยามาตรฐานโดยขอกกล่าวถึงรายละเอียดดังต่อไปนี้ตามลำดับของหัวข้อต่างๆ ดังนี้

2.1 เซลล์เชื้อสายที่ใช้ในการวิจัย

ในการวิจัยนี้ใช้เซลล์มะเร็ง 3 เซื้อสาย ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกของมนุษย์คือ HeLa เซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดของมนุษย์คือ A549 และ NCI-H1299 โดยที่เซลล์ทั้ง 3 เซื้อสายมีประวัติการนำมาใช้ในงานวิจัยที่ยาวนานและมีประสิทธิภาพเป็นแบบจำลองของเซลล์มะเร็งที่มีการนำมาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารักษามะเร็งที่ดี ในที่นี้จึงนำลักษณะบางประการของเซลล์มากล่าวไว้ เพื่อเป็นแนวทางในการทำ ความเข้าใจ เนื้อหาของงานวิจัยนี้ดังนี้

2.1.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ HeLa

พบมากที่สุดของมะเร็งในสตรีไทย พบมากในช่วงอายุ 35-60 ปี มะเร็งปากมดลูกอาจมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสที่มีชื่อว่า human papilloma virus ไวรัสนี้ติดต่อโดยการสัมผัส ส่วนใหญ่เป็นการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่ทำให้มีรอยถลอกของผิวหรือเยื่อเมือก ทำให้เชื้อไวรัสเข้าไปบริเวณปากมดลูกเซลล์ HeLa นี้เป็นเซลล์ที่ George Otto Gey ได้มาจากเนื้อเยื่อปากมดลูกของผู้ป่วยที่ชื่อ Henrietta Lacks ในปี 1951 (Jones and McKusick, 1971) เซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์

เกาะ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเยื่อบุผิว (epithelium) มีการเจริญแบบเกาะชั้นเดียว (monolayer) มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นสองเท่าจากเดิม (population doubling time) ประมาณ 26 ชั่วโมง (เบญจวรรณ, 2554)

2.1.2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดของมนุษย์ A549

ในทางคลินิก A549 จัดเป็นมะเร็งปอดในกลุ่ม non- small cell lung cancer พบร้อยละ 75-80 ของมะเร็งปอดทั้งหมด (Raymond, 2005) การเป็นมะเร็งในกลุ่มนี้สัมพันธ์กับการสูบบุหรี่ และอาจเกิดจากการเป็นแผลในปอด เช่น แผลวันโรคหรือปอดบวมเซลล์ A549 เติบโตครั้งแรกจากเยื่อถุงลมปอด (human alveolar basal epithelial cells) ของผู้ป่วยเพศชายเชื้อสายคอเคเซียน (caucasian) อายุ 58 ปี ในสภาวะเลี้ยงเป็นเซลล์เกาะชั้นเดียว มีลักษณะเป็นเซลล์บางมีขอบหลายเหลี่ยม (squamous) มีการตอบสนองต่อการแพร่ของสารต่างๆ ระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ ได้แก่ น้ำและ electrolyte ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นสองเท่าจากเดิม ประมาณ 22 ชั่วโมง (Altogen, 2007)

2.1.3 เซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดของมนุษย์ NCI-H1299

เป็นมะเร็งปอดในกลุ่มที่เป็นเซลล์ขนาดเล็ก (small cell lung cancer) พบร้อยละ 15-20 จากมะเร็งปอดทั้งหมด พบว่ามะเร็งปอดในกลุ่มนี้มีการเจริญเร็ว มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ในร่างกายได้บ่อยกว่ามะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่ขนาดเล็กนอกจากนี้ยังตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดี (วลัยลักษณ์, 2554) เซลล์เชื้อสาย NCI-H1299 เป็นเซลล์เกาะ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเยื่อบุผิว มีการเจริญแบบเกาะชั้นเดียว ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นสองเท่าจากเดิม ประมาณ 24 ชั่วโมง (Chen *et al.*, 1993)

2.2 ยามาตรฐาน cisplatin

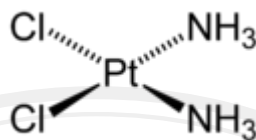
ยามาตรฐานที่ใช้รักษาโรคมะเร็งนั้น มีหลายชนิด เช่น cisplatin, etoposide, doxorubicin และ tamoxifen แต่ในการทดลองนี้เลือกใช้ cisplatin เนื่องจากใช้ต้านมะเร็งในหลายอวัยวะ และให้ผลดีในทางคลินิก นอกจากนี้ยังมีการนำ cisplatin ไปใช้ในหลายงานวิจัย ทำให้มีผลการวิจัยสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบมากพอสมควร cisplatin เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักที่มี platinum อยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วย 2Cl และ 2NH₃-atom ใช้รักษาโรคมะเร็งที่เกิดขึ้นในหลายอวัยวะของร่างกาย เช่น มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก มะเร็งอวัยวะ เป็นต้น กลไกการออกฤทธิ์ของยา cisplatin คือเมื่อ cisplatin เข้าสู่

เซลล์ CI จะถูกแทนที่ด้วยน้ำ ทำให้โมเลกุลของยาเกิดประจวบว ซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ได้ โดยไปจับกับ guanine ทำให้มีการยับยั้ง DNA replication และ transcription และทำให้มีการแตกหักและเข้ารหัสผิดของ DNA นอกจากนี้การที่ cisplatin จับกับ DNA ทำให้มีการโค้งงอของสายเกลียวคู่ของ DNA ทำให้มีผลยับยั้งกระบวนการซ่อมแซม DNA ในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิส นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและ RNA โดยการออกฤทธิ์ของยานี้ไม่มีความจำเพาะกับ ระยะต่างๆของเซลล์ (Briggs *et al.*, 1990) แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาจำนวนหนึ่งที่รายงานว่า cisplatin สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ L1210/0 ที่ขึ้น G2 หรือชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ (Sorenson *et al.*, (1990) Ormerod *et al.*, (1954)) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเซลล์ Hep3B ที่ขึ้น G1 และ S และทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เช่นเดียวกัน (Qin and Ng *et al.*, 2002)

ยา cisplatin นี้ เป็นยาที่มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง เช่น หลังจากได้รับยาเป็นเวลา 1-4 ชั่วโมงอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนอย่างรุนแรง และมีผลลดการทำงานของไขกระดูก เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ นอกจากนี้หากได้รับยาซ้ำๆ กันหลายครั้งทำให้เกิดอาการซีด เนื่องจาก haemoglobin จะลดลง เมื่อได้รับยาในระยะยาว จะเป็นพิษต่อระบบประสาท ทำให้เกิดอาการชัก ประสาทตาอักเสบ ทำให้มองเห็นภาพ ไม่ชัด การรับรู้ของสัมผัสเพี้ยน หรือตาบอดได้ และพบว่า การใช้ cisplatin มีพิษต่อไต ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งความรุนแรงของอาการข้างเคียงขึ้นอยู่กับขนาด วิธีการให้ยา และระยะเวลาหลังให้ยา (Alberts and Noel, 1995)

จากการทดสอบความเป็นพิษ พบว่า cisplatin เป็น carcinogen ต่อสัตว์ (Kaye, 1992) และมีคุณสมบัติเป็น teratogenicity คือทำให้ทารกในครรภ์เกิดความผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถชักนำให้แบคทีเรียเกิดการ mutation และทำให้โครโมโซมของเซลล์สัตว์ในสภาพเลี้ยงเกิดความผิดปกติได้อีกด้วย (Briggs *et al.*, 1990)

อย่างไรก็ตามมีการใช้ยาเคมีชนิดนี้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีในการต้านมะเร็ง มีการให้ยานี้ร่วมกับยาเคมีต้านมะเร็งชนิดอื่น เช่น etoposide แต่เนื่องจากการให้ยามีผลข้างเคียงที่รุนแรงดังที่ได้กล่าวมา จึงต้องมีการพิจารณาอย่างรอบคอบ และอยู่ภายใต้การควบคุมของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญอย่างเข้มงวด



ภาพ 2.1 โครงสร้างของ cisplatin (ที่มา: <http://www.cisplatin.org/images/cisplatin.png>, วันที่สืบค้น 25 กรกฎาคม 2554)

2.3 วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

การวิจัยนี้มีการตรวจสอบวัฏจักรเซลล์โดยการย้อมสี และจัดจำแนกเซลล์ให้อยู่ในระยะต่างๆ ซึ่งต้องใช้การวัดขนาดนิวเคลียส และการดูลักษณะของนิวเคลียส ดังนั้นจึงต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะและขนาดนิวเคลียสในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ เพื่อให้สามารถจำแนกระยะต่างๆ ได้ถูกต้องทรงยศ (2551) ได้กล่าวถึงวัฏจักรของเซลล์ที่น่าสนใจไว้ว่า การแบ่งเซลล์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์จะมีการเตรียมตัวให้พร้อมก่อนการแบ่งจนถึงการแบ่งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม กระบวนการนี้เรียกรวมว่า วัฏจักรเซลล์ ซึ่งพบเฉพาะการแบ่งแบบ ไมโทซิสเท่านั้น เนื่องจากการแบ่งแบบนี้เซลล์สามารถเจริญและเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง วัฏจักรของเซลล์ (ภาพ 2.2) แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

1. Interphase เป็นระยะที่ไม่มีการแบ่งตัวแบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย คือ

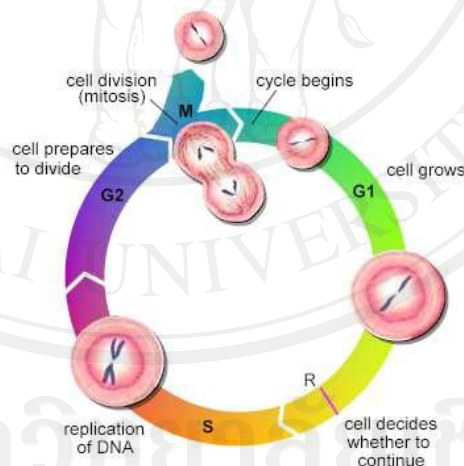
G1 phase (Gap1) เป็นจุดที่สำคัญที่สุดของวัฏจักรเซลล์ เนื่องจากว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการเตรียมพร้อมเพื่อการแบ่งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ต้องการที่จะแบ่งตัวนั้นจะต้องมีความพร้อมที่จะแบ่งตัว ไม่มีความผิดปกติของยีนในเซลล์ ระยะนี้เป็นระยะพัก เซลล์ไม่มี activity ใดๆ ถ้าหากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากถูกกระตุ้น หรือเหนี่ยวนำ เซลล์จะเข้าสู่ระยะ G1 และแตกต่างตามชนิดของเซลล์

S phase (Synthesis) เมื่อเซลล์มี signal ที่จะแบ่งตัว จะเริ่มมีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มจำนวนขึ้น และมีการเตรียม cell materials ต่างๆ ไว้ ระยะนี้จำนวน DNA content จะเป็น 2 เท่าของปกติ สามารถศึกษาได้จากการย้อม DNA หาปริมาณ DNA content ได้ เช่น การย้อมด้วย Feulgen stain, cytophotometric quantitative assay, autoradiography (ใช้ labeled thymidine)

G2 phase (Gap2) เป็นระยะภายหลังจาก DNA synthesis มีการองค์ประกอบของโมเลกุลหลักที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัว แล้วพร้อมที่จะมีการแบ่งตัวต่อไป

ระยะ interphase นี้เป็นระยะที่มีความสำคัญต่อเซลล์มากและเป็นระยะที่นานที่สุด สำหรับวัฏจักรเซลล์โครมาตินจะปรากฏเป็นเส้นบางติดสีจาง (heterochromatin) และถ้าเซลล์ได้รับสารพิษหรือยาบางชนิดในระยะนี้เช่น ยาประเภท Actinomycin D, Bifunctional 1,3-bis-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (BCNU), Bleomycin, Hydroxyurea เป็นต้น ย่อมมีผลต่อการยับยั้งการแบ่งไมโทซิสได้หรือแม้แต่มิผลรุนแรงต่อการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ

2. **M phase** เป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ ที่เซลล์มีการแบ่งตัว (mitosis / meiosis) ระยะนี้โครโมโซมจะหดตัวและอยู่หนาแน่นมาก (condense) และไม่มี RNA synthesis (เนื่องจากโครมาตินหดตัวแน่นมากทำให้ RNA polymerase เข้าทำงานไม่ได้) ระยะต่างๆ ใน M phase ได้แก่ โพรเฟส (prophase) เมทาเฟส (metaphase) แอนาเฟส (anaphase) และเทโลเฟส (telophase)



ภาพ 2.2 ระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ (ที่มา: http://scicurious.files.wordpress.com/2010/07/cell_cycle.jpg, วันที่สืบค้น 25 กรกฎาคม 2554)

การเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ในระยะต่างๆ มีจุดตรวจสอบที่เรียกว่า restriction point เป็นการควบคุมการเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ เพื่อตรวจสอบเซลล์ให้พร้อมก่อนการแบ่งตัวของเซลล์ และในขั้นตอน G1, G2 และ M phase ของวัฏจักรเซลล์นั้นจะมีการตรวจสอบเช่นกัน เรียกว่า cell cycle checkpoints โดยมีโปรตีนที่ควบคุมอยู่เช่น p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor protein ทำหน้าที่ในการ

ยับยั้งเซลล์ที่ผิดปกติเข้าสู่ S phase แล้วทำให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมเซลล์ตาย (apoptosis) และพบว่า ถ้า p53 เกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถที่จะควบคุม cell cycle checkpoints ได้ ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติเกิดการเจริญเติบโตอย่างไม่มีการควบคุมเกิดเป็นเซลล์มะเร็งขึ้นได้ หรือ Rb (Retinoblastoma protein) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุม cell cycle, cell differentiation และ cell apoptosis กรณีใดก็ตามที่ Rb เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) หรือมีการสังเคราะห์ไม่เพียงพอ จะทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดทำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน

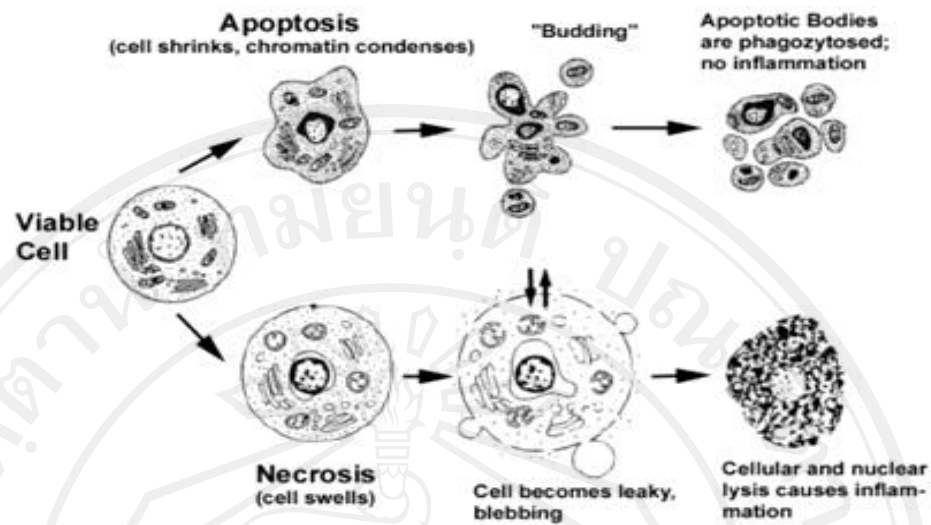
2.4 การตรวจสอบวัฏจักรเซลล์

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีการตรวจสอบวัฏจักรเซลล์โดยใช้หลายวิธีซึ่งแตกต่างกันออกไป Dean *et al.* (2008) ทำการตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ chinese hamster ovary (CHO) โดยใช้ monoclonal antibody กับ bromodeoxyuridine (BrdU) พบว่าสามารถแยกเซลล์ออกเป็นระยะ G1, S และ G2 ได้ และ Rabinovitch *et al.* (1986) สามารถจำแนกวัฏจักรเซลล์ mouse splenocytes ได้โดยใช้ fluorescent antibodies กับ IgM –Ly 1 ทำให้ทราบว่าสัดส่วนของเซลล์ในระยะ S และ G2 มีความแตกต่างกันนอกจากนี้ Hubbell *et al.* (1980) ทำการ ศึกษาวัฏจักรเซลล์ ใน HeLa cell โดยใช้การย้อมสี silver nitrate ซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อการสังเคราะห์ rRNA ทำให้สามารถแยกเซลล์ออกเป็นระยะต่างๆ ในวัฏจักรเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์หรือตรวจสอบวัฏจักรเซลล์มักนิยมใช้เทคนิค flow cytometry ตรวจสอบเซลล์ที่ผ่านการย้อมสีเช่น Rabinovitch *et al.* (1988) ใช้การย้อมสี BrdU-quenched 33258 Hoechst fluorescence นอกจากนี้ Kalejta *et al.* (1997) ทำการย้อมสีเซลล์ primary human foreskin fibroblasts ด้วย propidium iodide (PI) และ Pozarowski and Darzynkiewicz (2004) ย้อมเซลล์ด้วย 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) แล้วจึงนำไปตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometry

2.5 การตายของเซลล์

ในการตรวจสอบวัฏจักรเซลล์มักพบการตายของเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการที่จำเป็นต่อร่างกาย ในคนที่โตเต็มวัยมีการตายของเซลล์ 10^9 เซลล์ต่อวัน (ปกป้องกันและคณะ, 2550) การตายของเซลล์เกิดจากกระบวนการที่แตกต่างกัน 2 กระบวนการ คือ การตายแบบอะพอโทซิส (apoptosis) และการตายแบบ เนโครซิส (necrosis) การตายทั้งสองแบบสามารถแบ่งแยกความแตกต่างได้โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียส (ภาพ 2.3)

2. **เนโครซิส (necrosis)** เป็นการตายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ หลังจากได้รับการบาดเจ็บ, ติดเชื้อ, เป็นมะเร็งและการขาดเลือด การอักเสบอย่างต่อเนื่อง และการทำลายระบบภายในเซลล์อย่างรุนแรง ทำให้ไมโทคอนเดรียบวมพอง (mitochondria swelling) ตามด้วยการฉีกขาด หรือสูญเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ออกมาสู่ช่องว่างภายนอก (extracellular space) สารที่ปล่อยมานั้นจะมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ (proteolytic enzyme) เมื่อมีการหลั่งเอนไซม์ส่งผลให้เซลล์ข้างเคียงได้รับความเสียหาย จึงเกิดการอักเสบอย่างรุนแรงของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (Leist and Jaattela, 2001)



ภาพ 2.3 การตายของเซลล์ (ที่มา: http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/revfigs/rev_2.jpg, วันที่สืบค้น 5 กันยายน 2554)

2.6 การตรวจสอบอะพอโทซิสของเซลล์ในสภาพเลี้ยง

ในการตรวจสอบการตายแบบอะพอโทซิสนั้น สามารถทำได้หลายวิธี เช่นตรวจได้จากการแตกหักของสาย DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis (Studzinski, 1999) และสามารถตรวจปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเซลล์อะพอโทซิสในเซลล์เดี่ยวได้ โดยอาศัยการย้อมสี DNA ภายในเซลล์ ด้วยวิธี enzymatic labeling assay เช่น TUNEL enzymatic labeling assay หรือย้อมดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง แต่ในการทดลองนี้ใช้วิธีที่แตกต่างออกไป คือ การตรวจสอบโดยย้อมเซลล์ด้วยสี aceto-orcein ที่สกัดจากไลเคน *Rocella tinctoria* และ *Lecanora parella* ได้สีแดง ซึ่งจะย้อมติดสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียส ทำให้สามารถตรวจสอบระยะต่างๆของเซลล์ได้ โดยดูจากการจัดเรียงตัวของ DNA จึงใช้ในการย้อมสีเซลล์เพื่อดูการแบ่งเซลล์และสามารถดูการเกิดอะพอโทซิสได้ โดยหลังจากทำการย้อมสีแล้ว เมื่อสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ที่เกิดการอะพอโทซิส มีการหดตัวของเซลล์และแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ เรียกว่า apoptotic bodies นอกจากนี้จะเห็นโครมาตินหดตัวเป็นแถบหนา (Studzinski, 1999)

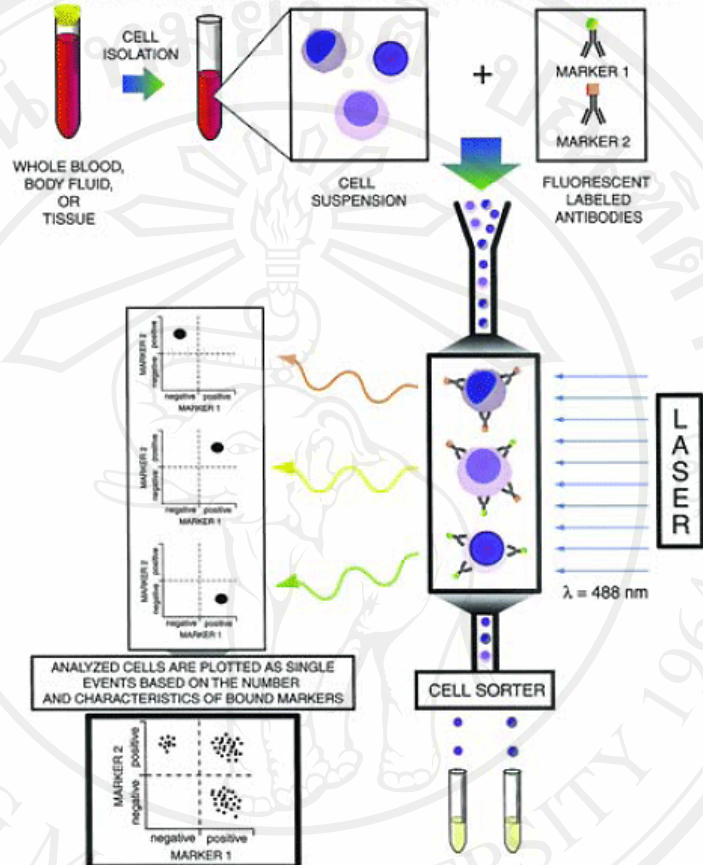
2.7 การตรวจสอบวัฏจักรเซลล์โดยเทคนิค flow cytometry

งานวิจัยนี้มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ของการจำแนกเซลล์ด้วยการวัดขนาด นิวเคลียสกับการวัดเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงในการ ตรวจสอบวัฏจักรเซลล์จึงควรมีความเข้าใจในหลักการของเครื่อง และวิธีการวัด flow cytometry เป็นวิธีการวัดคุณสมบัติของเซลล์ซึ่งอยู่ในสารละลายที่ไหลอยู่โดยใช้เลเซอร์ หลักการทำงานของ flow cytometer อาศัยการวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิว เซลล์หรือภายในเซลล์ขณะที่ไหลผ่านเครื่องเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในอัตราเร็ว 500-1,000 เซลล์/วินาทีเมื่อเซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีอุปกรณ์ตรวจสอบการหักเหของแสงเรียกว่า detector ซึ่งจะวัดค่าการหักเห ของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถหาขนาดของเซลล์ได้และวัดค่าการหักเห ของแสงที่ออกจากเซลล์จะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้จากนั้นเครื่องก็ จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อประมวลผลออกมาเป็นค่าทางดิจิทัลเป็นขนาดและรูปร่างของเซลล์หรือโมเลกุลนั้นๆ (โกวิทย์, 2539) ส่วนประกอบของเครื่อง flow cytometer แบ่งเป็น 4 ส่วน (ภาพ 2.4) รายละเอียดดังต่อไปนี้

1. fluidic system มีหน้าที่ในการสร้างกระแสการไหลของ fluid หรือ isotonic buffer saline solution ที่มีเซลล์ หรืออนุภาคที่ต้องการตรวจนับแขวนลอยอยู่และมีตัว บังคับให้เซลล์ไหลเรียงเดี่ยว ด้วยความเร็วที่เท่าๆ กันให้ผ่าน flow chamber ซึ่งมี ตัวปล่อยแสง laser ส่องมากระทบเซลล์ที่ไหลผ่าน
2. optical system ทำหน้าที่สร้างลำแสง ซึ่งส่วนมากเป็นแสง laser เนื่องจากเป็น monochromatic และ high intensity เมื่อลำแสงส่องกระทบเซลล์ที่ตกลงใน flow chamber ก็จะมีการหักเหของแสง 2 แบบ คือ forward scatter (low angle) ซึ่งจะ แปรผันตามขนาดของเซลล์ และเกิดการหักเหแบบ side scatter (high angle) ซึ่งจะ แปรผันตาม granularity ของเซลล์นั้นๆ
3. detector system มีหน้าที่ตรวจรับสัญญาณแสงทั้ง 2 ชนิดที่ออกมา รวมทั้ง fluorescent signal โดยมี photo-multiplier tube หรือ light detectors ทำหน้าที่รับ สัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้า โดยจะมีตัว detector อย่างน้อย 4 ตัว
4. data process system มีหน้าที่รวบรวมสัญญาณไฟฟ้าที่ได้รับมาจาก detector System แล้วนำไปประมวลผลเรียบเรียงให้เป็น histogram ซึ่งทั้งหมดนี้จะเป็นการ

ทำงานของระบบคอมพิวเตอร์แล้วแสดงออกมาที่หน้าจอหรือพิมพ์ออกมาในกระดาษได้

FLOW CYTOMETRY: ANALYSIS OF CELL MARKERS



ภาพ 2.4 เครื่อง Flow Cytometry (ที่มา <http://img.medscape.com/article/532/108/art-lab532108.fig2b.gif>, วันที่สืบค้น 20 สิงหาคม 2554)

เครื่อง flow cytometer สามารถจำแนกเซลล์ให้อยู่ในระยะต่างๆ โดยวัดจากปริมาณของ DNA ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะ เซลล์ที่ศึกษาจะถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ ลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนต์ของ DNA ในแต่ละเซลล์เรียกเป็น arbitrary unit จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อจำนวน DNA content ในแต่ละเซลล์ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ เซลล์ในระยะ G₁ ไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA มีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนต์เป็น 1 arbitrary unit เซลล์ในระยะ S เริ่มมีการเพิ่มจำนวน DNA เกิดขึ้นมีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนต์เป็น intermediate คืออยู่ระหว่าง 1 arbitrary unit และ 2 arbitrary unit

และเซลล์ในระยะ G2 และ M มีการเพิ่มจำนวน DNA เป็น 2 เท่ามีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น 2 arbitrary unit (ยุทธนา, 2549)

ข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถวิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคหรือเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์เสียหายสามารถแยกเซลล์ตามคุณสมบัติ DNA content ได้ ทำให้ทราบจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ และสามารถนับเซลล์และบันทึกข้อมูลทางสถิติได้ โดยสามารถนับเซลล์ปริมาณมากๆ พร้อมกับการคัดแยกได้ในความเร็วสูง การประยุกต์ใช้ flow cytometry ส่วนข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ต้องใช้เซลล์เป็นจำนวนมาก ในการวิเคราะห์ ในการเตรียมเซลล์สำหรับวิเคราะห์และการควบคุมเครื่องต้องใช้ความชำนาญสูง ปัจจุบันได้มีการนำ flow cytometry มาใช้ในการวิจัยหลายๆ ด้านเช่นการตรวจหาความผิดปกติในโครโมโซม การตรวจหาเซลล์มะเร็งเพื่อติดตามผลการรักษา การศึกษาและจำแนกวัฏจักรเซลล์อย่างไรก็ตามเครื่อง flow cytometer มีราคาแพง และต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงจึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้ทั่วไปและไม่นิยมใช้กับงานที่เป็นเพียงขั้นพื้นฐาน (ศิรินันท์, 2548)

2.8 การตรวจสอบการควบคุมวัฏจักรเซลล์ในเซลล์เชื้อสาย HeLa, A549 และ NCI-H1299 เมื่อได้รับยามาตรฐาน

เบญจวรรณ (2554) พบว่า cisplatin สามารถควบคุมวัฏจักรเซลล์และชักนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์เชื้อสาย HeLa ได้และไพบูลย์ (2554) ทำการศึกษาวัฏจักรของเซลล์ A549 หลังจากได้รับยามาตรฐาน cisplatin เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีแนวโน้มในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G2 ทำให้เซลล์ไม่สามารถเข้าสู่ M phase ได้เซลล์จึงไม่เกิดการแบ่งตัว ซึ่งเป็นผลดีต่อการรักษามะเร็ง นอกจากนี้วัลย์ลักษณ์ (2554) ทำการศึกษาวัฏจักรของเซลล์ NCI-H1299 หลังจากได้รับยามาตรฐาน etoposide เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีแนวโน้มในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G2 และสามารถชักนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอโทซิสเพิ่มขึ้น 16%