

CM Model-1: An Artificial Intelligence for Measuring Density of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

Poonsin Pongpairoj (M.Sc.)*, Theeraporn Maneesawat (M.Sc.)*, Sasipa Muensri (M.Sc.)*, Ugrit Boonpramarn (M.Sc.)**

*Siriraj Research Group in Immunobiology and Therapeutic Sciences, Research Department, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, **Department of Diagnostic and Therapeutic Radiology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

Siriraj Medical Bulletin 2024;17(2):109-117

ABSTRACT

Objective: The cell culture process requires an experienced person to evaluate the cell density so that results can be accurate and precise. To reduce human errors, artificial intelligence (AI) technology is implemented for cell density estimation. This will create the standardization of the assessment and improve repeatability, and reproductivity without human concerns. This study thus aims to apply an AI system (cell density measurement model-1, CM Model-1) for percent confluence evaluation to replace human visual judgement.

Materials and Methods: The CM Model-1 was developed by using 9,642 images consisting of training data (9,042 images) and test data sets (600 images) at different % confluence (i.e., 10-29%, 30-49%, 50-69%, 70-89%, and 90-100%) of adipose-derived stem cells (ADSCs) during the serial passaging. Cell morphology and numbers were observed by using an inverted microscope at 4X (5,673 images) and 10X (3,969 images) magnification.

Results: The morphology of ADSCs was fibroblast-like cells and had a normal growth rate. Results show that the training data set from the CM Model-1 had average precision, recall, F1-score and accuracy values at 4X magnification of 98% for all values and those at 10X magnification were 100% for all values. However, the results from the test data set at 4X magnification had lower with 95% for all those and at 10X magnification were 93% for precision, 93% for recall, 92% for F1-score, and 92% for accuracy.

Conclusion: The CM Model-1 is reliable with great precision, accuracy and reproducibility. Nevertheless, CM Model-1 was performed with only fibroblast-like cells in the preliminary study; therefore, it is warranted to further explore in different cell types.

Keywords: Cell culture; cell density; artificial intelligence; % confluence; adipose-derived stem cells

Correspondence to: Ugrit Boonpramarn

Email: rbus.sk@gmail.com

Received: 30 August 2023

Revised: 6 November 2023

Accepted: 14 November 2023

<http://dx.doi.org/10.33192/smb.v17i2.265032>

CM Model-1: ระบบปัญญาประดิษฐ์สำหรับประเมินความหนาแน่นของ Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

พูนสิน พวงไพโรจน์ (วท.ม.)*, ธีราพร มณีสวัสดิ์ (วท.ม.)*, ศศิภา หมื่นศรี (วท.ม.)*, อุกฤษ บัญประมาณ (วท.ม.)*

*กลุ่มวิจัยด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกันและวิทยาศาสตร์การบำบัด ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10700 ประเทศไทย, **ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: กระบวนการเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์ด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้ผลถูกต้องแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการประเมินความหนาแน่นของเซลล์เพื่อพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นถัดไป การนำเทคโนโลยีระบบปัญญาประดิษฐ์มาช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์จึงเป็นอีกวิธีที่สามารถช่วยให้กระบวนการประเมินความหนาแน่นของเซลล์เป็นมาตรฐานสามารถทำซ้ำได้ และได้ผลลัพธ์เหมือนกันโดยไม่ต้องขึ้นกับบุคคล การศึกษาวิจัยนี้ต้องการประยุกต์ใช้ AI ที่เรียกว่า Cell density measurement model-1 (CM Model-1) สำหรับการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ เพื่อลดความผิดพลาดในการประเมินด้วยสายตาตามมนุษย์

วิธีการศึกษา: การพัฒนา CM Model-1 ใช้ภาพถ่ายจากตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันเพื่อดูความหนาแน่นของเซลล์ Adipose-derived stem cells (ADSCs) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 4X จำนวน 5,673 ภาพ และ 10X จำนวน 3,969 ภาพ ในแต่ละช่วงร้อยละความหนาแน่น ได้แก่ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 รวมทั้งสิ้น 9,642 ภาพ โดยแบ่งภาพถ่ายเป็น 2 ชุด คือ Training Data Set (9,042 ภาพ) และ Test Data Set (600 ภาพ) เพื่อวิเคราะห์ความถูกต้องและแม่นยำของ Model

ผลการศึกษา: จากการศึกษาพบว่า ADSCs มีลักษณะรูปร่างคล้าย fibroblast และมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามช่วงร้อยละความหนาแน่น 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 เป็นปกติตามลำดับ ของทั้งกำลังขยาย 4X และ 10X จากผลการพัฒนา Model จาก Training data set ที่กำลังขยาย 4X มีค่าเฉลี่ยของ Precision, Recall, F1-score และ Accuracy เท่ากับร้อยละ 98, 98, 98 และ 98 ที่กำลังขยาย 10X เท่ากับร้อยละ 100, 100, 100 และ 100 ตามลำดับ และจาก Test data set ที่กำลังขยาย 4X มีค่าเฉลี่ยของ Precision, Recall, F1-score และ Accuracy เท่ากับร้อยละ 95, 95, 95 และ 95 ที่กำลังขยาย 10X เท่ากับร้อยละ 93, 93, 92 และ 92 ตามลำดับ

สรุป: แสดงให้เห็นว่า CM Model-1 มีประสิทธิภาพในการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อย่างไรก็ตาม CM Model-1 นี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่สามารถใช้กับเซลล์ที่มีรูปร่างคล้าย fibroblast เพียงชนิดเดียวอยู่ ยังต้องเรียนรู้เพิ่มเติมเพื่อสามารถใช้กับเซลล์ได้หลากหลายต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์เพาะเลี้ยง; ความหนาแน่นของเซลล์; เทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์; ร้อยละความหนาแน่น; สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน

บทนำ

กระบวนการทำงานวิจัย เรื่องการศึกษาประสิทธิภาพของ ยา วัคซีน และเซลล์บำบัดสำหรับทางการแพทย์ เพื่อการรักษาหรือ เสริมความสวยความงาม จำเป็นต้องผ่านกระบวนการศึกษาวิจัย หลายขั้นตอนในเซลล์ เพื่อดูผลความปลอดภัย หรือผลข้างเคียง ก่อนที่จะนำยา วัคซีน หรือเซลล์เหล่านั้นไปใช้ในการศึกษาวิจัยใน มนุษย์ หรือสิ่งมีชีวิตต่อไปได้ (in vivo study) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพในหลอดทดลอง หรืองานเพาะเลี้ยง (in vitro study) ก่อนเสมอ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ถือเป็นหนึ่งในกระบวนการเริ่มต้นที่สำคัญต่อการศึกษาวิจัยแบบ *in vitro* ที่ต้องอาศัยความชำนาญ ความรู้ความเข้าใจ และความรู้พื้นฐานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงเทคนิคเฉพาะต่าง ๆ ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น กระบวนการเก็บเซลล์แบบแช่แข็ง (Cell cryopreservation) การละลายเซลล์ที่แช่แข็ง (Cell thawing) เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้คุณภาพต่อไป และการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ (% confluence) ที่ต้องอาศัยความรู้ด้านลักษณะรูปร่างของเซลล์ (Cell morphology) เพื่อการขยายเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell subculture) รวม

ถึงมีความรู้ ความเข้าใจ และเทคนิคต่างๆระหว่างการปฏิบัติงานต้องปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ (Biological contamination) ในระหว่างที่เพาะเลี้ยงเซลล์ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกห้องปฏิบัติการวิจัย¹

การเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์โดยปกติแล้วในช่วง 12-48 ชั่วโมง หลังจากที่เราเริ่มลงเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยง (Cell seeding) ในภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Flask) จะเรียกว่า Lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เริ่มฟื้นฟู ภายในเซลล์เริ่มมีการสร้างเส้นใยใหม่ (Cytoskeleton) เซลล์เริ่มยืดออก และมีการสร้างเมทริกซ์ (Matrix) เพื่อยึดเกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงเริ่มกลับเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ (Cell cycle)

ถัดมาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จะเข้าสู่ช่วงที่เรียกว่า Log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้น (Population doubling time) โดยในช่วง Log phase นี้จะมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสม มีความเป็นสมดุลของความเป็นกรด-ด่าง ปราศจากสารพิษและปลอดเชื้อที่เรียกว่า อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ครบถ้วน (Complete medium) เพื่อให้เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง

จากนั้นเมื่อเซลล์เจริญเติบโตถึงจุดหนึ่งที่เรียกว่า plateau หรือ Stationary phase คือ ช่วงที่เซลล์เริ่มแก่ (Senescence) เริ่มหยุดการเจริญเติบโต เซลล์จะเริ่มเข้าสู่กระบวนการตาย (Apoptosis) ตามวัฏจักรของเซลล์ปกติ²⁻³ ดังนั้นความหนาแน่นของเซลล์ในช่วงท้ายของ Log phase ก่อนจะเข้าสู่ช่วง Plateau phase จะค่อนข้างมาก โดยมีจำนวนเซลล์อยู่ประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นที่ผิวทั้งหมดภายในภาชนะเลี้ยงเซลล์ จึงเป็นช่วงที่ควรทำการขยายเซลล์เพาะเลี้ยง (Subculture) มากที่สุด ซึ่งหากเซลล์มีร้อยละความหนาแน่นมากกว่า 90 จะทำให้เซลล์ตาย หรือน้อยกว่าร้อยละ 80 เซลล์จะน้อยเกินไป อาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดต่อจำนวนเซลล์ที่ต้องการนำไปใช้ในกระบวนการต่อไป การประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์จึงเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์ (Artificial Intelligence, AI) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการทำงานด้านต่างๆเป็นอย่างมาก วงการการแพทย์ทางการแพทย์โรค เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง เป็นต้น หรือด้านเทคโนโลยี-วิทยาศาสตร์สุขภาพ และศึกษาพัฒนาเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการนำมาใช้ ในปี 2019 Amisha และคณะ⁵ ได้ทำการศึกษาข้อได้เปรียบและเสียเปรียบของการนำเทคโนโลยีด้านปัญญาประดิษฐ์มาใช้ทางการแพทย์ โดยพบว่าเทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ ความแม่นยำ รวมถึงสามารถลดภาระงานของมนุษย์ได้ และจากรายงานการศึกษาของ Henry Joutsijoki และคณะ⁶ ได้มีการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดประเภท Induced pluripotent stem cells (iPSCs) ที่เพาะเลี้ยงมาแล้ว 5-7 วัน จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้นใช้เทคนิค *k*-nearest neighbor

(*k*-NN) classifier ของเทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์ช่วยจำแนกกลุ่มรูปภาพออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีลักษณะที่เห็นชัดเจน กลุ่มที่ค่อนข้างดีพอเห็นชัดเจน และกลุ่มที่เห็นได้ไม่ชัดออกจากกัน แทนการใช้ระบบคัดเลือกโดยมนุษย์ พบว่าระบบปัญญาประดิษฐ์มีความแม่นยำในการจำแนกรูปภาพเท่ากับร้อยละ 62.4

จากหลายรายงานการศึกษาวิจัยโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมัน Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) มาเพาะเลี้ยง เซลล์ที่ได้จะมีรูปร่างลักษณะ (Morphology) ยืดแผ่ขยายออก (Spindle-shaped) ซึ่งคล้ายลักษณะรูปร่างของเซลล์ประเภท Fibroblast⁷⁻¹⁴ ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาวิจัยการนำ ADSCs ไปประยุกต์ใช้ด้านการรักษาโรคต่าง ๆ ทางกายภาพบำบัดอย่างกว้างขวาง เช่น การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม การสร้างเซลล์ไขมันให้กับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโรคกระดูกพรุน เป็นต้น รวมไปถึงด้านความสวยความงาม¹⁵⁻¹⁸ การเพาะเลี้ยง ADSCs เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ สำหรับการเปลี่ยนลำดับรุ่น (Cell passage) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่จะได้ สำหรับการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Harvest cells) ให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการ วิธีการสังเกตปริมาณจำนวนของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นให้อยู่ในช่วงของ Log phase ที่มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ของพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นสิ่งสำคัญมากต่อการพิจารณาให้ทำการ Subculture หรือ Harvest ซึ่งต้องใช้ความชำนาญ หรือประสบการณ์ด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์สูงมาก และเป็นมาตรฐานเดียวกันทุกครั้ง ดังนั้นคณะผู้ทำการศึกษาจึงได้เล็งเห็นถึงประโยชน์ของการนำเทคโนโลยี AI มาใช้ในการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ โดยการสร้าง CM Model-1 เพื่อช่วยลดความผิดพลาดจากการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ด้วยสายตาของผู้ปฏิบัติงานแต่ละบุคคล และใช้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (Standardization) สำหรับกำหนดร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตในภาชนะเพาะเลี้ยงเท่ากับร้อยละ 80 และเข้าสู่กระบวนการ Subculture หรือ Harvest ต่อไป เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

การพัฒนา CM Model-1 สำหรับช่วยประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยลดความผิดพลาดจากการประเมินร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ด้วยสายตาของผู้ปฏิบัติงาน และใช้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (Standardization) สำหรับกำหนดร้อยละความหนาแน่นของเซลล์

วิธีการศึกษา

ตัวอย่าง (Samples)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมัน (Adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs) จากมนุษย์ เพศหญิง อายุ 49 ปี, Passage 2 ที่ได้รับมาจาก American Type Culture

Collection (ATCC®) Manassas, VA 20110-2209, USA , PCS-500-011™, Lot Number : 70040251

การเก็บรวบรวมข้อมูลภาพถ่ายร้อยละความหนาแน่นของเซลล์เพื่อพัฒนา CM Model-1

ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง ADSCs จะเริ่มบันทึกภาพถ่ายตั้งแต่ความหนาแน่นของเซลล์ร้อยละ 10 เป็นต้นไป ที่กำลังขยาย 4X และ 10X ด้วยชุดกล้องถ่ายภาพดิจิทัล (ยี่ห้อ LANOPTIK, HW1200Z-O) ที่ประกอบเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (ยี่ห้อ Olympus, CKX41) ผ่านโปรแกรม Pixit Pro.A4 โดยกำหนดหลักเกณฑ์การคัดเลือกภาพถ่ายความหนาแน่นของเซลล์ดังนี้

เกณฑ์การรับภาพถ่ายเข้าศึกษา (Inclusion criteria)
คือ ภาพถ่ายที่เห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน ไม่มีมืด และไม่สว่างเกินไป

เกณฑ์การไม่รับภาพถ่ายเข้าศึกษา (Exclusion criteria)
คือ ภาพถ่ายที่ไม่เห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจนหรือมีมืด และสว่างเกินไป

การเก็บรวบรวมภาพถ่ายความหนาแน่นของเซลล์จำนวนทั้งหมด 9,642 ภาพ โดยแบ่งชุดข้อมูลภาพถ่ายร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ออกเป็นทั้งหมด 5 ช่วง ได้แก่ ช่วงร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100

สำหรับการสร้าง CM Model-1 จะแบ่งชุดข้อมูลภาพถ่ายออกเป็นทั้งหมด 2 ชุด ได้แก่

- ภาพถ่ายชุดที่ 1 จะเป็น Training data set (จำนวนทั้งหมด 9,042 ภาพ)

ใช้สำหรับการพัฒนา CM Model-1 จะทำการรวบรวมภาพถ่ายร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ตามแต่ละช่วงดังที่กล่าวมาข้างต้น ที่กำลังขยาย 4X และ 10X โดยแต่ละภาพจะถูกจัดกลุ่มให้ตรงตามช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ตามการเจริญเติบโตของเซลล์โดยผู้ชำนาญงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์

- ภาพถ่ายชุดที่ 2 จะเป็น Test data set (จำนวน

ทั้งหมด 600 ภาพ)

ใช้สำหรับทดสอบความถูกต้องและแม่นยำของ CM Model-1 ที่กำลังขยาย 4X และ 10X โดยแต่ละภาพจะไม่มีการจัดกลุ่มตามช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ ตามการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อทดสอบความถูกต้องและแม่นยำของ CM Model-1

การพัฒนาและทดสอบความแม่นยำของ CM Model-1

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของ CM Model-1 ในระหว่างกระบวนการ Training model และ Validation วัดค่า Accuracy, Precision, Recall และ F1-score โดยส่วนมากจะวัดประสิทธิภาพจากค่า Confusion matrix คือ ตารางสำหรับใช้วัดความสามารถของ Machine learning ในการแก้ปัญหาแต่ละ Classification¹⁹

คำนิยามและการคำนวณค่า Precision, Recall, Accuracy และ F1-score มีดังนี้¹⁹

Precision เป็นการวัดความแม่นยำของข้อมูล โดยพิจารณาจากค่า True Positive และ False Positive จากสมการ

$$\text{Precision} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

Recall เป็นการวัดความถูกต้องของ Model โดยพิจารณาจากค่า True Positive และ False Negative จากสมการ

$$\text{Recall} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$$

Accuracy เป็นการวัดความถูกต้องของ Model โดยพิจารณาจากค่า True Positive, True Negative, False Positive และ False Negative จากสมการ

$$\text{Accuracy} = \frac{[\text{TP} + \text{TN}]}{[(\text{TP} + \text{TN}) + (\text{FP} + \text{FN})]}$$

F1-score เป็นการนำค่าระหว่าง Precision และ Recall มาเฉลี่ยแบบ Harmonic mean สร้าง F1 ขึ้นมาเพื่อเป็น Single metric ที่ใช้วัดความสามารถของ Model โดยค่า F1-score ที่เข้าใกล้ร้อยละ 100 มากที่สุดแสดงถึงความสามารถของ Model ได้ดีที่สุด จากสมการ

$$\text{F1-score} = 2 \times \frac{[\text{precision} \times \text{recall}]}{[\text{precision} + \text{recall}]}$$

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถของ Machine learning¹⁹

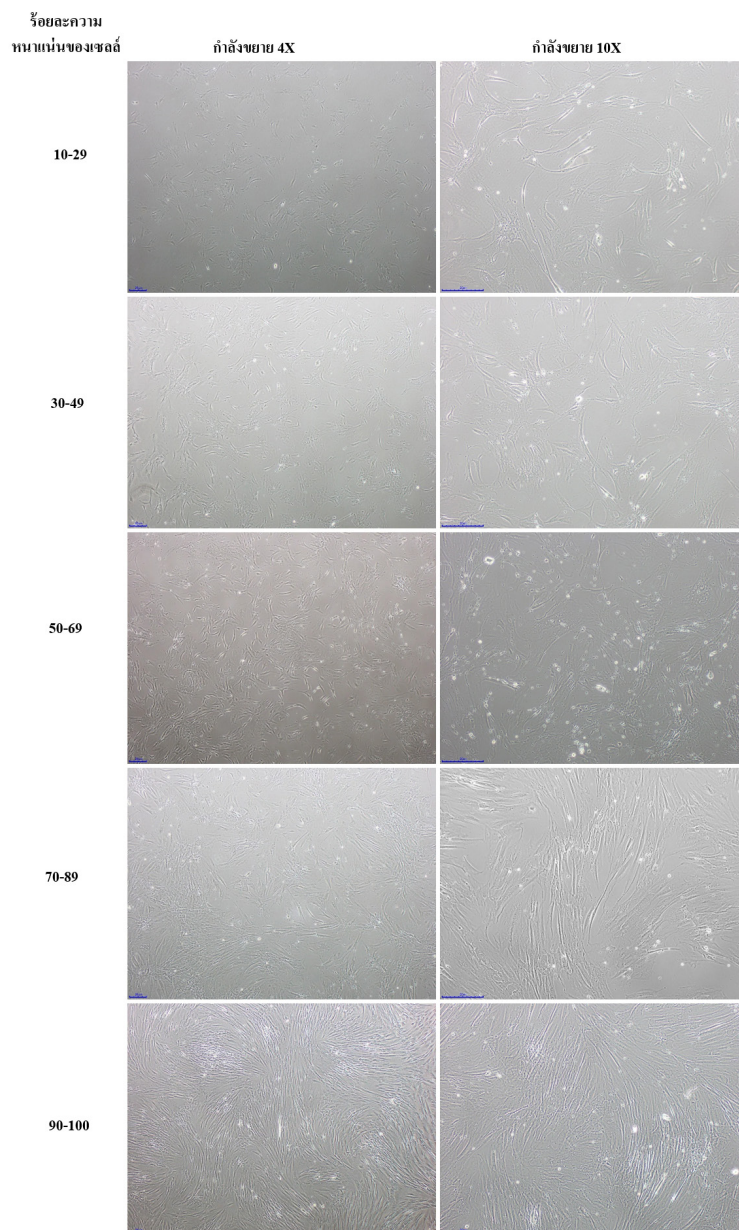
		Predicted	
		Negative	Positive
Actual	Negative	TN	FP
	Positive	FN	TP

ผลการศึกษา

จากผลภาพถ่ายร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ที่กำลังขยาย 4X และ 10X ลักษณะของ ADSCs ที่เพาะเลี้ยงมีรูปร่างขนาดประมาณ 40-50 μm และการเจริญเติบโตของ ADSCs มีร้อยละความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

จากการเก็บรวบรวมภาพถ่ายร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ทั้งหมด 9,642 รูป โดยแบ่งเป็นภาพถ่ายของชุดข้อมูลที่ 1 Training data set ที่กำลังขยาย 4X จำนวนทั้งหมด 5,373 รูป โดย

แต่ละช่วงความหนาแน่นของเซลล์ที่ร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 มีจำนวนเท่ากับ 1,003, 1,057, 1,102, 1,106 และ 1,105 รูปตามลำดับ (มีข้อมูลของค่า Confusion matrix และค่า TN, FP, FN, TP แสดงดังตารางที่ 1 และ 2 ในเอกสาร Supplementary data) และจากผลการประเมินประสิทธิภาพของ CM Model-1 ที่ได้รับการพัฒนาในงานวิจัยนี้ที่กำลังขยาย 4X มีค่าเฉลี่ยของค่า precision เท่ากับร้อยละ 98, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 98, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 98 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 98 (ตารางที่ 2) และภาพถ่ายที่กำลังขยาย 10X จำนวนทั้งหมด 3,669



ภาพที่ 1 แสดงความหนาแน่นการเจริญเติบโตของ ADSCs ที่มีร้อยละความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นตามลำดับตั้งแต่ช่วงร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 (scale bar ขนาด 20 μm)

ที่มา: พูนสิน พวงไพโรจน์ กลุ่มวิจัยด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกันและวิทยาศาสตร์การบำบัด ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

รูป โดยแต่ละช่วงความหนาแน่นของเซลล์ที่ร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 มีจำนวนเท่ากับ 993, 591, 620, 975 และ 490 รูป ตามลำดับ และจากผลการประเมินประสิทธิภาพของ CM Model-1 ที่ได้รับการพัฒนาในงานวิจัยนี้ที่กำลังขยาย 10X มีค่าเฉลี่ยของค่า Precision เท่ากับร้อยละ 100, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 100, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 100 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 100 (ตารางที่ 3)

หลังจาก CM Model-1 ผ่านการประเมินการเรียนรู้จากชุดข้อมูลที่ 1 Training data set แล้ว CM Model-1 ได้ถูกนำมาประเมินการเรียนรู้ต่อไปโดยใช้ภาพถ่ายชุดข้อมูลที่ 2 Test data set ที่กำลังขยาย 4X จำนวนทั้งหมด 300 รูป พบว่า CM Model-1 สามารถแยกภาพถ่ายที่ร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ระหว่างช่วง

ร้อยละที่ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 ได้จำนวน 69, 49, 57, 64 และ 61 รูปตามลำดับ (มีข้อมูลของค่า Confusion matrix และค่า TN, FP, FN, TP แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ในเอกสาร Supplementary data) มีค่าเฉลี่ยของค่า Precision เท่ากับร้อยละ 95, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 95, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 95 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 95 (ตารางที่ 4) และภาพถ่ายที่กำลังขยาย 10X จำนวนทั้งหมด 300 รูป ร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ระหว่างช่วงร้อยละที่ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 ได้จำนวน 62, 60, 57, 62 และ 59 รูปตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยของค่า Precision เท่ากับร้อยละ 93, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 93, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 92 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 92 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 2 ผลประเมินค่า Precision, ค่า Recall, ค่า F1-score และค่า Accuracy ณ ช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ของภาพถ่ายเซลล์ที่กำลังขยาย 4X สำหรับพัฒนา CM Model-1 (ชุดข้อมูลที่ 1 Training data set)

ร้อยละความหนาแน่น	จำนวนภาพถ่าย	Precision (%)	Recall (%)	F1-score (%)
10-29	1,003	98	99	98
30-49	1,057	97	98	97
50-69	1,102	99	96	98
70-89	1,106	98	97	97
90-100	1,105	97	100	98
รวมทั้งหมด	5,373	-	-	-
Average	-	98	98	98
Accuracy	-	-	-	98

ตารางที่ 3 ผลประเมินค่า Precision, ค่า Recall, ค่า F1-score และค่า Accuracy ณ ช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ของภาพถ่ายเซลล์ที่กำลังขยาย 10X สำหรับพัฒนา CM Model-1 (ชุดข้อมูลที่ 1 Training data set)

ร้อยละความหนาแน่น	จำนวนภาพถ่าย	Precision (%)	Recall (%)	F1-score (%)
10-29	993	100	100	100
30-49	591	100	100	100
50-69	620	100	100	100
70-89	975	100	100	100
90-100	490	100	100	100

ร้อยละความหนาแน่น	จำนวนภาพถ่าย	Precision (%)	Recall (%)	F1-score (%)
รวมทั้งหมด	3,669	-	-	-
Average	-	100	100	100
Accuracy	-	-	-	100

ตารางที่ 4 ผลประเมินค่า Precision, ค่า Recall, ค่า F1-score และค่า Accuracy ณ ช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ของภาพถ่ายเซลล์ที่กำลังขยาย 4X สำหรับทดสอบความถูกต้องและแม่นยำของ CM Model-1 (ชุดข้อมูลที่ 2 Test data set)

ร้อยละความหนาแน่น	จำนวนภาพถ่าย	Precision (%)	Recall (%)	F1-score (%)
10-29	69	100	96	98
30-49	49	82	100	90
50-69	57	96	86	91
70-89	64	98	97	98
90-100	61	100	98	99
รวมทั้งหมด	300	-	-	-
Average	-	95	95	95
Accuracy	-	-	-	95

ตารางที่ 5 ผลประเมินค่า Precision, ค่า recall, ค่า F1-score และค่า Accuracy ณ ช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ของภาพถ่ายเซลล์ที่กำลังขยาย 10X สำหรับทดสอบความถูกต้องและแม่นยำของ CM Model-1 (ชุดข้อมูลที่ 2 Test data set)

ร้อยละความหนาแน่น	จำนวนภาพถ่าย	Precision (%)	Recall (%)	F1-score (%)
10-29	62	94	95	94
30-49	60	86	90	88
50-69	57	91	86	88
70-89	62	94	95	94
90-100	59	100	97	98
รวมทั้งหมด	300	-	-	-
Average	-	93	93	92
Accuracy	-	-	-	92

สรุป

ผลการศึกษาลักษณะของเซลล์ ADSCs ในแต่ละช่วงระยะของร้อยละความหนาแน่นของเซลล์จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (ภาพที่ 1) พบว่า ที่กำลังขยาย 4X และ 10X เซลล์มีขนาดปกติ และรูปร่างของเซลล์มีลักษณะยืดแผ่ขยายออก (Spindle-shaped) หรือคล้าย Fibroblast และแต่ละช่วงระยะของร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ ได้แก่ ร้อยละ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 มีความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากผลการทดสอบความถูกต้องและแม่นยำสำหรับพัฒนา CM Model-1 เพื่อช่วยประเมินความหนาแน่นของ ADSCs ช่วงระหว่างร้อยละความหนาแน่นที่ 10-29, 30-49, 50-69, 70-89 และ 90-100 ที่กำลังขยาย 4X มีค่าเฉลี่ยของค่า Precision เท่ากับร้อยละ 95, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 95, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 95 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 95 และที่กำลังขยาย 10X มีค่าเฉลี่ยของค่า Precision เท่ากับร้อยละ 93, ค่า Recall เท่ากับร้อยละ 93, ค่า F1-score เท่ากับร้อยละ 92 และค่า Accuracy เท่ากับร้อยละ 92 ซึ่งเป็นค่าร้อยละที่เข้าใกล้ 100 ดังนั้น CM Model-1 ในการศึกษาที่มีความถูกต้องและแม่นยำค่อนข้างมาก สามารถช่วยลดความผิดพลาดของมนุษย์และสามารถช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์ออกมาเป็นในทิศทางเดียวกันให้กับผู้ปฏิบัติงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม CM Model-1 นี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่สามารถใช้กับเซลล์ชนิด ADSCs หรือเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกันเท่านั้น ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถนำไปใช้กับเซลล์ได้หลายชนิดมากขึ้นต่อไป

อภิปรายผล

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์ ADSCs ในแต่ละช่วงร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ระยะต่าง ๆ ขนาดและรูปร่างของเซลล์มีลักษณะเป็นแบบ Spindle-shaped หรือคล้าย Fibroblast ซึ่งสอดคล้องตรงกับหลายงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้⁷⁻¹⁵

การประเมินความหนาแน่นของเซลล์ด้วยสายตาของผู้ปฏิบัติงานเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ไม่มีความซับซ้อน แต่การประเมินความหนาแน่นของเซลล์ด้วยวิธีนี้อาจมีความผิดพลาดจากมนุษย์ (Human error) ที่เกิดจากความเอนเอียง (Bias) หรือความหลากหลายในการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ในแต่ละบุคคลไม่เท่ากัน การนำเทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการประเมินความหนาแน่นของเซลล์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ลดโอกาสการเกิด Human error ได้ จากการศึกษาวิจัยของ Gil Topman และคณะ²⁰ ได้พัฒนาวิธีการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ด้วย algorithm โดยศึกษากับเซลล์ทั้งหมด 3 ชนิดที่แตกต่างกัน (NIH3T3 fibroblasts, C2C12 myoblasts และ 3T3L1 pre-adipocytes) และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นเวลา 5 วัน

(วันละ 2 ครั้ง) โดยความหนาแน่นของเซลล์คำนวณจากค่า Pixel ของพื้นที่ว่างระหว่างเซลล์ พบว่าเมื่อเทียบผลการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ระหว่าง Algorithm กับผู้เชี่ยวชาญทางด้านชีววิทยาให้ผลออกมาค่อนข้างสอดคล้องกัน นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Ching-Hsiang Chiu และคณะ²¹ ที่ได้พัฒนา Algorithm สำหรับการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ โดยใช้ Cell line ของ Human normal oral fibroblasts (hOFs) ซึ่งถูกเก็บข้อมูลรูปภาพในขณะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 60 ชั่วโมง แล้วจึงนำภาพถ่ายเหล่านั้นมาประเมินความหนาแน่นของเซลล์ด้วย Model ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ ที่ถูกประเมินโดยนักวิจัยที่มีประสบการณ์และความชำนาญด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า Algorithm ที่ได้รับการพัฒนาสามารถประเมินความหนาแน่นของเซลล์ ออกมาได้ใกล้เคียงกับนักวิจัยที่มีความชำนาญด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ Model นี้เป็นเครื่องมือช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์แทนนักวิจัยได้ เมื่อเปรียบเทียบกับจากการศึกษาเบื้องต้น (Preliminary study) ในครั้งนี้ได้สร้าง CM Model-1 จากภาพถ่ายความหนาแน่นของ ADSCs ที่กำลังขยาย 4X และ 10X จำนวนทั้งหมด 9,642 รูป โดยแบ่งชุดภาพถ่ายออกเป็น 2 ชุดข้อมูล ได้แก่ ชุดข้อมูลสำหรับการสร้าง CM Model-1 (Training data set) จำนวน 9,042 รูป และชุดข้อมูลทดสอบ CM Model-1 (Test data set) จำนวนชุดข้อมูลรวม 600 รูป มีค่า Precision, Recall, F1-score และ Accuracy ของทั้ง 2 ชุดข้อมูล เข้าใกล้ร้อยละ 100 (มากกว่าร้อยละ 90) แสดงให้เห็นว่า CM Model-1 นี้มีความถูกต้องและแม่นยำค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม CM Model-1 ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ค่าของชุดข้อมูล Test data set มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น รวมถึงการนำไปใช้กับเซลล์ได้หลากหลายมากขึ้น ดังนั้น CM Model-1 ในศึกษานี้จึงเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาและพัฒนาต่อ เพื่อนำ Model รุ่นต่อไปมาช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ให้กับผู้ปฏิบัติงานหรือผู้เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ (Novice study) เพื่อช่วยประกอบการตัดสินใจเบื้องต้นในการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ ลดความผิดพลาดจากการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ด้วยสายตาของผู้ปฏิบัติงาน และใช้เป็นมาตรฐานเดียวกัน สำหรับกำหนดร้อยละความหนาแน่นของเซลล์ก่อนกระบวนการ Subculture หรือ Harvest เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ต่อไป

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

สำหรับการศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี CM Model-1 ที่สร้างขึ้นเพื่อช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์เพาะเลี้ยง จำเป็นต้องมีการศึกษาในผู้เชี่ยวชาญ ผู้ปฏิบัติงาน และผู้ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม เพื่อลดปัจจัยที่อาจเกิดจากความเอนเอียง (Bias) จากผู้เชี่ยวชาญในการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ รวมถึงการศึกษาเพิ่มเติมกับเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างอื่น ๆ เพื่อ

สามารถนำ CM Model-1 รุ่นถัดไปนำมาช่วยประเมินความหนาแน่นของเซลล์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำและสามารถใช้กับเซลล์ได้หลายชนิดมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ภาพถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิทยาศาสตร์การบำบัดรักษา Therapeutic sciences รหัส D003917 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้รับคำปรึกษาจาก รศ. ดร. ญ.เปรมฤทัย อธิเลิศเดชา และ รศ. ดร.ณัฐวัฒน์ อ่อนลมูล

เอกสารอ้างอิง

1. Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, Weiskirchen R. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*. 2023; 21;12(5):682. doi: 10.3390/cells12050682.
2. Ian Freshney R. Basic principle of cell culture. In: Vunjak-Norakovic G, Ian Freshney R, editors. *Culture of cells for tissue engineering*. New Jersey: John Wiley & Son; 2006. p. 3-22.
3. Korzyńska A, Zychowicz M. A method of estimation of the cell doubling time on basis of the cell culture monitoring data. *Biocybern Biomed Eng* 2008;28(4):75-82.
4. Shende P, Devlekar NP. A review on the role of artificial intelligence in stem cell therapy: an initiative for modern medicines. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021;22(9):1156-63.
5. Amisha, Malik P, Pathania M, Rathaur VK. Overview of artificial intelligence in medicine. *J Family Med Prim Care*. 2019;8(7):2328-31.
6. Joutsijoki H, Haponen M, Rasku J, Aalto-Setälä K, Juhola M. Machine learning approach to automated quality identification of human induced pluripotent stem cell colony images. *Comput Math Methods Med*. 2016. doi: 10.1155/2016/3091039.
7. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J Vis Exp*. 2013. doi: 10.3791/50585.
8. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*. 2015;4:713. doi: 10.1186/s40064-015-1509-2.
9. Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, Manzotti S, Gagliardi G, Papalia GF, Riccio M, Gigante A. Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:88. doi: 10.3389/fcell.2019.00088.
10. Doornaert M, De Maere E, Colle J, Declercq H, Taminau J, Lemeire K, Berx G, Blondeel P. Xenogen-free isolation and culture of human adipose mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2019;40:101532. doi: 10.1016/j.scr.2019.101532.
11. Winnier GE, Valenzuela N, Peters-Hall J, Kellner J, Alt C, Alt EU. Isolation of adipose tissue derived regenerative cells from human subcutaneous tissue with or without the use of an enzymatic reagent. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221457. doi: 10.1371/journal.pone.0221457.
12. Chang H, Do BR, Che JH, Kang BC, Kim JH, Kwon E, et al. Safety of adipose-derived stem cells and collagenase in fat tissue preparation. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(4):802-8.
13. Lee SJ, Lee CR, Kim KJ, Ryu YH, Kim E, Han YN, et al. optimal condition of isolation from an adipose tissue-derived stromal vascular fraction for the development of automated systems. *Tissue Eng Regen Med*. 2020;17(2):203-8.
14. Duan W, Lopez MJ. Effects of enzyme and cryoprotectant concentrations on yield of equine adipose-derived multipotent stromal cells. *Am J Vet Res*. 2018;79(10):1100-12.
15. Thitilertdecha P, Lohsiriwat V, Pongpaiboj P, Tantithavorn V, Onlamoon N. Extensive Characterization of Mesenchymal Stem Cell Marker Expression on Freshly Isolated and In Vitro Expanded Human Adipose-Derived Stem Cells from Breast Cancer Patients. *Stem Cells Int*. 2020. doi: 10.1155/2020/8237197.
16. Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, Liu Q, Zhang Y. Adipose-derived stem cells: current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells Int*. 2020. doi: 10.1155/2020/8810813.
17. Tang H, He Y, Liang Z, Li J, Dong Z, Liao Y. The therapeutic effect of adipose-derived stem cells on soft tissue injury after radiotherapy and their value for breast reconstruction. *Stem Cell Res Ther*. 2022. doi: 10.1186/s13287-022-02952-7.
18. Lopa S, Colombini A, Moretti M, de Girolamo L. Injunctive mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(6):2003-20.
19. Kulkarni A, D Chong, Batarseh FA. 5 - Foundations of data imbalance and solutions for a data democracy. In: Batarseh FA, Yang R, editors. *Data Democracy: At the nexus of artificial intelligence, software development, and knowledge engineering*. United Kingdom: Elsevier Science; 2020. p.83-106.
20. Topman G, Sharabani-Yosef O, Gefen A. A method for quick, low-cost automated confluency measurements. *Microsc Microanal*. 2011;17(6):915-22.
21. Chiu C-H, Leu J-D, Lin T-T, Su P-H, Li W-C, Lee Y-J, et al. Systematic quantification of cell confluence in human normal oral fibroblasts. *Applied Sciences* 2020;10(24):9146. doi:org/10.3390/app10249146