

ผลกระทบของมุมมองของหลุมจุลภาครูปรางสีเหลี่ยมข้าวหลามตัดในการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The effect of the tip angles of the diamond microwell on cell-spheroid formation



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

Department of Mechanical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของมุมมองของหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลาม ตัดในการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ
โดย	นายธนภัทร ชุนฟัง
สาขาวิชา	วิศวกรรมเครื่องกล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิน

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ ศรีสุวรรณิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิน)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.การุญ จงศิริภิญโญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.เวชพงศ์ ชูติชูเดช)

ธนภัทร ชุนพิง : ผลกระทบของมุมของหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดในการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ. (The effect of the tip angles of the diamond microwell on cell-spheroid formation) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ

การศึกษานี้แบ่งออกเป็นสองวัตถุประสงค์หลัก วัตถุประสงค์แรกเป็นการศึกษาผลกระทบของมุมของหลุมจุลภาครูปร่างทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดทั้ง 3 รูปร่างคือ มุมแหลม (66 องศา) มุมด้านเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) ต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อสำหรับการเลี้ยงที่ใช้การไหลแบบต่อเนื่อง โดยแต่ละหลุมจุลภาควางเรียงชิดกันเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะหรือเกิดการสูญเสียเซลล์ไป ในบริเวณก้นหลุมจุลภาคมีทรงกระบอกรัศมี 450 ไมโครเมตร ติดตั้งอยู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จะเกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อขึ้น และทำให้ความลึกรวมทั้งหมดของหลุมจุลภาคเท่ากับ 550 ไมโครเมตร ในการทดลองได้ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ทั้งจากผลการคำนวณ และผลการทดลองพบว่า ในกรณีหลุมจุลภาคที่มีมุม 66 องศา ของไหลที่ไหลผ่านหลุมมีการเบี่ยงเบนทิศทางการเข้าสู่กึ่งกลางหลุมมากกว่าหลุมแบบอื่น และน่าจะทำให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อของเซลล์ลำบาก เพราะถูกรบกวนจากของไหลค่อนข้างสูง ในกรณีหลุมจุลภาคที่มีมุม 90 องศา ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางการเข้าสู่กึ่งกลางลดลง ทำให้มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อหลุมจุลภาคมีมุม 106 องศา ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางการเข้าสู่กึ่งกลางหลุมน้อยลงมาก ทำให้เซลล์บางส่วนไม่ถูกพัดพาารวมกันที่บริเวณก้นหลุมทรงกระบอก โดยเซลล์บางส่วนติดอยู่บนบริเวณผนังด้านข้าง ทำให้การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อลดต่ำลง ดังนั้นผลการศึกษาจึงบ่งชี้ว่าหลุมจุลภาคทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 90 องศา มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นด้วยว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มดีกว่าหลุมจุลภาคแบบอื่นอีกด้วย วัตถุประสงค์ที่สองคือการสร้างระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ต้นทุนต่ำ และรวดเร็ว โดยการสร้างแม่พิมพ์ด้วยการพิมพ์สามมิติด้วยเรซินสำหรับการพิมพ์สามมิติจะทำให้สร้างแม่พิมพ์ที่มีรูปร่างที่ซับซ้อนมากได้ แต่ขนาดที่เล็กสุดยังจำกัดอยู่ และความแข็งแรงทางกล และความทนทานต่อความร้อนไม่ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม วิธีการที่พัฒนาที่ขึ้นสามารถใช้งานได้ดีในการหล่อสารพอลิไดเมทิลซิโกลเซนสำหรับระบบของไหลจุลภาค ซึ่งใช้งานอย่างมากในงานวิจัยทางด้านนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิศวกรรมเครื่องกล

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6170373321 : MAJOR MECHANICAL ENGINEERING

KEYWORD: Microfluidic system; Microwells; 3D culture; Cells-spheroid

Thanapat Chunfong : The effect of the tip angles of the diamond microwell on cell-spheroid formation. Advisor: Assoc. Prof. ALONGKORN PIMPIN, Ph.D.

This study has two main objectives. The first objective is to study the effects of the tip angle of diamond microwells on the spheroid formation with continuous flow. Three angles of attack to the flow direction such as acute (66 degree), equilateral (90 degree) and obtuse (106 degree) were investigated. Every microwell was closely placed in order to reduce the flat surface between neighboring microwells where the cell adsorption would be occurred. The microwells were in pyramidal diamond shape, and there was a cylindrical opening placed at the bottom of each microwell by which the total depth of the microwells was around 550 μm . In this study, the flow rate was at 10 $\mu\text{l/hr}$ where the spheroid formation was achieved. With this microwell's shape, the flow was deviated toward the center of the microwells, and swept cells to the cylindrical opening. If microenvironments are proper, the cell spheroid would be formed. In the case of microwells with acute angle, the relatively strong recirculation, however, occurred and the process of the cell spheroid formation would be disturbed. As a result, the cell spheroid was hardly formed. For equilateral microwells, the recirculation reduced, and more cell spheroids were observed. Nevertheless, in the microwells with obtuse angle, the tip angle initiated relatively weak flow recirculation toward the center of microwell. Some cells would not be swept down, and aggregated at the bottom. Then, the cell spheroid was less occurred. Among tested conditions, both computational and experimental investigations suggested that the equilateral microwells were the most suitable one for cell spheroid formation. Moreover, it also showed slightly higher viability rate of the cells than the others. The second objective is to create a low-cost and fast fabrication of the microfluidic chip. Three-dimensional printing technique was employed to make a casting mold for microfluidic chip's material. With this technique, complex shapes are easily made. However, we found some limitations on printing resolution, mechanical strength and thermal robustness. Despite of those, the method could work well for casting Polydimethylsiloxane (PDMS) for the on-going projects of the microfluidic system.

Field of Study: Mechanical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากการได้รับความช่วยเหลือในหลายๆด้านจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อลงกรณ์ พิมพ์พิณ ซึ่งคอยมอบความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยตั้งแต่แรกเริ่มจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา จนนำไปสู่การวางแผนขั้นตอนการวิจัยได้อย่างครบถ้วนและราบรื่นเสมอมา

ขอกราบขอบคุณ ผศ.ดร. วีระยุทธ ศรีธรรมาภิชา อ.ดร. การุ จงศิริภิญโญ และ รศ.ดร. เวชพงศ์ ชูติชูเดช ที่คอยสละเวลาเป็นกรรมการสอบและคอยให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับงานวิจัย ส่งผลให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และ ผศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราศานิต ที่ให้การสนับสนุนเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์การทดลอง สิ่งอำนวยความสะดวกอันเป็นประโยชน์ ต่อการดำเนินการจัดทำงานวิจัยฉบับนี้จึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นายเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ ที่คอยช่วยเหลือ และแนะนำเกี่ยวกับการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์ และ นายนายวัชรพล มีดี ที่คอยให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้งานโปรแกรม COMSOL Multiphysics® version 5.3 นอกจากนี้ขอขอบคุณรุ่นพี่ในคณะวิศวกรรมศาสตร์ที่คอยแนะนำเทคนิคเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์การทดลองในห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงคอยสร้างเสียงหัวเราะและความสนุกสนานอันเป็นบรรยากาศที่ดีต่อผู้ทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา และ มารดา ผู้คอยอบรมสั่งสอนผู้วิจัยด้วยความรักและความอบอุ่น คอยชี้แนะให้แง่คิดเกี่ยวกับการใช้ชีวิต การวิเคราะห์และแก้ไขปัญหา คอยประสิทธิ์ประสาทความรู้พื้นฐานที่สำคัญอันเป็นส่วนหนึ่งของความสำเร็จของงานวิจัยในครั้งนี้ อีกทั้งยังคอยมอบความห่วงใย ความหวังดีและเป็นกำลังใจสำคัญต่อผู้วิจัยเสมอมา

ธนภัทร ชุนฟัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ญ	ญ
สารบัญภาพ.....ฎ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....1	1
1.1. ประวัติความเป็นมาและความสำคัญ.....1	1
1.2. วัตถุประสงค์ของปริญญานิพนธ์.....6	6
1.3. ขอบเขตการศึกษา.....7	7
1.3.1 การออกแบบหลุมจุลภาค.....7	7
1.3.2 การจำลองการไหล.....8	8
1.3.2 การขึ้นรูปชิ้นงาน.....8	8
1.3.3 การออกแบบการทดลอง.....9	9
1.3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ และการรอดชีวิตของเซลล์..... 10	10
1.4. ระเบียบขั้นตอนของงานวิจัย..... 11	11
1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 11	11
1.6. แผนการดำเนินงาน..... 12	12
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม..... 13	13
2.1. กลไกการไหลภายในหลุมจุลภาค..... 13	13
2.2. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์รูปแบบต่าง ๆ..... 15	15

2.2.1 การเลี้ยวในหลุมจุลภาคแบบสภาวะสถิต (Static)	15
2.2.2 การเพาะเลี้ยวเซลล์ในหลุมจุลภาคแบบพลวัต (Dynamic).....	19
2.2.3 การศึกษาการกระจายตัวของออกซิเจน และกลูโคสในหลุมจุลภาค	24
2.3 กระบวนการสร้างระบบของไหลจุลภาค.....	26
2.4 สรุปผล.....	27
บทที่ 3 กระบวนการจำลองการไหล และการออกแบบ.....	33
3.1 การออกแบบระบบของไหลจุลภาค	33
3.1.1 รูปทรงเรขาคณิตหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด	33
3.1.2 การกำหนดคุณสมบัติ.....	35
3.1.3 การกำหนดเงื่อนไข.....	35
3.1.3.1 การกำหนดเงื่อนไขการไหลแบบราบเรียบ	36
3.1.3.2 การกำหนดเงื่อนไขของการคำนวณความเข้มข้นออกซิเจน	37
3.1.3.3 การกำหนดเงื่อนไขของการคำนวณความเข้มข้นกลูโคส	38
3.1.3.4 การกำหนดเงื่อนไขการตั้งค่าเมช.....	39
3.2 ผลการจำลองการไหล.....	40
3.2.1. การเคลื่อนที่ของของไหลผ่านตำแหน่งต่าง ๆ ของหลุม.....	40
3.2.2 การกระจายตัวความเร็ว และการหมุนที่ระนาบต่าง ๆ	43
3.2.2.1 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบต่าง ๆ	43
3.2.2.2 การกระจายตัวการหมุนที่ตำแหน่งระนาบต่าง ๆ	47
3.2.2.3 แรงเฉือนของของไหลที่กระทำบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	55
3.3 ผลการกระจายตัวของความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส และออกซิเจน	60
3.3.1 ผลการจำลองการกระจายตัวความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส	60
3.3.1.1 การกระจายความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส.....	60
3.3.1.2 ปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	62

3.3.1.3 ความเข้มข้นกลูโคสเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบความลึกต่าง ๆ	63
3.3.2 ผลการจำลองการกระจายความเข้มข้นของออกซิเจน	66
3.3.2.1 การกระจายความเข้มข้นของออกซิเจน	66
3.3.2.2 ปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	68
3.3.2.3 ความเข้มข้นออกซิเจนเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบความลึกต่าง ๆ	69
3.3.3 ผลกระทบของอัตราการไหลของของไหลเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น 100 เท่า.....	72
3.4 สรุปผลการจำลองการไหล.....	75
บทที่ 4 ผลการทดลอง	76
4.1 การสร้างแม่พิมพ์ของระบบของไหลจุลภาค.....	76
4.2 การสร้างระบบของไหลจุลภาค.....	80
4.3 เงื่อนไขการทดลอง.....	83
4.4 ขั้นตอนการทดลอง	83
4.5 การเก็บผลการทดลอง.....	87
4.6 ผลการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cells spheroid).....	88
4.7 จำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	94
4.8 การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	95
4.9 การรอดชีวิตของเซลล์	96
4.10 สรุปผลการทดลอง.....	98
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	99
5.1 สรุปงานวิจัย	99
5.2 อภิปรายและข้อเสนอแนะ	101
บรรณานุกรม.....	102
ภาคผนวก ก การคำนวณจำนวนเซลล์ต่อหลุม	106
ภาคผนวก ข อุปกรณ์สำหรับการขึ้นรูประบบของไหลจุลภาค.....	110

ภาคผนวก ค อุปกรณ์สำหรับการทดลอง	112
ภาคผนวก ง การคำนวณความเร็ว.....	115
ภาคผนวก จ การคำนวณความเข้มข้นของสารอาหาร.....	119
ภาคผนวก ฉ การคำนวณตำแหน่งมุมรอบ ๆ กลุ่มเซลล์.....	126
ภาคผนวก ฌ การตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์.....	129
ภาคผนวก ฎ จำนวนหลุมจุลภาคที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	131
ภาคผนวก ฏ การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยค่าดูดกลืนแสง	132
ประวัติผู้เขียน.....	137



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แผนการดำเนินงานวิทยานิพนธ์.....	12
ตารางที่ 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการสร้างระบบของไหลจุลภาคด้วยเทคนิคต่าง ๆ.....	29
ตารางที่ 3 เงื่อนไขการจำลองการไหล	35
ตารางที่ 4 เงื่อนไขการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์	83
ตารางที่ 5 จำนวนของเซลล์ไฟโบบลาสต์ของแต่ละการทดลอง	91
ตารางที่ 6 การนำเซลล์เข้าสู่ระบบของไหลจุลภาค และการเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 3 วัน.....	93
ตารางที่ 7 จำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในหลุมจุลภาคหลังเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน.....	94
ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และตาย รวมไปถึงอัตราการรอดชีวิต	97
ตารางที่ 9 ตารางพารามิเตอร์สำหรับการคำนวณความเร็ว.....	116
ตารางที่ 10 ค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับการคำนวณการใช้กลูโคส และออกซิเจน	119
ตารางที่ 11 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 1.....	129
ตารางที่ 12 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 2.....	129
ตารางที่ 13 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 3.....	130
ตารางที่ 14 จำนวนหลุมที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ.....	131

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 การเปลี่ยนไปยังเซลล์เป้าหมายชนิดต่าง ๆ	1
รูปที่ 1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ ก) Hanging drop ข) Forced-floating method ค) Matrices and scaffolds ง) Agitation-based approaches และ จ) Microfluidic system.....	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้าง และการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ: (ก)–(ค) กระบวนการสร้าง และ (ง) โครงสร้างของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ	4
รูปที่ 1.4 กระบวนการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในหลุมเลี้ยงเซลล์	5
รูปที่ 1.5 ลักษณะขนาดหลุมจุลภาคที่มุมที่แตกต่างกัน ก) ภาพรวมของระบบของไหลจุลภาค ข) หลุมจุลภาคมุมแหลม (66 องศา) ค) มุมเท่า (90 องศา) และ ง) มุมป้าน (106 องศา).....	8
รูปที่ 1.6 กรรมวิธีขึ้นรูปชิ้นงาน	9
รูปที่ 1.7 กระบวนการเลี้ยงเซลล์ของระบบของไหลจุลภาค	9
รูปที่ 1.8 การการตรวจสอบ (ก) การเจริญเติบโต และ (ข) การรอดชีวิตของเซลล์	10
รูปที่ 2.1 ลักษณะการไหลของของไหลผ่านหลุมจุลภาค	13
รูปที่ 2.2 การจำลองการไหล (ก) เส้นความเร็วเมื่อของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาครูปร่าง สามเหลี่ยมวงกลม และสี่เหลี่ยมจัตุรัส และ (ข) ผลกระทบของรูปร่างหลุมจุลภาคที่มีต่อการดักจับอนุภาค	14
รูปที่ 2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ EB จากเซลล์ต้นกำเนิดอินดิวิจิวส์พลูริโพเทนต์หนูที่เพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาคด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน.....	16
รูปที่ 2.4 ผลลัพธ์ของการสร้าง hMSC-spheroid ในหลุมแบบพีระมิดสี่เหลี่ยมคว่ำ และมีหลุมทรงกระบอกซ้อน.....	17
รูปที่ 2.5 รูปร่างของหลุมจุลภาคยังช่วยลดการสูญเสียเซลล์ (ก) ภาพรวมของหลุมจุลภาค (ข) เป็นภาพมุมมองด้านบน และ (ค) เป็นภาพตัดด้านข้างที่ระนาบ A (ง) การใส่เซลล์ลงหลุม (จ) Side and top views ของการสร้างกลุ่มเซลล์ในหลุมจุลภาค (ฉ) Side and top views ของการเจริญเติบโตของเซลล์.....	17

รูปที่ 2.6 จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันต่อหลุมในแม่พิมพ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 400 ไมโครเมตร
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน A) 200 B) 500 C) 1000 และ D) 2000 เซลล์ต่อหลุม 18

รูปที่ 2.7 แสดงการใส่เซลล์ลงหลุมจุลภาค(ก) รูปร่างของหลุมจุลภาค(ข) การใส่เซลล์ลงหลุมจุลภาค
(ค) การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อภายในหลุมจุลภาค 19

รูปที่ 2.8 ผลของการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และขนาดเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ 20

รูปที่ 2.9 การเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ ด้วยวิธี Conventional และ 3D-LOC (ก) วิธีการสร้างระบบของไหล
จุลภาคแบบ 3D-LOC (ข) การเปรียบเทียบการใส่เซลล์ลงหลุมระหว่าง Conventional กับ 3D-LOC
..... 22

รูปที่ 2.10 การรวมกลุ่มของ Tic และ 253G1 Human induced pluripotent stem cells (ก)
ในช่วงการเลี้ยง 2D แบบสถิติที่ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์ (ข) ในช่วงการเลี้ยง 3D แบบ
สถิติที่ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์ (ค) ในช่วงการเลี้ยง 3D แบบพลวัตที่ 24 และ 72 ชั่วโมง
หลังจากใส่เซลล์ 23

รูปที่ 2.11 แผ่นฝังของ Skin chip กินชิพ (a) มุมมองด้านบน (b) มุมมองด้านข้าง แผ่นฝังของ Skin
chip ที่มีการแก้ไขช่องทางการไหลแล้ว (c) มุมมองด้านบน (d) มุมมองด้านข้าง (e) ภาพวาด 3 มิติ
Skin chip ที่ประกอบกัน (f) การวาดภาพ 3 มิติของ Skin chip ที่แยกชิ้นส่วน..... 24

รูปที่ 2.12 (ก) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน (ข) ผลการจำลองความ
เข้มข้นของกลูโคสที่เวลาต่าง ๆ ในการเลี้ยงด้วยสภาวะที่ต่างกัน..... 26

รูปที่ 3.1 โมเดลจำลองการไหลเรขาคณิตหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดสำหรับ (ก) มุม
แหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) และ (ค) มุมป้าน (106 องศา)..... 34

รูปที่ 3.2 การกำหนดเงื่อนไขขอบเขตในการจำลองการไหล 37

รูปที่ 3.3 การกำหนดเงื่อนไขขอบในการคำนวณความเข้มข้นออกซิเจน 38

รูปที่ 3.4 การกำหนดเงื่อนไขขอบในการคำนวณความเข้มข้นกลูโคส..... 39

รูปที่ 3.5 รูปแบบความละเอียดของการตีเมช โดยเส้นสีแดงของภาพขยายทางด้านขวาเป็นส่วนของ
..... 40

รูปที่ 3.6 แสดงผลการจำลองการไหลของเส้นความเร็วตำแหน่งกึ่งกลางหลุม ($X = 0$) ของหลุมจุลภาค
(ก) มุมแหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) (ค) มุมป้าน (106 องศา)..... 41

รูปที่ 3.7 โครงสร้างการไหลเมื่อของไหลเคลื่อนที่ผ่านหลุมจุลภาคมุม (ก) มุมแหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) (ค) มุมป้าน (106 องศา)..... 42

รูปที่ 3.8 ตำแหน่งบนระนาบ XY เพื่อวิเคราะห์ผลการจำลองที่ความลึก 0 (ปากหลุมผนังเอียง), 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร..... 43

รูปที่ 3.9 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดบนระนาบ XY ที่ช่องหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (ฉ) 0 มิลลิเมตร 46

รูปที่ 3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคกับระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z = 0 มิลลิเมตร..... 47

รูปที่ 3.11 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z..... 48

รูปที่ 3.12 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.12 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z..... 50

รูปที่ 3.13 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.25 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z..... 51

รูปที่ 3.14 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.12 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z..... 53

รูปที่ 3.15 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.44 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z..... 54

รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ยของค่าสมบูรณการหมุนวนของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z = 0 มิลลิเมตร..... 55

รูปที่ 3.17 แสดงรูปร่างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในการวิเคราะห์ค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์..... 56

รูปที่ 3.18 ค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360° 57

รูปที่ 3.19 เปรียบเทียบค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ ที่ระนาบ ZY ระหว่างหลุมจุลภาคตำแหน่งด้านหน้า และด้านหลัง รูปร่างหลุมจุลภาคสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม (ก) 66 (ข) 90 และ (ค) 106 องศา..... 59

รูปที่ 3.20 การกระจายตัวของปริมาณกลูโคสภายในหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม ก) 66 ข) 90 และ ค) 106 องศา.....	61
รูปที่ 3.21 ปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360°.	62
รูปที่ 3.22 ปริมาณกลูโคสบนระนาบ XY ที่ของหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (ฉ) 0 มิลลิเมตร.....	65
รูปที่ 3.23 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความเข้มข้นปริมาณกลูโคสเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z = 0 มิลลิเมตร.....	66
รูปที่ 3.24 การกระจายตัวของออกซิเจนผ่านหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม ก) 66 ข) 90 และ ค) 106 องศา.....	67
รูปที่ 3.25 ปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360°	68
รูปที่ 3.26 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดบนระนาบ XY ที่ของหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (ฉ) 0 มิลลิเมตร	71
รูปที่ 3.27 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความเข้มข้นออกซิเจนเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z=0 มิลลิเมตร	72
รูปที่ 3.28 การกระจายตัว ก) สารอาหารกลูโคส ข) ออกซิเจน บริเวณกึ่งกลางหลุมที่อัตราการไหล 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง	73
รูปที่ 3.29 ปริมาณความเข้มข้น ก) สารอาหารกลูโคส และ ข) ออกซิเจน บริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ คล้ายเนื้อเยื่อที่อัตราการไหล 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง.....	74
รูปที่ 4.1 ลักษณะแม่พิมพ์ตามมุมต่าง ๆ ก) แม่พิมพ์หลุมจุลภาคมุมปากหลุม 66 ข) 90 และ ค) 106 องศา	76
รูปที่ 4.2 ขนาดหลุมจุลภาคจริงหลังจากการพิมพ์สามมิติสำหรับหลุมจุลภาคทรงพีระมิดมุม (ก) 66 77	
รูปที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางทรงกระบอกของแม่พิมพ์จริง	78
รูปที่ 4.4 วัดขนาดแม่พิมพ์ (ก) ค่าความหนาของแม่พิมพ์ที่ และ (ข) ค่าความกว้างของชั้นบันไดที่เกิดขึ้นหลังการพิมพ์สามมิติ	79

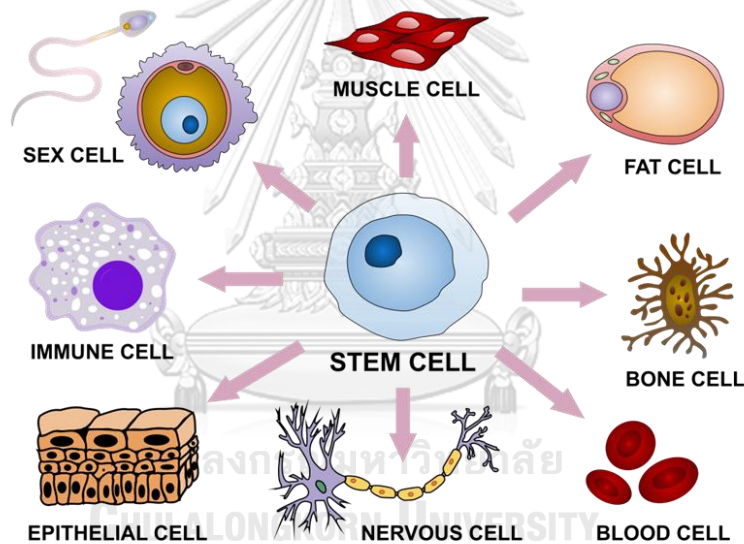
รูปที่ 4.5 การเตรียมพอลิเมอร์เหลว PDMS การผสมระหว่าง PDMS กับ Curing agent.....	80
รูปที่ 4.6 การดูฟองอากาศด้วยเครื่องอบสุญญากาศ.....	80
รูปที่ 4.7 การขึ้นรูประบบของไหลจุลภาค (ก) แม่พิมพ์ 3 มิติ (ข) เท PDMS ลงในแม่พิมพ์ (ค) ลอก PDMS ลอกจากแม่พิมพ์ (ง) การประกบชิ้นงานระหว่าง PDMS กับ PDMS เข้าหากัน.....	82
รูปที่ 4.8 ระบบของไหลจุลภาคถูกแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS.....	83
รูปที่ 4.9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไฟโบรบลาสต์.....	84
รูปที่ 4.10 การนับจำนวนเซลล์ ก) การย้อมสีเซลล์ และ ข) จำนวนเซลล์ที่อยู่ใน Hemocytometer.....	85
รูปที่ 4.11 ติดตั้งการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ (ก) นำเซลล์เดี่ยวเข้าไปในระบบของไหลจุลภาค (ข) ต่อสายยาง และหลอดฉีดยาเข้ากับระบบของไหลจุลภาค และ (ค) ติดตั้ง Syringe pump กับระบบของไหลจุลภาค.....	87
รูปที่ 4.12 ตัวอย่างภาพถ่ายหลังจากการใส่เซลล์ (ก) โฟกัสบริเวณรอบ ๆ ทรงกระบอก (ข) ภาพบริเวณทรงกระบอกกลาง.....	87
รูปที่ 4.13 การดักจับเซลล์ในเวลาต่าง ๆ.....	88
รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ที่ถูกดักจับภายในหลุมจุลภาคมุม (ก) 66 (ข) 90 และ (ค) 106 องศา.....	90
รูปที่ 4.15 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันแรกของหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา.....	92
รูปที่ 4.16 แสดงจำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกิดขึ้น.....	95
รูปที่ 4.17 แสดงผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเฉลี่ย.....	96
รูปที่ 4.18 แสดงผลการรอดชีวิตของเซลล์.....	98

บทที่ 1

บทนำ

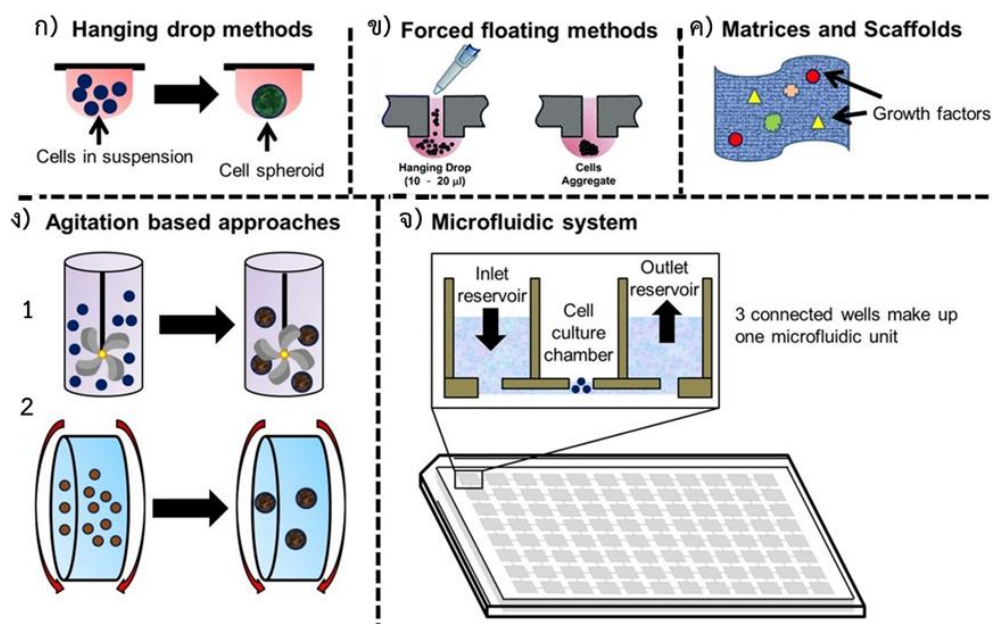
1.1. ประวัติความเป็นมาและความสำคัญ

แนวทางการรักษาโรคด้วยการปลูกถ่ายอวัยวะเพื่อพยายามที่จะซ่อมแซม แทนที่หรือสร้างเนื้อเยื่อของอวัยวะที่เสียหายจากการบาดเจ็บหรือโรคต่าง ๆ ได้ถูกพัฒนา ค้นคว้า และ วิจัยมาอย่างต่อเนื่องบนพื้นฐานความรู้สมัยใหม่เชื่อมโยงวิทยาการมากมาย เช่น ชีววิทยาระดับ เซลล์ เคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ และแพทยศาสตร์ เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) จึงเป็นแนวโน้มสำคัญที่อาจจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว โดยเริ่มจากการนำเซลล์ต้นกำเนิดของผู้ป่วย หรือจากผู้บริจาคสายพันธุ์เดียวกันมาทำการเพาะเลี้ยงจนกลายเป็นเซลล์เป้าหมาย จากนั้นปลูกถ่ายเซลล์เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยเพื่อทดแทนเซลล์เดิมที่เสียหายจากการบาดเจ็บหรือโรคต่าง ๆ ดังรูป 1.1 [1]



รูปที่ 1.1 การเปลี่ยนไปยังเซลล์เป้าหมายชนิดต่าง ๆ

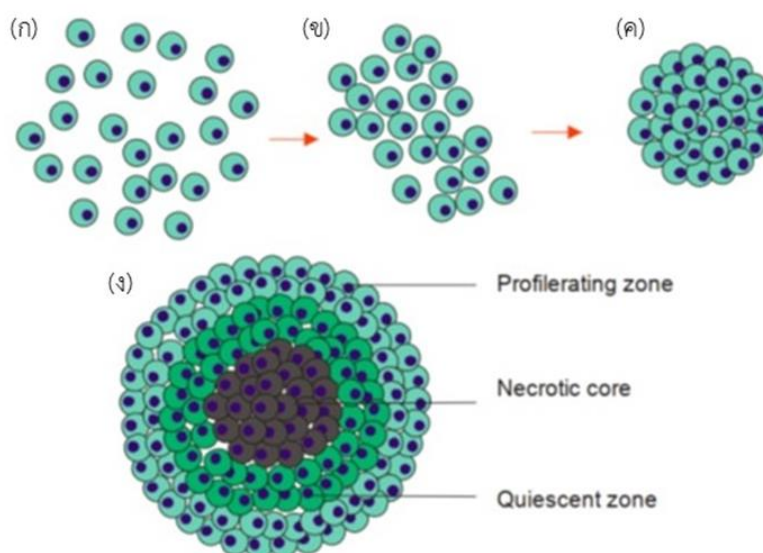
การเพาะเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญในวงการวิศวกรรมทางการแพทย์ และสาขาทางชีววิทยาเกี่ยวข้อง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องควบคุมปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสะอาด ความปลอดภัย ความเข้ากันได้ในระดับเซลล์ เป็นต้น โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ จะแบ่งออกเป็น 5 วิธีคือ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Hanging drop, Forced-floating method, Matrices and scaffolds, Agitation-based approaches and Microfluidic system ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ ก) Hanging drop ข) Forced-floating method ค) Matrices and scaffolds ง) Agitation-based approaches และ จ) Microfluidic system

การเพาะเลี้ยงแบบ Hanging drop เป็นการเพาะเลี้ยงโดยเริ่มจากนำเซลล์ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย (Cells suspension) หยดลงบนจาน (Petri dish) หลังจากนั้นคว่ำจานทดลองลง ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลกเซลล์จะค่อย ๆ มารวมตัวกันสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกิดขึ้น ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือ ใช้งานง่าย ต้นทุนต่ำ และมีการศึกษากันมาอย่างยาวนานทำให้มีผลการทดลองในการเปรียบเทียบเป็นจำนวนมาก ข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้คือ อาหารมีปริมาณที่จำกัด อาจเกิดการปนเปื้อนจากภายนอกในขั้นตอนการเปลี่ยนอาหาร และในขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารยังใช้เวลานาน ดังรูปที่ 1.2 ก) การเพาะเลี้ยงแบบ Force - floating method เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่พัฒนามาจาก Hanging drop แต่หลักการการเพาะเลี้ยงเหมือนกัน Hanging drop โดยเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเป็นช่องแคบ ซึ่งวิธีนี้ช่วยให้เก็บกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายขึ้น และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ซ้ำได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนจานหลายครั้ง ดังรูปที่ 1.2 ข) การเพาะเลี้ยงแบบ Matrices and Scaffolds เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้โครงสร้างที่มีส่วนประกอบเป็นเส้นใยที่เรียกว่า Scaffolds มาเป็นแกนกลางเพื่อให้เซลล์มายึดเกาะแล้วสร้างเป็นก้อนกลมเรียกว่ากลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cell spheroid) ดังรูป 1.2 ค) ข้อเสียของวิธีนี้คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้องใช้อุปกรณ์ที่เฉพาะ และอาจยุ่งยากในการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงแบบ Agitation-based approaches เป็นการเพาะเลี้ยงโดยการนำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในภาชนะ

ในขณะที่ทำให้สารแขวนลอยเคลื่อนที่ด้วยการหมุนวนคงที่ ด้วยเหตุนี้เซลล์จึงไม่ยึดติดกับผนัง และเซลล์จะสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์เกิดขึ้น การเลี้ยงเซลล์แบบนี้จะแบ่งเป็น 2 แบบคือ 1) Spinner flask bioreactors ประกอบด้วยภาชนะและใบพัดกวนเพื่อกักเก็บ และกวนสารแขวนลอยที่มีเซลล์อยู่อย่างต่อเนื่อง การเคลื่อนที่ของของเหลวในการเพาะเลี้ยงช่วยในการให้สารอาหารแก่เซลล์ และการกำจัดของเสียที่เกิดขึ้น ข้อเสียของ Spinner flask คือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์เนื่องจากแรงเฉือนของแท่งกวนทำให้ต้องใช้อาหารเลี้ยงจำนวนมาก และความไม่เท่ากันของขนาดของกลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้น ดังรูป 1.2 ง (1) แต่ปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในหลุมจุลภาคก่อน หลังจากนั้นถ่ายโอนไปยัง Spinner flask bioreactors 2) Rotating cell culture bioreactors มีหลักการทำงานของระบบนี้จะคล้ายกับ Spinner flask bioreactors แต่ภาชนะทั้งหมดจะถูกหมุนแทนการใช้แท่งกวนหรือก้าน เริ่มแรกเมื่อเซลล์ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยเซลล์บรรจุในภาชนะเพาะเลี้ยงถูกหมุนด้วยความเร็วต่ำ เมื่อเซลล์เริ่มก่อตัวเป็นก้อนใหญ่ขึ้นความเร็วจะเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาให้กลุ่มเซลล์คงสภาพกลุ่มเซลล์ไว้ 1.2 ง (2) วิธีนี้จะมีแรงเฉือนที่กระทำกับเซลล์ต่ำกว่า Spinner flask bioreactors แต่ความไม่เท่ากันของขนาดของกลุ่มเซลล์จะเกิดขึ้นเช่นกัน สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์วิธีสุดท้ายคือการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาค ซึ่งมีขั้นตอนคล้ายกับวิธี Hanging drop โดยนำเซลล์เข้าระบบ เซลล์จะตรึงกันภายในหลุมจุลภาค หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มจับตัวกันสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับวิธี Hanging drop ข้อดีของวิธีนี้คือ ควบคุมขนาดของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้ และสามารถสร้างระบบที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ตลอดระยะเวลาเพื่อลดการปนเปื้อนจากภายนอกในขั้นตอนการเปลี่ยนอาหาร ข้อจำกัดของวิธีนี้คืออุปกรณ์ค่อนข้างซับซ้อน และขั้นตอนการผลิตต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะอีกด้วย ดังรูปที่ 1.2 จ) [2]

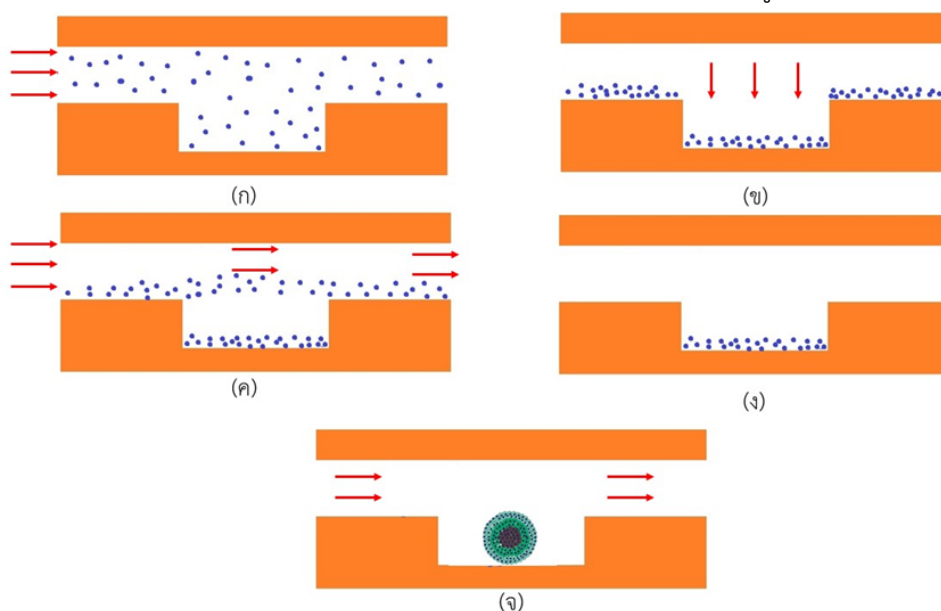


รูปที่ 1.3 โครงสร้าง และการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ: (ก)–(ค) กระบวนการสร้าง และ (ง) โครงสร้างของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cell-Spheroid) คือการรวมกลุ่มกันของเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจะสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ และสร้างทรงกลมเป็นก้อนสามมิติ ดังรูปที่ 1.3 การสร้างสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ เช่น จากเซลล์ต้นกำเนิดกล้ามเนื้อหัวใจไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนั้น สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมดังกล่าวมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของวัสดุที่นำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth factor) รวมทั้งแรงเฉือนที่เกิดจากการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย หากต้องการนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ไปใช้รักษาผู้ป่วยจริง การเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นจำเป็นต้องมีระบบที่สามารถเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดแบบสามมิติบนอนุภาคขนาดไมครอนเพื่อให้สามารถนำไปใช้งานได้ทันที ดังนั้นระบบของไหลจุลภาคที่สามารถทำหน้าที่ดังกล่าวจึงเป็นอุปกรณ์สำคัญที่ต้องพัฒนาขึ้นแต่วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ บนอนุภาคขนาดไมครอน สำหรับการเลี้ยงแบบสภาวะสถิต ด้วยวิธี Hanging drop นั้น มีข้อจำกัดคือ อาหารที่ใช้เลี้ยงไม่ได้ถูกแทนที่ด้วยอาหารใหม่ตลอดเวลา และไม่มีแรงเฉือนที่เกิดจากไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สามารถไปกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตามที่ต้องการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system) ด้วยการเลี้ยงแบบพลวัต (Dynamic) เป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยระบบของไหลจุลภาคถูกออกแบบมาสำหรับการสร้างกลุ่มก้อนเซลล์หรือที่เรียกว่ากลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cells spheroid) เนื่องจากมีความยืดหยุ่นในการออกแบบซึ่งสามารถปรับให้เข้ากับความต้องการของเซลล์แต่ละชนิด สามารถควบคุมเงื่อนไขการทดลองได้ง่าย [3] และการเพาะเลี้ยงโดยใช้หลุมเลี้ยงเซลล์ (Microwells)

เพื่อใช้ในการดักจับเซลล์ต้นกำเนิดนำไปสู่การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อต่อไป สำหรับการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเริ่มจากนำเซลล์แขวนลอย (Cell suspension) นำเข้าระบบของไหลจุลภาค ดังรูปที่ 1.4 (ก) เซลล์ใช้เวลาหลายนาทีกในการสะสมบนพื้นหลุมเลี้ยงเซลล์ และพื้นของช่องทางการไหล รูปที่ 1.4 (ข) ควรล้างเซลล์ส่วนเกินที่ไม่ได้อยู่ในหลุมเลี้ยงเซลล์ ออกจากชิปเพื่อหลีกเลี่ยงการอุดตันในช่องการไหล รูปที่ 1.4 (ค) หลังจากนั้นเซลล์เริ่มเกาะติดกันเป็นรูปทรงกลม รูปที่ 1.4 (ง) และให้เซลล์เจริญเติบโตต่อไปด้วยการใส่อาหารเลี้ยงเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระยะ ๆ รูปที่ 1.4 (จ) [4]



รูปที่ 1.4 กระบวนการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในหลุมเลี้ยงเซลล์

การที่เซลล์สะสมบนพื้นของช่องทางการไหล ซึ่งเซลล์จะไม่ตกลงหลุมจำเป็นต้องล้างเซลล์ที่ไม่ลงหลุมออกจากระบบของไหลจุลภาคซึ่งเป็นสาเหตุทำให้การสูญเสียเซลล์แบบไม่จำเป็นเนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดบางชนิดมีจำนวนเซลล์ที่จำกัดหรือหาได้ยาก ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงต้องลดการสูญเสียเซลล์โดยการนำผนังของหลุมมาชิดติดกันทุกหลุมเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะ

ในอดีตเริ่มมีการศึกษาการเลี้ยงเซลล์แบบพลวัตมากขึ้น และพึ่งพาเทคนิคการสร้างระบบที่ใช้ต้นทุนที่สูง การใช้งานยังไม่แพร่หลาย และยังมีคำถามมากมายของชนิดเซลล์ที่ใช้ทดสอบ [5-8] การไหลของของไหลไม่เพียงแต่เป็นการนำอาหารไปให้เซลล์ และนำของเสียที่เกิดจากเซลล์ออกมา แต่ยังมีกระบวนการเชิงกลให้แก่เซลล์ในรูปแบบของแรงเฉือนอีกด้วย จึงช่วยทำให้เกิดการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตามที่ต้องการได้ดี

จากงานวิจัยของห้องปฏิบัติการที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในช่วงห้าปีที่ผ่านมา [9, 10] แสดงให้เห็นว่าหลุมจุลภาคสามารถรักษาความเร็วรอบกลุ่มเซลล์ให้มีความเร็วต่ำได้ และหากขอบของหลุมทำมุมปะทะกับการไหลจะมีโครงสร้างการไหลที่มีลักษณะเฉพาะตัว และช่วยให้เซลล์เจริญเติบโต

ได้ดี ดังนั้นผู้วิจัยได้เลือกใช้อาเรย์ของหลุมจุลภาครูปทรงข้าวหลามตัด เนื่องจากรูปร่างหลุมแบบนี้สามารถนำหลุมแต่ละหลุมมาวางชิดติดกันเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะหรือการสูญเสียเซลล์ลงได้ [11] และมุมปะทะด้านหน้ายังสร้างโครงสร้างการไหลที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาผลกระทบของมุมของหลุมจุลภาคต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อด้วยการเพาะเลี้ยงแบบพลวัต (Dynamic) ซึ่งเป็นระบบเลี้ยงเซลล์เป็นระบบปิด และมีการไหลของอาหารต่อเนื่อง เพื่อลดปัญหาสิ่งเจือปน ความไม่ต่อเนื่องของการศึกษา และความผิดพลาดในการทำงานของผู้ปฏิบัติงาน และช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการเลี้ยงเซลล์ที่อาจจะเหมาะสมมากขึ้นเมื่อต้องการผลิตกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเป็นปริมาณมาก นอกจากนั้นการเลี้ยงในรูปแบบนี้มีความคล้ายคลึงกับสิ่งที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมากกว่า โดยรูปร่างของหลุมจุลภาคนั้นเป็นทรงข้าวหลามตัด และมีทรงกระบอกซ้อนอยู่ตรงกลางซึ่งเป็นตำแหน่งของการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ รูปร่างหลุมดังกล่าวไม่ซับซ้อนมากจนเกินไป และหากขอบของหลุมทำมุมปะทะกับการไหลจะมีโครงสร้างการไหลที่มีลักษณะเฉพาะตัว มุมปะทะด้านหน้ายังสร้างโครงสร้างการไหลที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ [9] เมื่อมุมปะทะด้านหน้าแตกต่างกัน โครงสร้างการไหลของของไหลก็จะแตกต่างกันด้วยซึ่งจะส่งผลต่อการนำอาหารไปให้เซลล์บริเวณกันหลุม และเนื่องจากรูปร่างหลุมจุลภาครูปทรงข้าวหลามตัดสามารถนำหลุมแต่ละหลุมมาวางชิดติดกันเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะหรือการสูญเสียเซลล์ลงได้ สำหรับการผลิตแม่พิมพ์จะใช้การพิมพ์ 3 มิติด้วยวัสดุ Resin monomer เนื่องจากการพิมพ์ 3 มิติ นี้สามารถผลิตได้รวดเร็ว และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ จากการศึกษางานวิจัยที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษากลไกของของไหลที่กระทำต่อหลุมน้อยมากจึงจำเป็นต้องศึกษาหลุมสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดที่มีมุมต่างกันเพราะอาจจะมีปัจจัยบางอย่างที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงหรือไม่อย่างไร

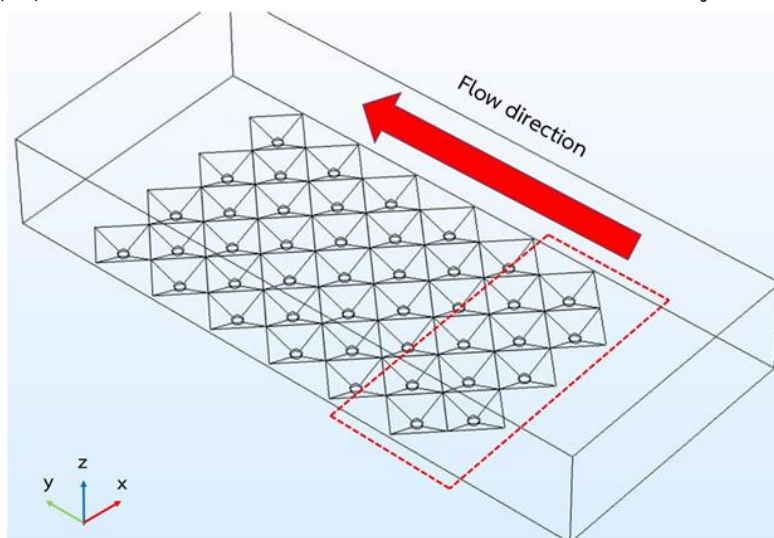
1.2 วัตถุประสงค์ของปริญญานิพนธ์

1. ศึกษาผลกระทบของมุมของหลุมจุลภาครูปทรงเรขาคณิตแบบสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดที่ส่งผลต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ
2. ศึกษาการออกแบบ และขึ้นรูปชิ้นงานอุปกรณ์การไหลจุลภาคขนาดเล็กที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนโดยใช้ต้นทุนต่ำ

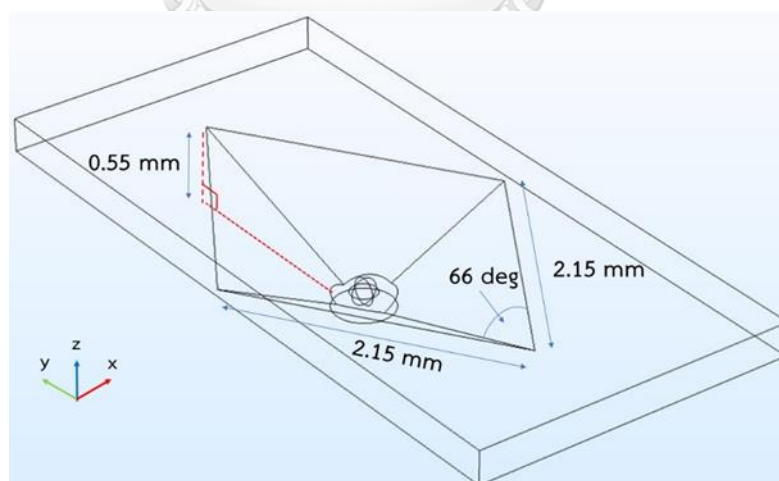
1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 การออกแบบหลุมจุลภาค

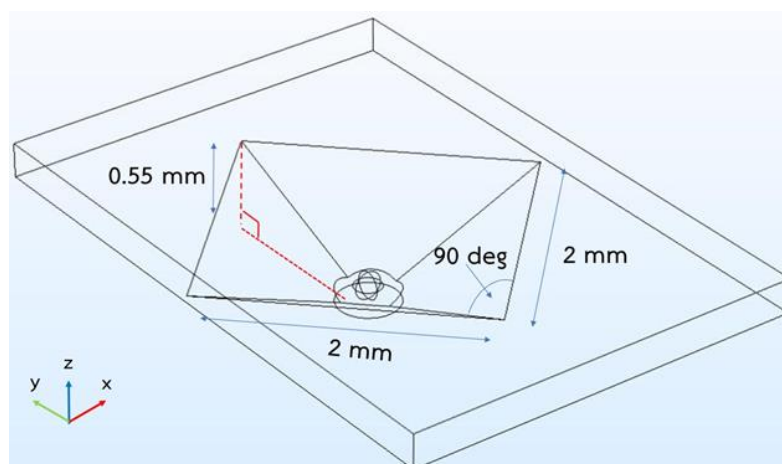
รูปร่างของหลุมหลุมจุลภาคที่ถูกนำมาใช้นั้นเป็นรูปพีระมิดสี่เหลี่ยมคี่ และมีความสูงของหลุมที่วางซ้อนกันอยู่ข้างใน โดยมีความลึกของหลุมอยู่ในช่วง 0.55 มิลลิเมตร มุมตำแหน่งปากหลุมจะมีทั้งหมด 3 รูปร่าง คือ มุมแหลม (66 องศา) มุมเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) โดยพื้นที่บริเวณปากหลุมจุลภาคคือ 4.22, 4 และ 3.69 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.5



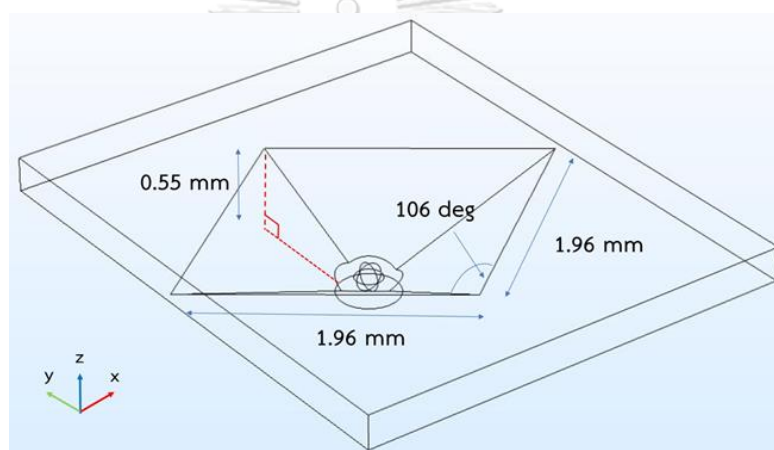
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 1.5 ลักษณะขนาดหลุมจุลภาคที่มีมุมที่แตกต่างกัน ก) ภาพรวมของระบบของไหลจุลภาค ข) หลุมจุลภาคมุมแหลม (66 องศา) ค) มุมเท่า (90 องศา) และ ง) มุมป้าน (106 องศา)

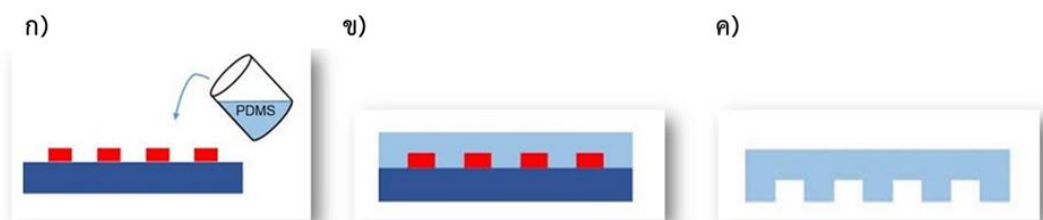
1.3.2 การจำลองการไหล

กลไกการไหลของของไหลผ่านหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดที่มีมุมแตกต่างกันคือ มุมแหลม มุมเท่า และมุมป้าน ถูกศึกษาผ่านโปรแกรมการไหลสำเร็จรูป COMSOL Multiphysics® version 5.3

1.3.2 การขึ้นรูปชิ้นงาน

กระบวนการขึ้นรูปชิ้นงานจะใช้กระบวนการ Soft lithography โดยเริ่มจากออกแบบแม่พิมพ์ตามลวดลายที่ต้องการด้วยโปรแกรมออกแบบทางวิศวกรรมหลังจากนั้นผลิตชิ้นงานที่ออกแบบมาด้วย

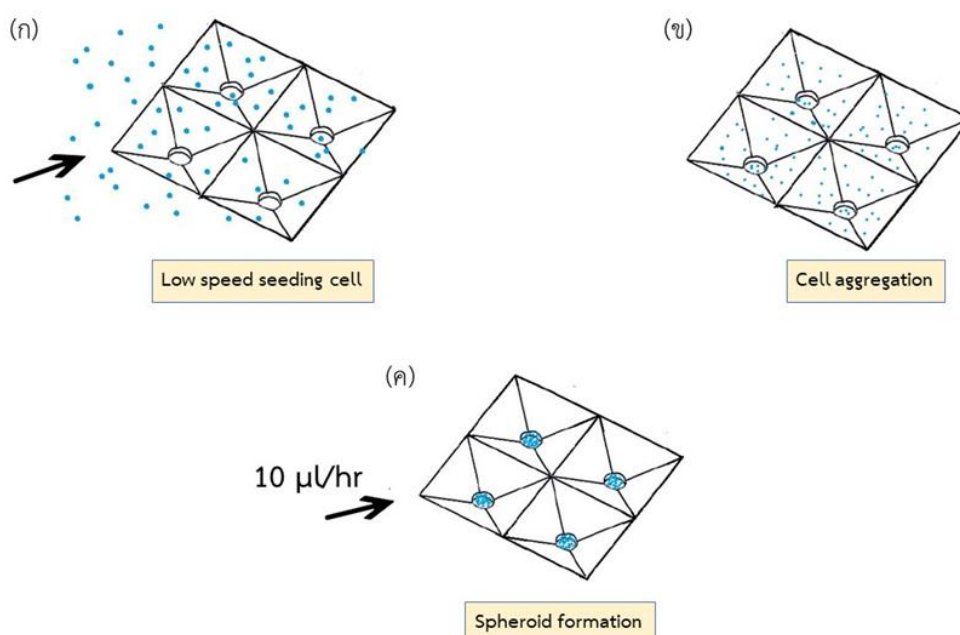
กรรมวิธีต่าง ๆ เช่น การพิมพ์ 3 มิติ การกัด CNC เป็นต้น เมื่อได้แม่พิมพ์ตามต้องการแล้วนำ Silicone elastomer (PDMS) เทลงบนแม่พิมพ์ ดังรูป 1.6 (ก) หลังจากนั้นชิ้นงานที่ถูกเท PDMS นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจน PDMS แข็งตัว ดังรูป 1.6 (ข) จากนั้นลอก PDMS ออกจากแม่พิมพ์จะได้ชิ้นงานตามที่ต้องการดังรูป 1.6 (ค)



รูปที่ 1.6 กรรมวิธีขึ้นรูปชิ้นงาน

1.3.3 การออกแบบการทดลอง

เริ่มจากการนำเซลล์เข้าสู่ระบบของไหลจุลภาคผ่านปิเปต ดังรูปที่ 1.7 (ก) หลังจากนั้นทิ้งให้เซลล์ตกลงหลุมดังรูปที่ 1.7 (ข) เมื่อเซลล์ลงหลุมเรียบร้อยแล้วเซลล์แต่ละเซลล์จะจับตัวกันเป็นก้อนแล้วสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไหลเข้าสู่ระบบของไหลจุลภาคผ่าน Syringe pump ที่อัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนอาหารใหม่อยู่ตลอดเวลา ดังรูปที่ 1.7 (ค)

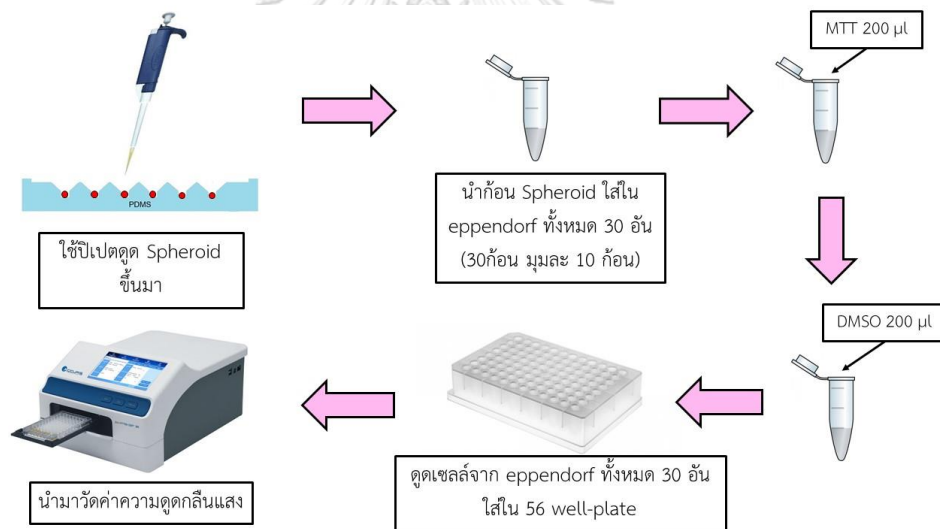


รูปที่ 1.7 กระบวนการเลี้ยงเซลล์ของระบบของไหลจุลภาค

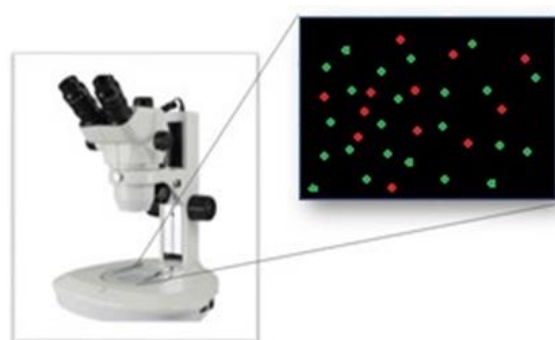
1.3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ และการรอดชีวิตของเซลล์

การตรวจการเจริญเติบโตของเซลล์ตรวจสอบได้จากค่าดูดกลืนแสง (Optical density or Absorbance) นำค่าดูดกลืนแสงมาหาจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโต หรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังรูป 1.8 (ก) สำหรับการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ จะนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาคเป็นระยะเวลา 3 วัน มาทำเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยการใส่สาร Trypsin เพื่อสลายพันธะระหว่างเซลล์ หลังจากนั้นนำมาทดสอบการมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ คือ Calcein Acetoxymethyl (Calcein AM) โดยในเซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์จะเรืองแสงเป็นสีเขียวจากการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ acetoxymethyl ester ด้วยเอนไซม์ Intracellular esterases และ Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) สำหรับเซลล์ที่ตาย เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายทำให้สีสามารถเข้าไปจับกับ DNA และเรืองแสงเป็นสีแดง หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ถูกย้อมแล้วมาหยดใส่ Glass slid แล้วถ่ายภาพเพื่อนำมานับการรอดชีวิต และวิเคราะห์ผลต่อไป ดังรูป 1.8 (ข)

(ก)



(ข)



รูปที่ 1.8 การการตรวจสอบ (ก) การเจริญเติบโต และ (ข) การรอดชีวิตของเซลล์

1.4 ระเบียบขั้นตอนของงานวิจัย

- ศึกษากระบวนการเลี้ยงเซลล์ลักษณะต่าง ๆ จากบทความที่เกี่ยวข้องจากนั้นทำการออกแบบชิ้นงานที่ใช้ในการทดลองเบื้องต้น เพื่อที่จะทราบถึงปัญหา ข้อจำกัด บางประการที่ทำให้เซลล์ตาย รวมถึงแนวทางการแก้ไขในการทดลองต่อไปในอนาคตซึ่งทำการทดลองโดยใช้เซลล์ไฟโบบลาสต์ ขนาด 10-15 ไมโครเมตร
- ออกแบบหลุมจุลภาคทั้ง 3 รูปร่าง หลังจากนั้นทำการจำลองการไหลของหลุมจุลภาคทั้ง 3 รูปร่าง คือ มุมแหลม (66 องศา) มุมเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา)
- ผลิตอุปกรณ์ และศึกษาการทดลองเบื้องต้นเพื่อแก้ไขปัญหาอาจเกิดกับการทดลองในอนาคต
- นำระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นทั้ง 3 รูปร่างมาทำการทดลองเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน โดยอัตราการไหลของของไหลคือ 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง และความหนาแน่นของเซลล์ไฟโบบลาสต์คือ 2,000 เซลล์/หลุม
- นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยวิเคราะห์จาก การสร้างกลุ่มเซลล์ จำนวนกลุ่มที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์ และการตายของเซลล์ นำผลการทดลองดังกล่าวมาเปรียบเทียบกัน และวิเคราะห์ว่ารูปร่างของหลุมจุลภาคแบบใดให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้เลี้ยงเซลล์ในอนาคตต่อไป
- สรุปงานวิจัย อภิปรายผล และจัดทำรูปเล่ม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบวิธี และกระบวนการผลิตระบบของไหลจุลภาคโดยใช้แม่พิมพ์ที่ทำจาก 3D Printer Resin ที่ต้นทุนในการผลิตต่ำ และรวดเร็วในการสร้างแม่พิมพ์
- ทราบถึงผลกระทบของมุมบริเวณปากหลุมต่อการเลี้ยงเซลล์ และสามารถเลือกหลุมจุลภาคที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้งานได้ในอนาคต

1.6 แผนการดำเนินงาน

ตารางที่ 1 แผนการดำเนินงานวิทยานิพนธ์

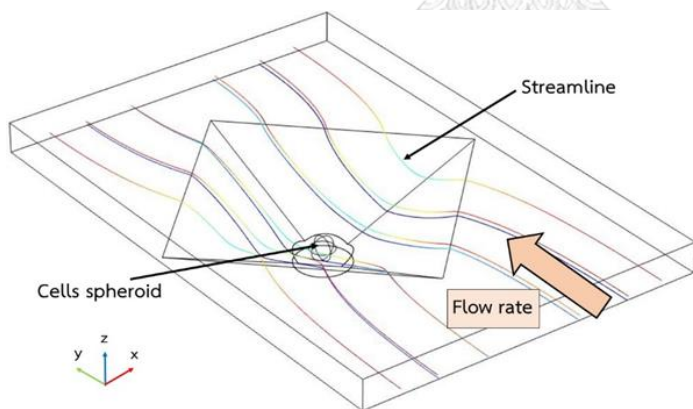
ขั้นตอนการดำเนินงาน	ช่วงเวลาการดำเนินงาน							
	พ.ศ. 2562					พ.ศ. 2563		
	ก.พ- มี.ค	เม.ษ- พ.ค	มิ.ย- ก.ค	ก.ย- ต.ค	พ.ย- ธ.ค	ม.ค- ก.พ	มี.ค- เม.ย	พ.ค- มิ.ย
ศึกษาระบบเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ								
ศึกษาการเตรียมการทดลอง และการ จำลองการไหล								
วิเคราะห์ผลการจำลองการไหล								
ออกแบบ และขึ้นรูปชิ้นงาน (แม่พิมพ์หลุม จุลภาคมุม 90 องศา)								
ออกแบบ และขึ้นรูปชิ้นงาน (แม่พิมพ์หลุม จุลภาคมุม 66 องศา)								
ออกแบบ และขึ้นรูปชิ้นงาน (แม่พิมพ์หลุม จุลภาคมุม 106 องศา)								
ทดลองการเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น								
วิเคราะห์ผลการทดลอง								
จัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์								

บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม

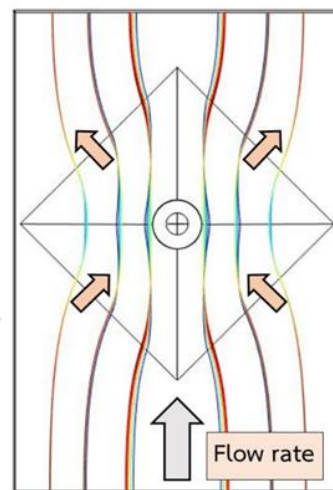
2.1 กลไกการไหลภายในหลุมจุลภาค

การเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาคนั้น ของไหลคืออาหารเลี้ยงเซลล์จะไหลผ่านเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวตลอดระยะเวลาที่เลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไหลผ่านจะนำสารอาหารไปให้เซลล์ ขณะเดียวกันของไหลจะนำเอาของเสียที่เกิดจากเซลล์ออกไปด้วยโดยกลไกการไหลผ่านหลุมแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ การไหลโดยการมุดตัวของของไหลจากด้านหน้าแล้วออกจากหลุมด้านหลัง ดังรูป 2.1ก ซึ่งการไหลลงสู่หลุมเป็นกลไกการไหลสำหรับการดักจับอนุภาคโดยตรง การไหลรูปแบบที่สองคือ การไหลบริเวณขอบหลุม เมื่อของไหลเคลื่อนที่มาชนตำแหน่งขอบหลุม ส่งผลให้ของไหลบริเวณขอบด้านหน้าของหลุมจุลภาคมีทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางหลุมซึ่งจะทำหน้าที่กักอนุภาคให้อยู่ตรงกลางภายในหลุม จากนั้นของไหลจะไหลออกหลุมในทิศทางออกจากกึ่งกลางหลุมบริเวณด้านหลังหลุม ดังรูป 2.1ข

ก)



ข)

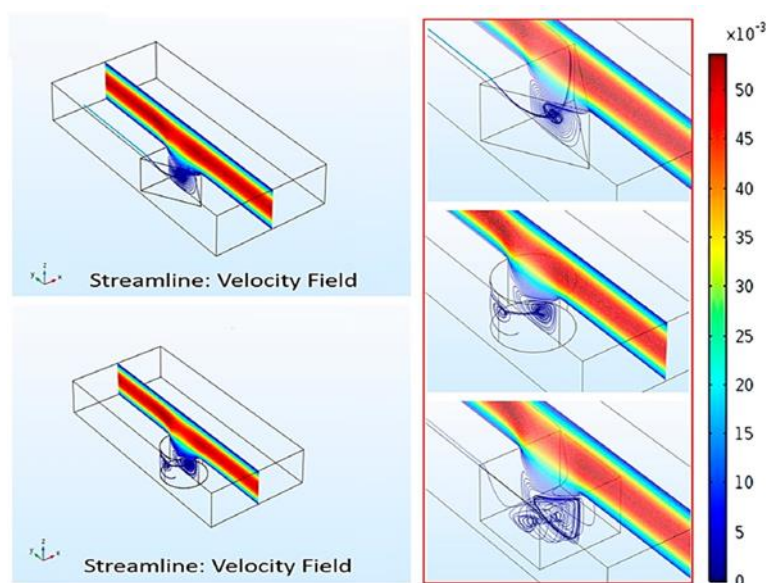


รูปที่ 2.1 ลักษณะการไหลของของไหลผ่านหลุมจุลภาค

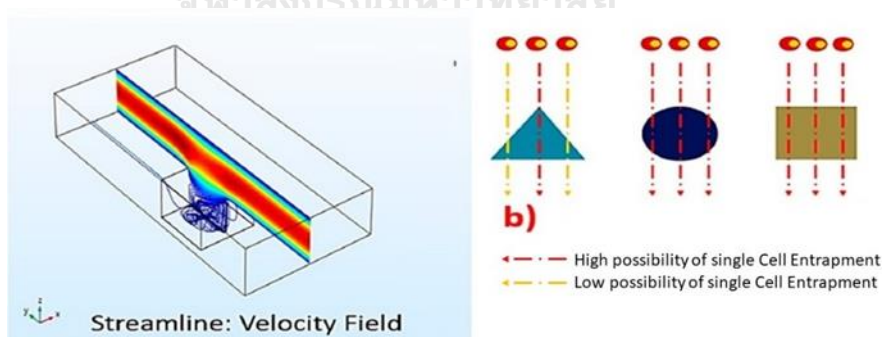
สำหรับกลไกการไหลที่เกิดขึ้นภายในหลุมภายใต้อิทธิพลของรูปร่างของหลุมแบบต่าง ๆ ได้แก่ หลุมวงกลม สามเหลี่ยม และหลุมสี่เหลี่ยม โดยหลุมวงกลม และหลุมสี่เหลี่ยมมีการกระจายตัวของสารไหลคล้ายกัน โดยของไหลจะเคลื่อนที่ลงสู่หลุมเมื่อของไหลเคลื่อนที่ผ่านหลุม และจะวกกลับขึ้นออกจากหลุมทางด้านหลังซึ่งอาจจะดักจับอนุภาคได้ไม่ดีเนื่องจากการไหลหลักมีอิทธิพลลึกลงไปในหลุมค่อนข้างมาก ทำให้อนุภาคที่อยู่ด้านในโดนแรงต้านจากของไหลค่อนข้างสูง และอาจจะเคลื่อนที่

ออกมาตามการไหลหลักได้ง่ายดังแสดงในรูปที่ 2.2(ก) ส่วนการไหลที่เกิดขึ้นกับหลุมสามเหลี่ยมจะมีความแตกต่างกันเมื่อของไหลเคลื่อนผ่านตำแหน่งกลางหลุมจะเกิดการไหลแบบหมุนวนจากด้านบนปากหลุมสู่ภายในหลุม การไหลหมุนวนนี้อาจจะช่วยให้เกิดความสม่ำเสมอของรูปแบบของการดักจับได้ เช่น อนุภาคจะถูกการไหลหมุนวนพาให้เคลื่อนที่ออกไปจากหลุมได้หากอนุภาคไม่ได้อยู่ในตำแหน่งที่มีการไหลหมุนวนต่ำ เป็นต้น ดังรูปที่ 2.2(ข) ดังนั้นหลุมจุลภาคที่มีมุมปะทะกับของไหลทางด้านหน้าจะมีการดักจับอนุภาคได้ดี และเกิดการหมุนวนของของไหลเกิดขึ้นซึ่งถ้าหากทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไป การหมุนวนนี้จะแสดงถึงการนำอาหารไปให้เซลล์บริเวณก้นหลุมได้ดี [10]

(ก)



(ข)



รูปที่ 2.2 การจำลองการไหล (ก) เส้นความเร็วเมื่อของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาครูปร่าง สามเหลี่ยม วงกลม และสี่เหลี่ยมจัตุรัส และ (ข) ผลกระทบของรูปร่างหลุมจุลภาคที่มีต่อการดักจับอนุภาค

2.2 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์รูปแบบต่าง ๆ

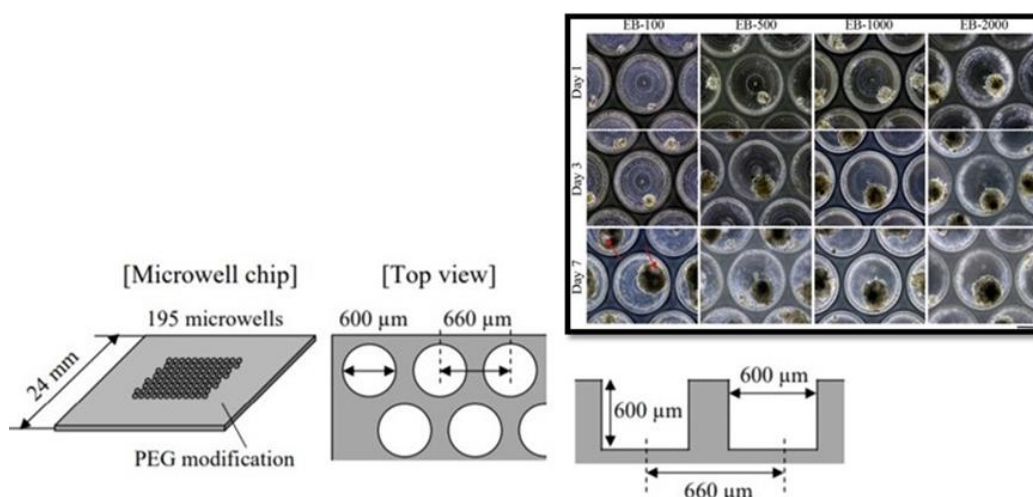
การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติในปัจจุบันนี้มีวิธีการเลี้ยง 5 วิธี คือ Hanging-drop method, Forced-floating method, Scaffolds and Microfluidic system [12] ซึ่งผู้วิจัยจะเน้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาคที่มีหลุมจุลภาคเป็นส่วนประกอบนั้นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเริ่มแรกจะนำเซลล์เข้าระบบ เซลล์จะค่อย ๆ ตกลงหลุมจุลภาค หลังจากนั้นเซลล์จะค่อย ๆ มารวมตัวกันสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ เรียกว่า Cells spheroid การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบนี้แบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ การเลี้ยงในหลุมจุลภาคแบบสภาวะสถิต (Static) และแบบพลวัต (Dynamic)

2.2.1 การเลี้ยงในหลุมจุลภาคแบบสภาวะสถิต (Static)

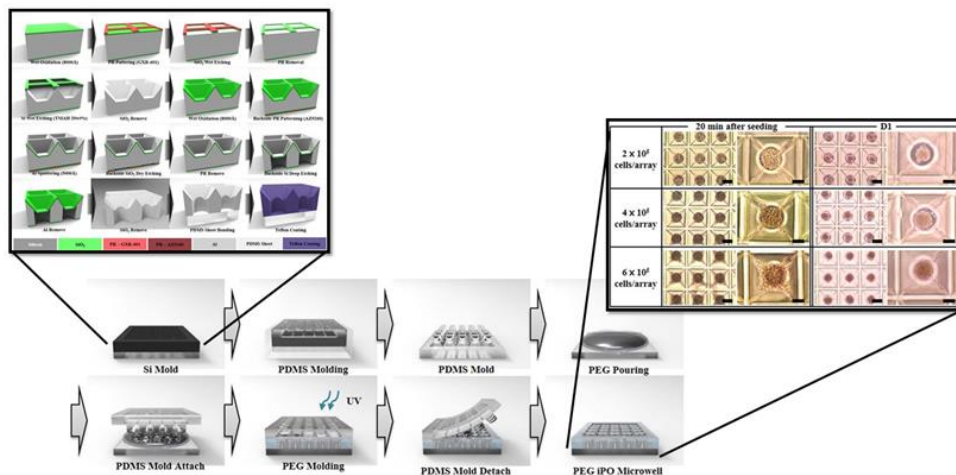
การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีเลี้ยงในหลุมจุลภาคแบบสภาวะสถิต (Static) เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบของไหลจุลภาคโดยมีหลุมจุลภาคอยู่ภายในระบบด้วย ซึ่งช่วยในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติได้มีประสิทธิภาพ สามารถใช้งานได้ง่าย และสะดวกในการสร้าง อีกทั้งง่ายต่อการทำการทดสอบ จึงสามารถใช้ร่วมกับเครื่องมือมาตรฐานอื่น ๆ ได้

การศึกษาของ Miyamoto D และ Nakazawa K. [13] (2016) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดอินดิคินดิฟลูออโรโพรเทนต์หรือเซลล์ไอพีเอสของหนูด้วยขนาดของ EB ที่แตกต่างกัน ซึ่ง EB นี้ถูกเพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาครูปทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 600 ไมโครเมตร ความลึก 600 ไมโครเมตร และมีระยะพิทช์ 660 ไมโครเมตร โดยหลุมจุลภาคสร้างจากพอลิเมทิลเมทาคริเลตด้วยกระบวนการ Soft-lithography และพื้นผิวของชิพถูกดัดแปลงด้วยพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะบริเวณผิว จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 100 500 1,000 และ 2,000 เซลล์ต่อหลุม โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการรวมตัวกันของเซลล์ต้นกำเนิด (Embryoid bodies, EB) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Hanging drop โดยทำการเพาะเลี้ยง EB เป็นระยะเวลา 10 วัน และวิเคราะห์การแสดงออกของ Early cardiac transcription factor (Nkx2.5) และ α -myosin heavy chain (α Mhc) ซึ่งเป็น mesodermal markers พบว่ามีการแสดงออกของ Nk x 2.5 ที่สูงใน EB ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นมากกว่า 500 เซลล์ต่อหลุม ซึ่งสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยง EB ในหลุมจุลภาค เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ควรใส่เซลล์ในหลุมจุลภาคด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 500 เซลล์ต่อหลุม



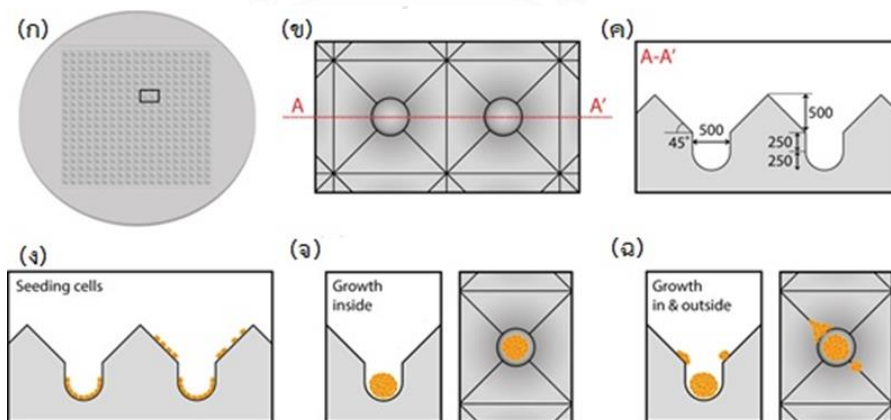
รูปที่ 2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ EB จากเซลล์ต้นกำเนิดอินดิวิจิวซ์พลูริโพเทนต์หนูที่เพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาคด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน

การสูญเสียของเซลล์ในระหว่างการใส่เซลล์เข้าไปในระบบของไหลจุลภาค โดยข้อเสียที่เกิดขึ้นนี้เป็นปัญหาอย่างยิ่งหากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็น Primary cell หรือมาจาก Clinical sample เมื่อนำเซลล์เข้าไปในระบบด้วยปั๊ม เซลล์มักจะไม่ได้ถูกดักลงในหลุมจุลภาค การเพิ่มความลึกของหลุมนั้นช่วยให้เซลล์ตกลงไปได้มากขึ้น ซึ่งช่วยลดการสูญเสียของเซลล์ได้ นอกจากนี้รูปร่างของหลุมจุลภาคยังช่วยลดการสูญเสียของเซลล์ได้ เช่นงานวิจัยของ Cha J.M. และคณะ (2017) [11] ได้ศึกษาผลของรูปร่างของหลุมจุลภาคสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อโดยไม่มีการสูญเสียของเซลล์ รูปร่างของหลุมจุลภาคที่ถูกนำมาใช้นั้นเป็นรูปพีระมิดสี่เหลี่ยมคว่ำ และมีหลุมทรงกระบอกซ้อนอยู่ข้างใน หลุมจุลภาคถูกสร้างจากแม่พิมพ์ซิลิกอนด้วยกระบวนการ Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) กระบวนการได้แก่ Si wet etching และ Si dry etching ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เริ่มจากกัดรูปทรงพีระมิดคว่ำด้วยกระบวนการ Si wet etching หลังจากนั้นกัดรูปทรงกระบอกด้วยกระบวนการ Si dry etching เมื่อได้แม่พิมพ์จากกระบวนการ Etching แล้ว นำ PDMS มาขึ้นรูปกับแม่พิมพ์ซิลิกอนเป็นแม่พิมพ์ PDMS เพื่อในการสร้างหลุมจุลภาค หลังจากได้แม่พิมพ์จาก PDMS แล้ว นำโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) มาเคลือบแม่พิมพ์ PDMS แล้วใช้ UV ฉายใส่โพลีเอทิลีนไกลคอลเพื่อให้แข็งตัว หลังจากนั้นทำการลอกออกจากแม่พิมพ์ จะได้หลุมจุลภาคที่ต้องการ หลุมจุลภาครูปพีระมิดคว่ำนั้นยังช่วยลดขั้นตอนในการล้างเซลล์ที่ไม่ตกลงในหลุม เซลล์ไม่ได้รับผลกระทบแรงขึ้นตอนการล้าง และกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อที่สร้างได้นั้นมีขนาดที่สม่ำเสมอ



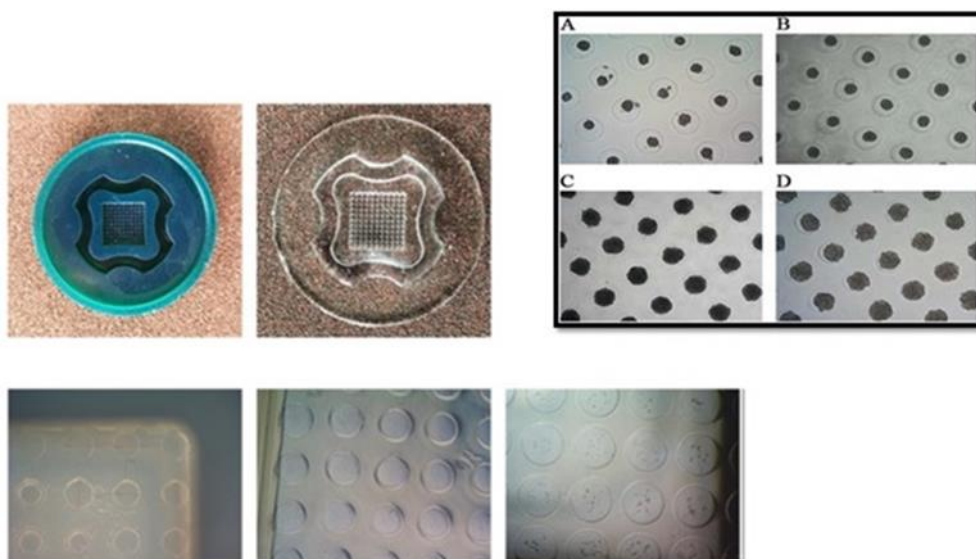
รูปที่ 2.4 ผลลัพธ์ของการสร้าง hMSC-spheroid ในหลุมแบบพีระมิดสี่เหลี่ยมคว่ำ และมีหลุมทรงกระบอกซ้อน

Wang, Y., et al. (2016). [14] ได้ศึกษารูปร่างของหลุมจุลภาคที่มีลักษณะเป็นพีระมิดคว่ำ และมีทรงกระบอกซ้อนตรงยอดพีระมิดเพื่อการสังเกตการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายในหลุมจุลภาค โดยใช้ Human hepatocarcinoma Huh-7.5 เซลล์ ในการเลี้ยงมีจำนวนหลุมทั้งหมด 361 หลุม (19 x 19) เส้นผ่านศูนย์กลางวงกลม 500 ไมโครเมตร ความลึกทั้งหมด 1000 ไมโครเมตร แสดงดังรูป 2.5 โดยการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเป็นไปในทางที่ดี และสามารถลดการสูญเสียเซลล์เนื่องจากการใส่เซลล์เข้าไปในระบบของไหลจุลภาค



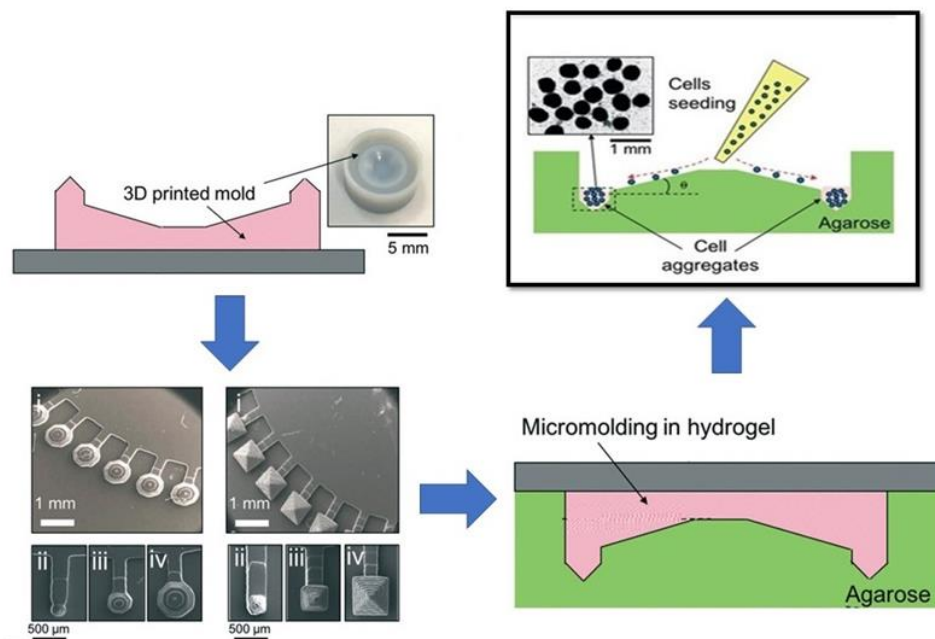
รูปที่ 2.5 รูปร่างของหลุมจุลภาคยังช่วยลดการสูญเสียเซลล์ (ก) ภาพรวมของหลุมจุลภาค (ข) เป็นภาพมุมมองด้านบน และ (ค) เป็นภาพตัดด้านข้างที่ระนาบ A (ง) การใส่เซลล์ลงหลุม (ฉ) Side and top views ของการสร้างกลุ่มเซลล์ในหลุมจุลภาค (ฉ) Side and top views ของการเจริญเติบโตของเซลล์

Zhang, B., et al. (2018) [15] ได้ศึกษาวิธีการในการสร้างรูปร่างของหลุมจุลภาคที่มีลักษณะเว้ากันหลุมสำหรับการก่อดัวของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อของเซลล์ตับ โดยการใช้การพิมพ์ 3 มิติ ในการสร้างแม่พิมพ์ ซึ่งขนาดแม่พิมพ์โดยรวม 6.4×6.4 ตารางมิลลิเมตร ประกอบด้วย 121 หลุม ที่มีความกว้าง 400 ไมโครเมตร ความหนา 400 ไมโครเมตร โดยกระบวนการผลิตมีดังนี้ ออกแบบ และสร้างแม่พิมพ์ 3D Microarray โดยใช้ Solidwork software และแม่พิมพ์ถูกพิมพ์ด้วย The photosensitive resin โดยการใช้การพิมพ์ 3 มิติ การทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงใน DMEM สำหรับการก่อดัวของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อจะใส่เซลล์ 2.4×10^4 , 6×10^4 , 1.2×10^4 และ 2.4×10^4 เซลล์ต่อแม่พิมพ์ ไปยังหลุมจุลภาคที่มีลักษณะเว้าบริเวณกันหลุมเพื่อเข้าให้ความหนาแน่นของเซลล์เป็น 200 500 1,000 และ 2000 เซลล์ต่อหลุม (ปริมาตรของแต่ละหลุมเท่ากับ 0.042 ไมโครลิตร) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาขนาดรูปร่างของหลุมจุลภาคที่เปลี่ยนไปโดยความหนาแน่นของเซลล์คงที่ พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมจุลภาคเพิ่มขึ้นทำให้การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อไม่มีประสิทธิภาพ และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ในขณะที่ขนาดรูปร่างของหลุม จุลภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลง พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงมีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้ดีโดยขนาดของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์ที่ใส่เข้าไป จากผลการทดลองความหนาแน่นของเซลล์ 500 – 1000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเงื่อนไขที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงสำหรับทรงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 – 250 ไมโครเมตร ดังรูป 2.6



รูปที่ 2.6 จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันต่อหลุมในแม่พิมพ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 400 ไมโครเมตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน A) 200 B) 500 C) 1000 และ D) 2000 เซลล์ต่อหลุม

Seyfoori, A., et al. (2018) [16] ได้ศึกษารูปร่างของหลุมจุลภาคแบบ Self-filling microwell arrays (SFMAs) ที่สามารถสร้าง spheroid ได้โดย SFMA ประกอบด้วย chamber ที่เชื่อมต่อกับแถวของช่องเอียงที่กระจายเซลล์ไปยังหลุมต่าง ๆ แม่พิมพ์ที่สร้างจาก 3D Printer Resin จะถูกนำมาใช้เพื่อจำลองโครงสร้างหลุมจุลภาคโดยใช้ Agarose gel รูปที่ 2.7 (ก) หลุมแต่ละตัวประกอบด้วย load chamber ที่เชื่อมต่อกับช่องนำทางที่เอียงซึ่งส่งเซลล์ไปยังหลุมต่าง ๆ รูปที่ 2.7 (ข) ช่องการไหลที่มีความโน้มเอียงใน SFMA นั้นถูกออกแบบมาเพื่อนำเซลล์ไปสู่หลุมจุลภาคโดยใช้แรงโน้มถ่วง ในการตรวจสอบผลกระทบของความเอียงของช่องการไหลที่มีต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงโดยวัดจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ในบริเวณความลาดเอียงเป็น 0° , 15° และ 30° ในทุกกรณี เซลล์ถูกบรรจุที่ความหนาแน่น 5×10^5 เซลล์ และผ่านช่องการไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าความชัน 30° มีจำนวนเซลล์ต่ำสุดที่ยังคงอยู่ในช่องการไหล และการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเป็นไปในทางที่ดีดังรูปที่ 2.7 (ค)



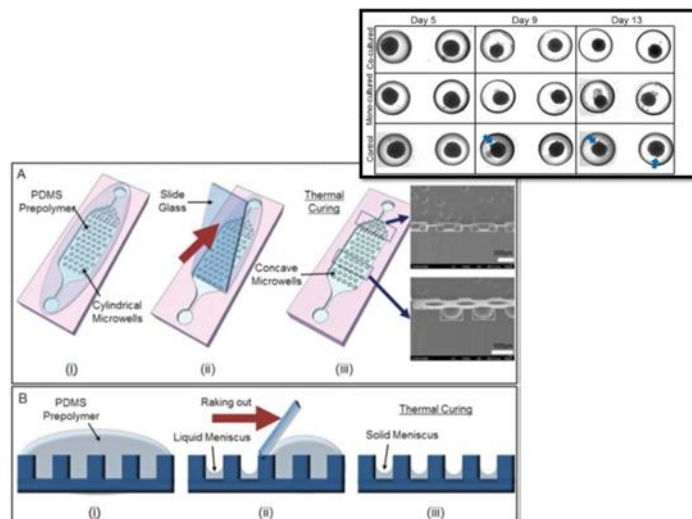
รูปที่ 2.7 แสดงการใส่เซลล์ลงหลุมจุลภาค(ก) รูปร่างของหลุมจุลภาค(ข) การใส่เซลล์ลงหลุมจุลภาค (ค) การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อภายในหลุมจุลภาค

2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคแบบพลวัต (Dynamic)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคแบบพลวัต เป็นการเพาะเลี้ยงที่คล้ายกับการพาเลี้ยงในหลุมจุลภาคแบบสถิต แต่จะมีการไหลของของไหลผ่านช่องทางการไหลเพื่อนำอาหารมาให้เซลล์ บริเวณก้นหลุมจุลภาคโดยเทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาคคือช่องทางไหลจุลภาค ซึ่งเป็นช่องทางไหลขนาดเล็กสำหรับของเหลวหรือสารละลายประเภทต่าง ๆ ในระดับไมโครลิตร โดยส่วนมากจะถูก

ประยุกต์ใช้ร่วมกับห้องปฏิบัติการบนชิพ (Lab on a chip) โดยขนาดของท่อเหล่านี้จะมีขนาดประมาณเส้นผมของคนเท่านั้น

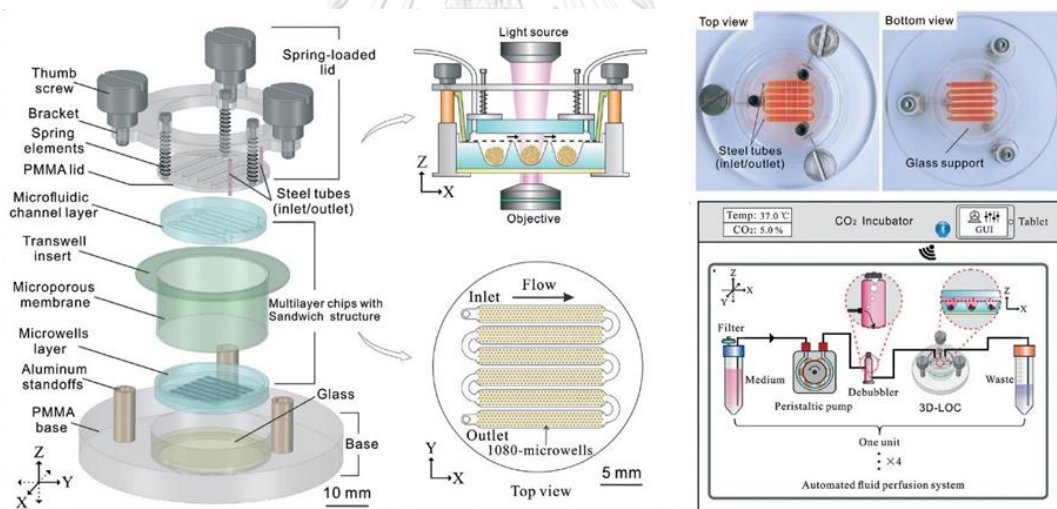
Lee, S.-A., et al. (2013) [17] ได้ศึกษา Three-dimensional (3D) liver-on-a-chip ด้วยการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ โดยกระบวนการสร้างระบบของไหลจุลภาคนั้น เริ่มจากสร้างแม่พิมพ์ด้วยกระบวนการ Soft-lithography ลักษณะของหลุมเป็นทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 500 ไมครอน ความสูง 400 ไมครอน เตรียม PDMS แล้วเทลงบนแม่พิมพ์หลังจากนั้นใช้กระจกสไลด์ด้านบนของแม่พิมพ์ออก PDMS ที่อยู่ในหลุมนี้จะมีลักษณะโค้งเว้า เมื่อได้ระบบของไหลจุลภาคแล้วนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป พบว่าไมโครชิพมีข้อได้เปรียบอย่างมากสำหรับการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ ลักษณะที่สำคัญที่สุดของระบบของไหลจุลภาคนี้คือมีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ไปยังเซลล์อย่างต่อเนื่องผ่าน Osmotic pumping โดยการออกแบบของระบบของไหลจุลภาคผลของขนาดกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกิดขึ้นในหลุมจุลภาคที่กันหลุมมีลักษณะโค้งเว้าพบว่าการสร้างและขนาดกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเฉลี่ยดีกว่าการเลี้ยงแบบปกติ (Mono-culture และ Co-culture) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



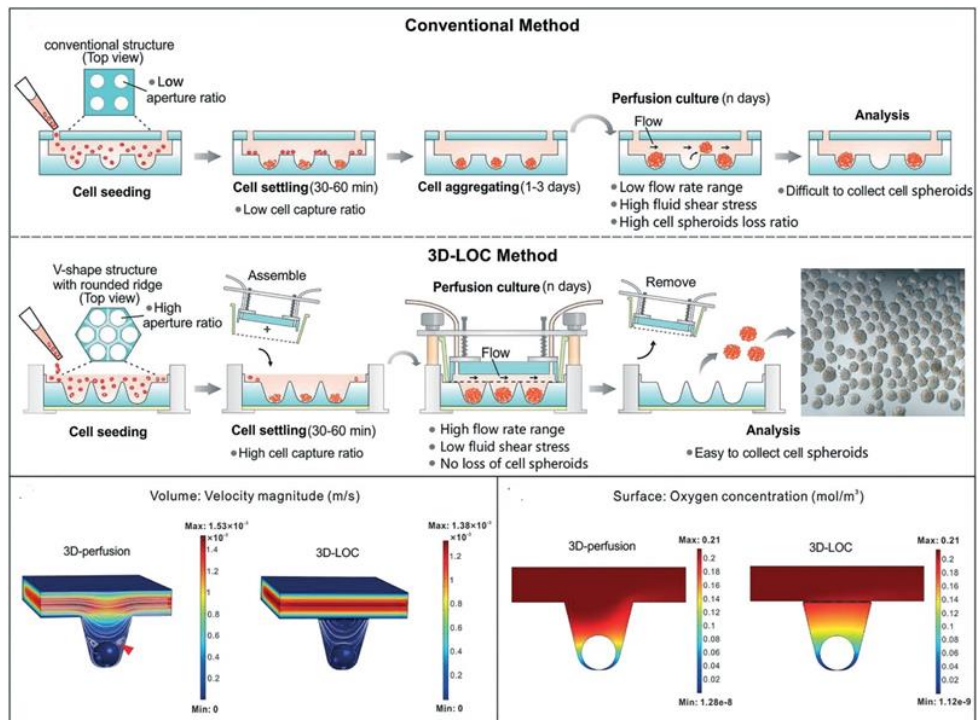
รูปที่ 2.8 ผลของการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และขนาดเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

การสูญเสียของเซลล์ในระหว่างการใส่เซลล์โดยการไหลเข้าไปในระบบของไหลจุลภาคซึ่งข้อเสียของการสูญเสียเซลล์อย่างที่กำลังไว้ในกรณีการเลี้ยงแบบสภาวะสถิต (Static) โดย Ma, L.-D., et al. (2018) [18] ได้ศึกษาแพลตฟอร์ม liver-on-a-chip (3D-LOC) แสดงดังรูปที่ 2.9 (ก) ซึ่งรูปร่างของระบบเลี้ยงเซลล์แบบนี้จะต่างกับระบบเลี้ยงเซลล์แบบทั่วไปคือ มีช่องทางการไหลวางอยู่บนหลุมจุลภาคลักษณะขดเป็นตัว S ภายในช่องทางการไหลจะเจาะรู 1080 รู เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์ตกลงไปให้เซลล์บริเวณกันหลุมจุลภาค การออกแบบช่องทางการไหลแบบนี้เพื่อลดความเค้นเฉือนระหว่าง

ของไหลกับเซลล์ให้น้อยลง เซลล์ที่ใช้เลี้ยงคือ Human HepG2/C3A spheroids โดยระบบเลี้ยงเซลล์ของ liver-on-a-chip (3D-LOC) โดยหลุมจุลภาคทั่วไปมีการสูญเสียเซลล์จำนวนมากหลังจากกระบวนการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยกระบวนการใส่เซลล์ลงไปหลุมจุลภาคเนื่องจากเซลล์ไม่สามารถลงหลุมได้ทุกเซลล์ เซลล์บางส่วนจะติดที่บริเวณพื้นที่ว่าง จึงเป็นสาเหตุที่ต้องการลดการสูญเสียเซลล์ และ 3D-LOC อัตราส่วนการสูญเสียกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกือบจะเป็นศูนย์ จากการทดลองเลี้ยงเซลล์ดังรูปที่ 2.9 (ข) พบว่าการหมุนวนของของไหลบริเวณรอบ ๆ ผิวของกลุ่มเซลล์ไม่ได้ช่วยให้เซลล์รวมตัวเป็นทรงกลม และความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นบริเวณกลุ่มเซลล์ในชิป 3D-LOC อยู่ในช่วง 10^{-4} - 10^{-7} Pa ซึ่งต่ำกว่า การเลี้ยงในชิปแบบทั่วไป ผลที่ได้คือ กลุ่มเซลล์ที่ถูกสร้างในชิป 3D-LOC มีลักษณะที่กลม และผิวค่อนข้างเรียบ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วยการจำลองทางคอมพิวเตอร์ พบว่าแถบความเข้มข้นของออกซิเจนใน 3D-LOC มีการกระจายแบบไล่ระดับอย่างสม่ำเสมอมากขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในชิปแบบทั่วไป ซึ่งความสม่ำเสมอนี้แสดงถึงการสร้างสภาพแวดล้อมการรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายกับในร่างกายมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2.9 (ข) ล่างขวา



(ก)

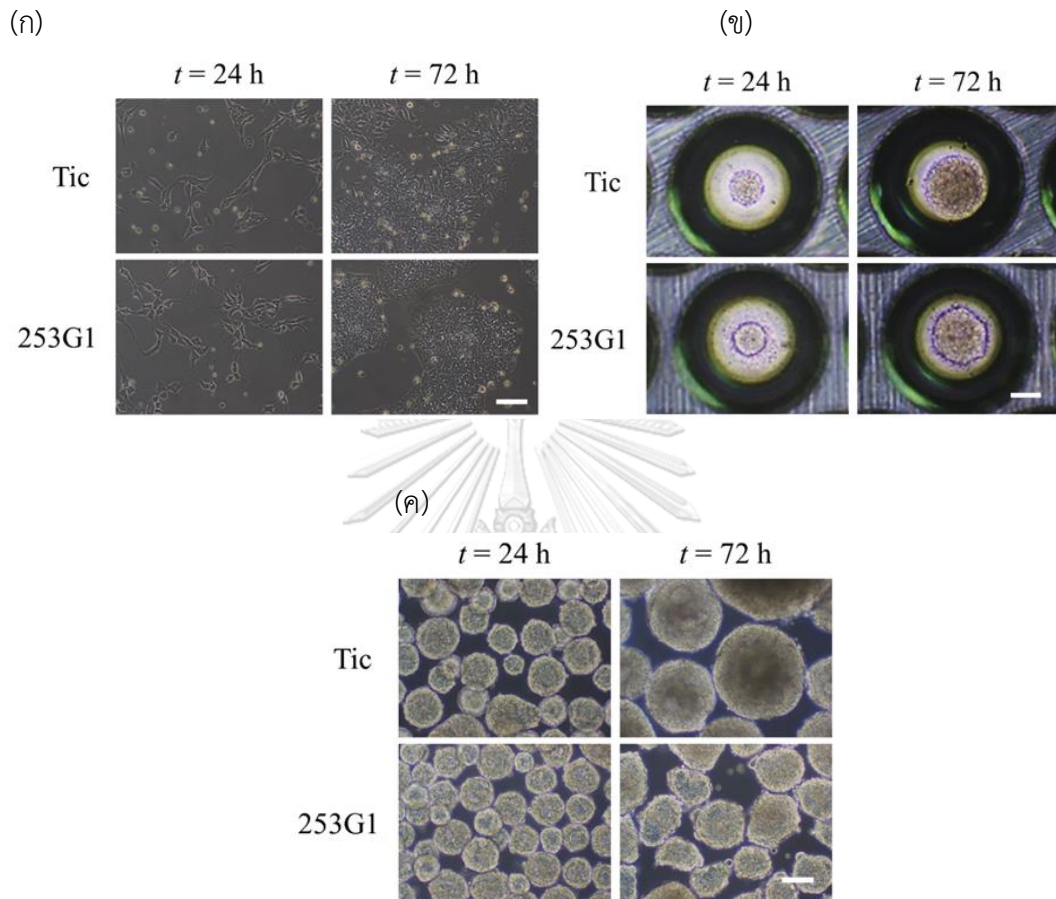


(ข)

รูปที่ 2.9 การเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ ด้วยวิธี Conventional และ 3D-LOC (ก) วิธีการสร้างระบบของไหลจุลภาคแบบ 3D-LOC (ข) การเปรียบเทียบการใส่เซลล์ลงหลุมระหว่าง Conventional กับ 3D-LOC

Kato, Y., Kim (2018) [8] ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ แบบสถิต (Static 2D culture), 3 มิติ แบบสถิต (Static 3D culture) และ 3 มิติ พลวัต (3D dynamic) โดยใช้ Human induced pluripotent stem cells (HiPSCs) โดยใช้ Human induced pluripotent stem cells 2 ชนิด คือ Tic และ 253G1 ถูกเลี้ยงภายใต้เงื่อนไขสถิต และพลวัต ซึ่งเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ในช่วงต้น (24 - 48 ชั่วโมง) กลาง (48 - 72 ชั่วโมง) และปลาย (72 - 96 ชั่วโมง) ในการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ แบบสถิตที่ถูกเลี้ยงบนเพลตเคลือบ Imatrix เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เดี่ยวมีการกระจายตัวที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นที่ 72 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มแล้วสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ ดังรูปที่ 2.10 (ก) สำหรับการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ แบบสถิต พบว่าการรวมตัวของเซลล์เดี่ยวเกิดขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และขนาดของกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 2.10 (ข) และสำหรับการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ แบบพลวัตพบว่าการก่อตัวของเซลล์เดี่ยวเกิดขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และขนาดของกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเพาะเลี้ยงเช่นกัน ดังรูป 2.10 (ค) แต่การเจริญเติบโตจะน้อยกว่าการเลี้ยง 3 มิติ แบบสถิต เนื่องจากเซลล์ได้รับความเสียหายจากการไหลของของเหลวซึ่งส่งผลกระทบต่อ Extracellular matrix (ECM) ที่เกิดจากการรวมกลุ่มของเซลล์ ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า

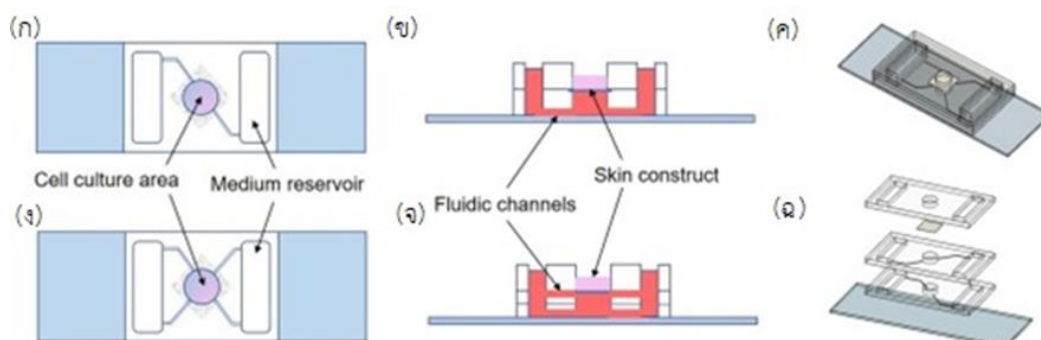
ECM ที่สังเคราะห์ด้วยเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเติบโตของเซลล์ และสัณฐานวิทยา (Morphology) และการเปลี่ยนแปลงของ ECM ภายใต้นจะนำไปสู่ความสามารถในการเติบโตลดลงในวัฒนธรรมแบบพลวัต



รูปที่ 2.10 การรวมกลุ่มของ Tic และ 253G1 Human induced pluripotent stem cells (ก) ในช่วงการเลี้ยง 2D แบบสถิตที่ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์ (ข) ในช่วงการเลี้ยง 3D แบบสถิตที่ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์ (ค) ในช่วงการเลี้ยง 3D แบบพลวัตที่ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์

Lee, H. R., & Sung, J. H. (2020) [19] ได้ศึกษาผลของพารามิเตอร์ในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ เช่น ความหนาของ Collagen scaffold ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ และความถี่ของการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ พารามิเตอร์เหล่านี้ถูกเลือกเนื่องจากมีผลโดยตรงต่ออัตราการขนส่ง และการบริโภคสารอาหารตลอดจนของเสียที่เป็นพิษที่เกิดขึ้นกับเซลล์ในขณะที่พารามิเตอร์เหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลง เราสังเกตเห็นความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนในควมมีชีวิตของเซลล์อย่างชัดเจน การสร้าง Skin chip เริ่มจากสร้างแม่พิมพ์ก่อน หลังจากนั้นขึ้นรูปช่องทางไหล

(Microchannels) จาก Polydimethylsiloxane (PDMS) 2 ชั้นทิศทางช่องทางการไหลไขว้กัน หลังจากนั้นนำมาประกบกัน ดังรูป 2.11 ก-ฉ



รูปที่ 2.11 แผนผังของ Skin chip กินชิพ (a) มุมมองด้านบน (b) มุมมองด้านข้าง แผนผังของ Skin chip ที่มีการแก้ไขช่องทางการไหลแล้ว (c) มุมมองด้านบน (d) มุมมองด้านข้าง (e) ภาพวาด 3 มิติ Skin chip ที่ประกบกัน (f) การวาดภาพ 3 มิติของ Skin chip ที่แยกชิ้นส่วน

เซลล์ Human dermal primary fibroblasts และ HaCaT (Spontaneously transformed human keratinocyte cell line) ถูกนำมาใช้ในการศึกษารั้วนี้ ไฟโบรบลาสต์ได้รับการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะไหลหลังจากใส่เซลล์ไปแล้ว 1 วัน ด้วยอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อนาที ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เพาะที่แตกต่างกันสามระดับ (0.9×10^5 , 4.5×10^5 และ 0.9×10^6 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) และ Collagen scaffold ทำด้วยความหนาที่แตกต่างกันสามแบบ (1, 2 และ 4 มิลลิเมตร) เซลล์ HaCaT ถูกใช้เพื่อสร้างชั้นผิวหนังนอกสุด และถูกใส่ด้วยความหนาแน่น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิเมตร ผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นเซลล์ (0.9×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ให้ผลที่ดีที่สุด มีการรอดชีวิตมากที่สุด จากผลการทดลองสรุปได้ว่าความหนาแน่นของเซลล์ ความหนาของ Collagen scaffold และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต่างกัน มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ซึ่งการรอดชีวิตของเซลล์จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์เป็นหลัก เมื่อความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้นจะทำให้สารอาหารหมดลงอย่างรวดเร็ว ความรอดชีวิตของเซลล์ก็จะลดลง ในขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่ำเกินไป อาหารก็ไม่เพียงพอต่อการเลี้ยงเซลล์ทำให้ความรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเช่นกัน

2.2.3 การศึกษาการกระจายตัวของออกซิเจน และกลูโคสในหลุมจุลภาค

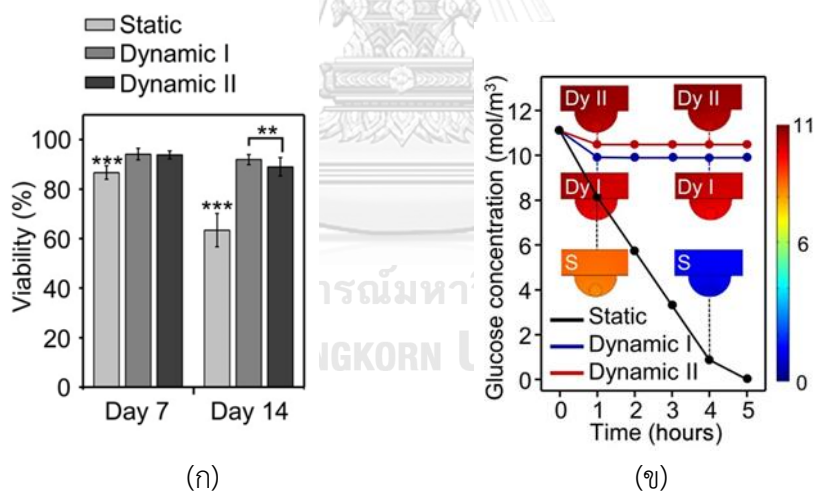
ในปี 2016 Alexandre Super, et [20] ได้ศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ที่ได้จาก Chinese hamster ovary (CHO) และเซลล์ต้นกำเนิดของหนู Mouse embryonic stem cell (mESC) ที่มีความหนาแน่น 3×10^4 และ 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ วัดอัตราการใช้

ออกซิเจนของเซลล์จากการคำนวณผลต่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ผลการทดลองพบว่าเซลล์ CHO และ mESC มีอัตราการใช้ออกซิเจน (Oxygen uptake rate) มากที่สุดเท่ากับ $60 \text{ amol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ และ $35 \text{ amol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่มีค่าการใช้ออกซิเจนอยู่ในช่วง $8 - 94 \text{ amol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ และ $10 - 40 \text{ amol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ของ CHO และ mESC ตามลำดับ

ในปี 2017 Mariyam Barisam , et [21] ได้ศึกษาการความเข้มข้นของสารอาหารในระบบของไหลจุลภาคด้วยวิธีการจำลองทางคณิตศาสตร์ ผู้วิจัยใช้โมเดลของกลุ่มเซลล์ในลักษณะทรงกลมและทรงโดม โดยพื้นที่ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็นแบบหลุมจุลภาค และผนังรูปถ้วย สารอาหารที่สนใจคือออกซิเจน และกลูโคส การคำนวณด้วยระเบียบวิธีเชิงตัวเลขในส่วนของการใช้สมการการแพร่และการพาของตัวถูกละลายในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกันมาก เนื่องจากวัสดุที่ใช้ทำอุปกรณ์นี้เป็นพอลิเมอร์ PDMS ที่มีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านของออกซิเจนจากภายนอกเข้ามาในระบบได้ และอัตราการบริโภคออกซิเจนโดยเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นโดยรอบขณะนั้น คณะผู้วิจัยคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนโดยแยกคิดความเข้มข้นของออกซิเจนที่ทางเข้า (ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และความเข้มข้นของออกซิเจนที่แพร่เข้ามาจากด้านบน ส่วนความเข้มข้นกลูโคสคำนวณเช่นเดียวกันกับออกซิเจนที่เข้ามาที่อาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการคำนวณพบว่าเซลล์ที่ได้รับสารอาหารมากคือเซลล์ที่สัมผัสกับการไหลของสารอาหารโดยตรง แต่ก็มีข้อจำกัดที่แรงเฉือนอันเนื่องมาจากการสัมผัสการไหลเช่นกัน

ต่อมาปี 2018 Li-Dong Ma , et [18] ได้ออกแบบระบบเพื่อใช้เลี้ยงเซลล์ดับของมนุษย์แบบพลวัตในหลุมจุลภาคที่วางเรียงต่อกันโดยไม่มีพื้นที่ว่างระหว่างหลุม และเพิ่มเยื่อที่มีรูพรุนปิดปากหลุมหลังจากขั้นตอนการนำเซลล์เข้าไปในหลุมเพื่อลดแรงเฉือนอันเกิดจากการเลี้ยงอาหารแบบพลวัต ความท้าทายของงานนี้คือข้อจำกัดในการลำเลียงออกซิเจนไปยังกลุ่มเซลล์ในหลุมเนื่องจากมีเยื่อมาากันทำให้การไหลของอาหารไปในหลุมนั้นเป็นไปได้ จึงมีเพียงการแพร่เท่านั้นที่จะส่งออกซิเจนไปหาเซลล์ การศึกษานี้ใช้การจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ โดยที่ออกซิเจนเข้าสู่ระบบผ่านทางอาหาร และผ่านผนังพอลิเมอร์ PDMS เข้ามาจากด้านบน ปริมาณออกซิเจนที่แพร่เข้ามาอยู่ในรูปของฟลักซ์ ผู้วิจัยคำนวณค่าดังกล่าวจากความแตกต่างของค่าความดันย่อย (Partial pressure) ระหว่างออกซิเจนจากอากาศภายนอก และออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารภายในระบบเลี้ยงเซลล์ ผลการคำนวณพบว่าขนาดแรงเฉือนที่กระทำกับเซลล์ลดลงแต่ความเข้มข้นที่ความลึกเพิ่มขึ้นมีค่าลดลง คณะผู้วิจัยเสนอว่าหากต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบที่ตนออกแบบนั้นควรเพิ่มอัตราการไหลของสาร (ส่งผลให้ความเร็วเพิ่ม) และลดความลึกของหลุมจุลภาคลง เพื่อให้การแพร่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ปี 2019 Yesl Jun, et [7] ได้ออกแบบการเลี้ยงเซลล์แบบพลวัตโดยใช้สภาพแวดล้อมคล้ายกับเซลล์ในตับอ่อนเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบสถิต การทดลองประกอบด้วยวิธีการเลี้ยงอาหารแบบสถิต เลี้ยงแบบพลวัตความเข้มข้น 0.05 M อัตราการไหล 8 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง และความเข้มข้น 0.2 M อัตราการไหล 25 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ในหลุมจุลภาคครึ่งทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 500 ไมโครเมตร ความลึก 250 ไมโครเมตร ความสูงช่องการไหล 300 ไมโครเมตร ผลการทดลองระบุว่าหลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 14 วัน กลุ่มเซลล์รวมตัวกันมีรูปร่างใกล้เคียงทรงกลม และมีขนาดสม่ำเสมอในการเลี้ยงทั้งสามสภาวะ แต่อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มเซลล์ในหลุมที่เลี้ยงแบบพลวัตทั้งคู่มากกว่าหลุมที่เลี้ยงแบบสถิต หลังจากนั้นอีก 7 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของหลุมทั้งสามมีแนวโน้มลดลงและการเลี้ยงแบบพลวัตที่ความเข้มข้น และอัตราการไหลต่ำมีอัตราการรอดสูงสุด ต่ำที่สุดคือการเลี้ยงแบบสถิต ดังแสดงในรูปที่ 2.12 (ก) สอดคล้องกับผลการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์โดยสมมติความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 11.1 มิลลิโมล หลังจากเวลาผ่านไปหนึ่งชั่วโมงความเข้มข้นของการเลี้ยงด้วยสภาวะพลวัตที่อัตราการไหล 8 และ 25 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นประมาณ 10 และ 10.25 มิลลิโมล ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของสภาวะสถิตลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงศูนย์ที่เวลา 5 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 2.12 (ข)



รูปที่ 2.12 (ก) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน (ข) ผลการจำลองความเข้มข้นของกลูโคสที่เวลาต่าง ๆ ในการเลี้ยงด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

2.3 กระบวนการสร้างระบบของไหลจุลภาค

การเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคเริ่มเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากเป็นการเลี้ยงที่ไม่ซับซ้อน ควบคุมขนาดของกลุ่มเซลล์ได้ และสามารถนำหลุมจุลภาคมาประยุกต์เข้ากับระบบของไหลจุลภาคได้อย่างง่ายดาย เพื่อพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพมาก

ยิ่งขึ้น สำหรับการสร้างหลุมจุลภาค และระบบของไหลจุลภาค โดยมีนักวิจัยส่วนหนึ่ง [11, 13, 14, 17] ได้ใช้วัสดุซิลิกอนเป็นแม่พิมพ์ สำหรับการทำให้ละลายบนวัสดุ ซิลิกอนจะใช้การบวนการกัด (Etching) หรือกระบวนการ Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) ซึ่งการเลือกใช้วัสดุเป็นซิลิกอนมีข้อดีคือ แม่พิมพ์มีความแข็งแรง และทนทานแม้ว่าจะนำมาขึ้นรูปหลายครั้ง ข้อเสียคือ การสร้างมีความซับซ้อน ใช้เวลาสร้างนาน และต้นทุนสูง ต่อมาได้มีนักวิจัยหลายท่านได้นิยมสร้างแม่พิมพ์ด้วยการปรีน 3 มิติ [15, 16, 19] โดยใช้วัสดุเป็นเรซิน การสร้างแม่พิมพ์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถสร้างแม่พิมพ์ได้อย่างรวดเร็ว และต้นทุนต่ำ ข้อเสียคือ มีความทนทานค่อนข้างน้อย เป็นต้น

สำหรับสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการขึ้นรูปหลุมจุลภาคและช่องทางการไหลหลังจากสร้างแม่พิมพ์เสร็จแล้ว เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ PDMS [17-19] และ Agarose gel [11, 13, 15, 16] ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่นักวิจัยส่วนมากจะนิยมใช้ PDMS มากกว่า Agarose gel เพราะ PDMS มีความยืดหยุ่นสูง ทนทาน และเสียหายยาก ในขณะที่ Agarose gel มีความยืดหยุ่นน้อยกว่า PDMS มากอาจเกิดการเสียหายได้ง่ายสำหรับการเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาค

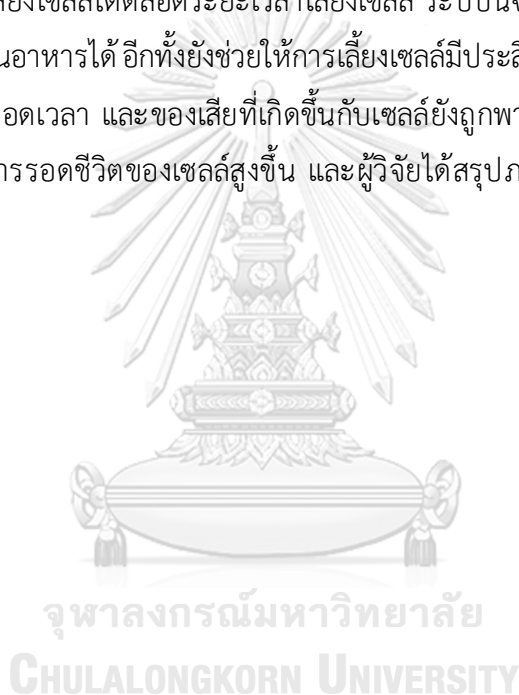
2.4 สรุปผล

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการเลียนแบบโครงสร้างทางสรีรวิทยาค่ายเนื้อเยื่อจริงมากที่สุด โดยเกิดจากการรวมกลุ่มของเซลล์เดี่ยวหลายๆเซลล์เป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า Cells spheroid วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ ที่นิยมเลี้ยงกันคือ Hanging-drop method, Forced-floating method, Scaffolds and Microfluidic System ผู้วิจัยจะศึกษาการเลี้ยงเซลล์แบบระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic System)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ มีวิธีการเลี้ยง 2 แบบ คือ แบบสถิต และแบบพลวัต สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคแบบสถิต จะมีการเลี้ยงคล้ายๆกับแบบ Hanging drop ต่างตรงที่อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงจะมีลักษณะเป็นหลุมลึกลงไป ซึ่งวิธีนี้จะสามารถควบคุมขนาดของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้ (ตามขนาดของหลุมจุลภาค) ส่วนการเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคแบบพลวัต มีวิธีการเลี้ยงคล้ายกับการเลี้ยงแบบสถิต แต่จะเพิ่มช่องทางการไหลเพื่อขนส่งอาหารเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงเซลล์ที่บริเวณกันหลุมจุลภาค โดยใช้ระบบของไหลจุลภาคเข้ามาเกี่ยวข้องของไหลคืออาหารเลี้ยงเซลล์จะไหลผ่านเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวตลอดระยะเวลาที่เลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไหลผ่านจะนำสารอาหารไปให้เซลล์ ขณะเดียวกันของไหลจะนำเอาของเสียที่เกิดจากเซลล์ออกไปด้วยจึงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโต การรอดชีวิตดีกว่าการเลี้ยงแบบสถิต นอกจากนั้นพารามิเตอร์ที่ส่งผลกระทบต่อสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเซลล์คือ ความหนาแน่นขอบเซลล์ อัตราการไหล และ

ความเค้นเฉือนที่กระทำกับเซลล์ หากความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้นจะทำให้สารอาหารหมดลงอย่างรวดเร็ว อาหารก็ไม่เพียงพอต่อการเลี้ยงเซลล์ทำให้ความรอดชีวิตของเซลล์ลดลง และอัตราการไหลของของไหลสูงขึ้นจะทำให้ความเร็ว และอัตราแรงเฉือนที่กระทำกับเซลล์ภายในหลุมจุลภาคสูงตาม

ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยเลือกการสร้างแม่พิมพ์ด้วยการปรี้น 3 มิติ โดยใช้วัสดุคือ เรซิน เนื่องจากมีต้นทุนในการสร้างที่ต่ำ และสามารถสร้างได้รวดเร็ว สำหรับวัสดุที่นำมาขึ้นรูปเป็นหลุมจุลภาคคือ PDMS เนื่องจากวัสดุนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีความยืดหยุ่นสูง สามารถสร้างสภาวะแวดล้อมให้กับเซลล์ได้ และเป็นวัสดุที่นักวิจัยหลายท่านใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ระบบที่ผู้วิจัยใช้เป็นระบบปิดโดยนำระบบของไหลจุลภาคมาต่อเข้ากับ Syringe pump เพื่อสร้างเป็นระบบปิดที่สามารถป้อนอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ตลอดระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ ระบบนี้จะช่วยลดการปนเปื้อนภายนอกจากขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารได้ อีกทั้งยังช่วยให้การเลี้ยงเซลล์มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเพราะเซลล์มีการแลกเปลี่ยนอาหารตลอดเวลา และของเสียที่เกิดขึ้นกับเซลล์ยังถูกพาออกไปพร้อมกับอาหารที่ไหลผ่าน ส่งผลให้อัตรการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้น และผู้วิจัยได้สรุปภาพรวมของงานวิจัยต่าง ๆ ดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการสร้างระบบของไหลจุลภาคด้วยเทคนิคต่างๆ

Author	Title	Type of cell culture	Type of cell	Cell culture day	Materials	Mold	Conclusion
Daisuke Miyamoto and Kohji Nakazawa	Differentiation of mouse iPS cells is dependent on embryoid body size in microwell chip culture	Static culture	Embryonic stem (ES) cells or induced pluripotent stem (iPS) cells,	7	Polymethyl methacrylate (PMMA)	Silicon	The initial EB size was one of the important factors controlling the proliferation and differentiation of stem cells in the microwell chip culture
Cha, Jae Min, et al	A novel cylindrical microwell featuring inverted-pyramidal opening for efficient cell spheroid formation	Static culture	Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs)	1	PEG hydrogel	Silicon	Novel microwell effectively reached almost zero percent of cell loss

	without cell loss								
Zhang, Binbin, et al	Fabrication of agarose concave petridish for 3D-culture microarray method for spheroids formation of hepatic cells	Static culture	Hepatic cells	14	agarose	Resin	Using 3D printing method can be fabricated easily and this model display high viability of cells and stable liver-specific functions.		
Seyfoori, Amir, et al	Self-filling microwell arrays (SFMA) for tumor spheroid formation	Static culture	Tumor stem cell	3	agarose	Resin	Tumor stem cell displayed good spheroid formation by Using 3D printing method		

Ma, L.-D., et al	Design and fabrication of a liver-on-a-chip platform for convenient, highly efficient, and safe in situ perfusion culture of 3D hepatic spheroids	Dynamic culture	Human HepG2/C3A cell	12	Polydimethylsiloxane (PDMS)	Polymethyl methacrylate (PMMA)	In platform of reducing spheroid loss and maintaining cell morphology and viability in long-term perfusion culture
Yest Jun, et	In vivo-mimicking microfluidic perfusion culture of pancreatic islet spheroids	Dynamic culture	Pancreatic islet	14	Polydimethylsiloxane (PDMS)	Silicon	The viability of cells in dynamic groups was significantly higher on both days 7 and 14 when compared to the static group
Lee, S.-A., et al	Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip	Dynamic culture	Hepatic stellate cells	9	Polydimethylsiloxane (PDMS)	Silicon	Flow assists the formation and long-term maintenance of spheroids

บทที่ 3

กระบวนการจำลองการไหล และการออกแบบ

บทนี้จะกล่าวถึงเทคนิคการออกแบบระบบ และการจำลองการไหลโดยใช้คอมพิวเตอร์ แบ่งออกเป็นสามหัวข้อใหญ่ๆคือ การออกแบบระบบของไหลจุลภาค การจำลองการไหลเบื้องต้น ผลการกระจายตัวของสารอาหารกลูโคส และออกซิเจน เป็นต้น

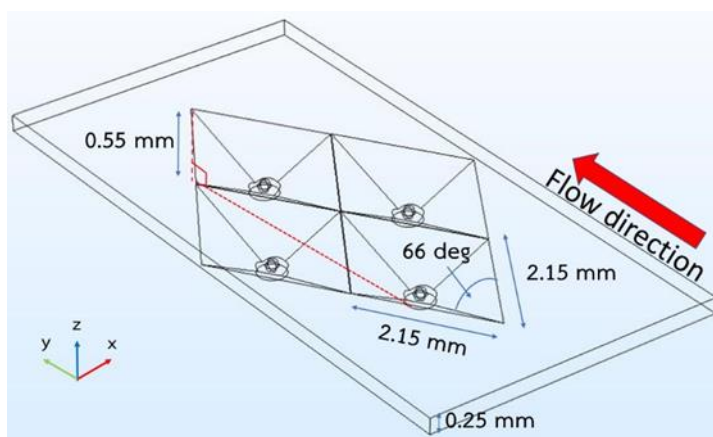
3.1 การออกแบบระบบของไหลจุลภาค

การออกแบบระบบ และการจำลองการไหลโดยใช้คอมพิวเตอร์ ซึ่งถูกออกแบบโดยใช้โปรแกรมเขียนแบบ Solidwork 2016 ส่วนที่สองเป็นการจำลองการไหลเบื้องต้นโดยใช้โปรแกรมจำลองการไหลด้วยโปรแกรม COMSOL Multiphysics® version 5.3 ภายใต้คุณสมบัติ และเงื่อนไขข้อกำหนดต่าง ๆ นำผลลัพธ์มาวิเคราะห์ และสรุปเพื่อหาเงื่อนไขที่ส่งผลให้การทดลองมีประสิทธิภาพ และตอบวัตถุประสงค์มากที่สุดอีกทั้งยังเป็นแนวทางในการตีกรอบตัวแปรการศึกษาต่าง ๆ ให้แคบลง เพื่อลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการสร้างชิ้นงานรวมไปถึงการทดลองจริง

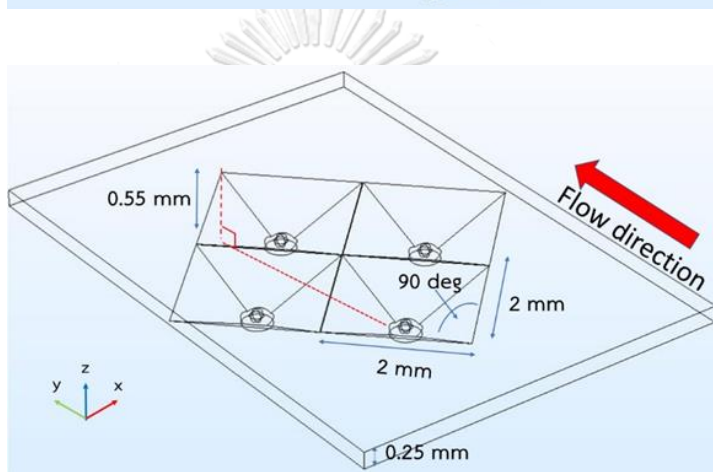
3.1.1 รูปทรงเรขาคณิตหลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด

หลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมีโดยมีทรงกระบอกซ้อนอยู่ในซึ่งมุมของข้าวหลามตัดต่างกัน 3 รูปแบบ คือ มุมแหลม (66 องศา) มุมเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) โมเดลที่ออกแบบในการคำนวณเป็นหลุมที่มีอนุภาคของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่ออยู่ในหลุมขนาดรัศมีประมาณ 0.1 มิลลิเมตร โดยทรงกลมที่อยู่บริเวณกึ่งกลางหลุมนั้นต้องตัดให้เป็นทรงกลมกลวงเนื่องจากโมเดลหลุมที่วาดนั้นเป็นหลุมตันเพื่อจำลองเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cell spheroid) ความลึก และขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางทรงกระบอกตำแหน่งกึ่งกลางของหลุมจุลภาคของแต่ละมุมจะมีค่าเท่ากันคือ 0.55 และ 0.45 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยโมเดลการจำลองการไหลของหลุมจุลภาคแสดงดังรูปที่ 3.1

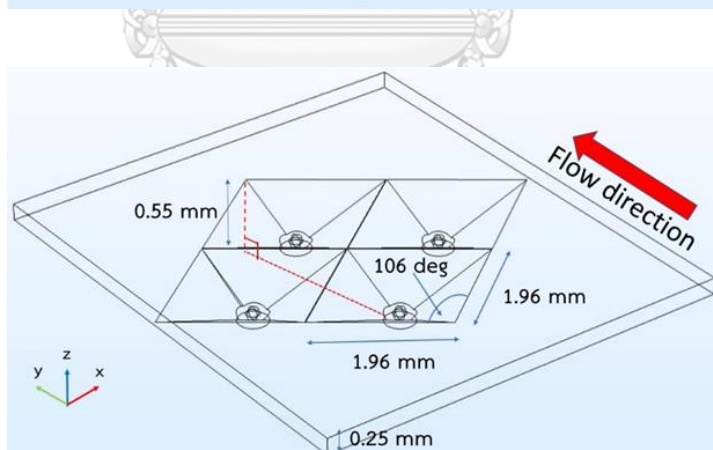
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 3.1 โมเดลจำลองการไหลเรขาคณิตหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดสำหรับ (ก) มุมแหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) และ (ค) มุมป้าน (106 องศา)

3.1.2 การกำหนดคุณสมบัติ

ระบบการคำนวณที่สร้างขึ้นคือรูปร่างของของไหลที่ไหลในระบบของไหลจุลภาค ในการทดลองจริงคืออาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture media) ประกอบไปด้วยแร่ธาตุ และสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเซลล์ ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับสมบัติทางกลของสารนี้ ผู้วิจัยจึงกำหนดให้ของไหลนี้มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำบริสุทธิ์ เนื่องมาจากสารต่าง ๆ ดังกล่าวนั้นอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำ (ความหนาแน่น 998.2 kg/m^3 , ความหนืด 0.001 kg/m s) และเป็นการไหลแบบราบเรียบ (laminar flow) สำหรับค่าสัมประสิทธิ์การละลายของออกซิเจนในน้ำ และของกลูโคสในน้ำมีค่าเท่ากับ 3×10^{-9} และ $9.27 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ตามลำดับ (แสดงในภาคผนวก จ)

3.1.3 การกำหนดเงื่อนไข

การกำหนดเงื่อนไขที่ใกล้เคียงกับสภาวะการทดลองจริง ส่งผลให้ผลลัพธ์การคำนวณที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองมากขึ้น อีกทั้งการกำหนดเงื่อนไขที่ดียังสามารถลดระยะเวลาการคำนวณโดยมีความแม่นยำของผลลัพธ์คงเดิม การคำนวณการกระจายตัวของสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในระบบหลุมจุลภาคจะพิจารณาความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปของสารสองชนิดคือแก๊สออกซิเจน และกลูโคสซึ่งเป็นสารที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ในอันดับต้น ๆ การคำนวณจะใช้สมการการแพร่ (Diffusion) และการพา (Convection) ซึ่งอยู่ในโมดูลสำเร็จรูป Transport of Diluted Species ควบคู่กับสมการการไหลแบบราบเรียบ โดยจะแบ่งการกำหนดเงื่อนไขออกเป็น 4 หัวข้อได้แก่หัวข้อการไหลแบบราบเรียบ ค่าความเข้มข้นออกซิเจน และค่าความเข้มข้นกลูโคส แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เงื่อนไขการจำลองการไหล

Parameter	Value
Well area of 66 degree (mm ²)	4.22
Well area of 90 degree (mm ²)	4
Well area of 106 degree (mm ²)	3.69
The oxygen consumption rate in the cell spheroids (mol m ⁻² s ⁻¹)	9.34×10^{-7}
The glucose consumption rate in the cell spheroids (mol m ⁻² s ⁻¹)	7.03×10^{-6}

The inward oxygen flux through the top PDMS layer (mol m ⁻² s ⁻¹)	5.14 X 10 ⁻⁹
Density (kg/m ³)	998.2
Mesh volume (mm ²)	3.914
Flow rate (μl/hr)	10
Radius of cell spheroid (mm)	0.1
viscosity (kg/(m.s))	0.001

3.1.3.1 การกำหนดเงื่อนไขการไหลแบบราบเรียบ

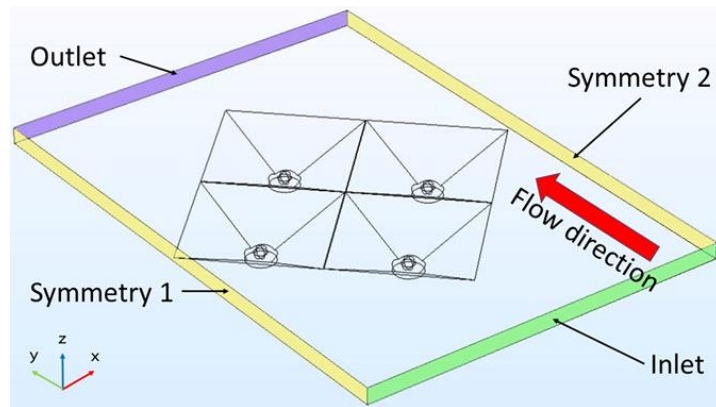
การกำหนดเงื่อนไขการไหลแบบราบเรียบจะมีข้อย่อยดังนี้ ผนัง ทางเข้า สมมาตร และทางออก ตามลำดับ ซึ่งแต่ละหัวข้อย่อยนี้เกิดจากการตั้งค่าในหัวข้อ การไหลราบเรียบ จากนั้นเลือกหัวข้อย่อยดังกล่าว

- ผนัง (Wall) กำหนดให้ผนังของระบบไม่มีการไถล (No-slip condition) นอกเหนือจากสามเงื่อนไขข้างต้นจะเป็นผนังทั้งหมด และไม่แสดงสี

- ทางเข้า (Inlet) กำหนดให้ทางเข้าเป็นการไหลเข้าแบบราบเรียบ ที่อัตราเร็ว 0.888 ไมโครเมตรต่อวินาที และเป็นการไหลที่พัฒนาอย่างสมบูรณ์ (Fully developed) (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ง) แสดงด้วยสีเขียว ในรูปที่ 3.2

- สมมาตร (Symmetry) กำหนดให้ด้านซ้าย และขวาที่มีความสมมาตรโดยระบบจะทราบว่ามีระบบที่เหมือนกันเรียงทางซ้าย และขวาของระบบที่เรา กำลังพิจารณาอยู่ เพื่อลดเวลา และทรัพยากรในการคำนวณเป็นอย่างมากแสดงด้วยสีเหลือง ในรูปที่ 3.2

- ทางออก (Outlet) เป็นการกำหนดพื้นผิวทางออกของของไหล กำหนดให้การไหลทางออกมีลักษณะตั้งฉากกับผิวทางออก (Normal flow) และไม่ให้มีการไหลย้อนกลับ ณ ตำแหน่งนี้ (Suppress back flow)



รูปที่ 3.2 การกำหนดเงื่อนไขขอบเขตในการจำลองการไหล

3.1.3.2 การกำหนดเงื่อนไขของการคำนวณความเข้มข้นออกซิเจน

การกำหนดเงื่อนไขการถ่ายเทของสารเจือจางจะมีข้อย่อยดังนี้ ทางเข้า ออกซิเจนเข้าจากด้านบน การใช้ออกซิเจนโดยเซลล์ สมมาตร และ ทางออก ตามลำดับ ซึ่งแต่ละหัวข้อย่อยนี้เกิดจากการตั้งค่าในหัวข้อ Transport of Diluted Species จากนั้นเลือกหัวข้อย่อยดังนี้

- ทางเข้า (Inflow) กำหนดให้ความเข้มข้นออกซิเจนที่ทางเข้ามีค่า 0.21 mol/m^3 (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ) แสดงด้วยสีชมพู ในรูปที่ 3.3
- ออกซิเจนเข้าจากด้านบน (Flux) กำหนดให้ผนังด้านบนมีการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศภายนอกผ่าน PDMS เข้ามาเป็นไปตามความสัมพันธ์ของสมการด้านล่าง (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ) แสดงด้วยสีเขียว ในรูปที่ 3.3

$$k(C) = \frac{3.79 \times 10^{-11}}{0.00375} \times \left(\frac{1}{0.21 - C} \right) \left(159.6 - \frac{C}{0.00132} \right), \text{ m}^2/\text{s}$$

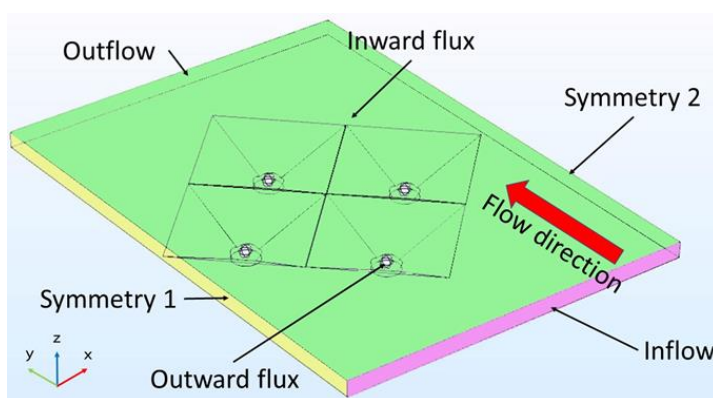
- การใช้ออกซิเจนโดยเซลล์ (Flux) กำหนดให้การใช้ออกซิเจนของเซลล์เป็นการแพร่ออกจากระบบ ที่บริเวณผนังทรงกลม โดยเซลล์ที่อยู่ในหลุมทรงกระบอก และหลุมทรงพีระมิดเป็นเซลล์ไฟโบริบลาสต์ของหนู เป็นไปตามความสัมพันธ์ของสมการด้านล่าง (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ) แสดงด้วยสีน้ำเงิน ในรูปที่ 3.3

$$k(C) = \left(\frac{(2000 \times 6 \times 10^{-17})}{0.00463 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}, \text{ m/s}$$

- สมมาตร (Symmetry) กำหนดให้ผนังด้านซ้าย และขวามีความสมมาตร โดยระบบจะทราบว่ามีระบบที่เหมือนกันเรียงทางซ้าย และขวาของระบบที่เรา กำลังพิจารณาอยู่ เพื่อลดเวลา และทรัพยากรในการคำนวณลงเป็นอย่างมาก แสดงด้วยสีเหลือง ในรูปที่ 3.3

- ทางออก (Outflow) กำหนดให้มีการไหลออกที่ส่วนท้ายของโดเมนเพื่อเป็นไปตามกฎทรงมวล แสดงด้วยสีส้ม ในรูปที่ 3.3

- บริเวณที่ไม่มีการแพร่ของความเข้มข้น (No flux) กำหนดให้ผนังของระบบที่เหลือไม่มีการแพร่ของความเข้มข้นผ่านเข้า-ออก ไม่แสดงสี



รูปที่ 3.3 การกำหนดเงื่อนไขขอบในการคำนวณความเข้มข้นออกซิเจน

3.1.3.3 การกำหนดเงื่อนไขของการคำนวณความเข้มข้นกลูโคส

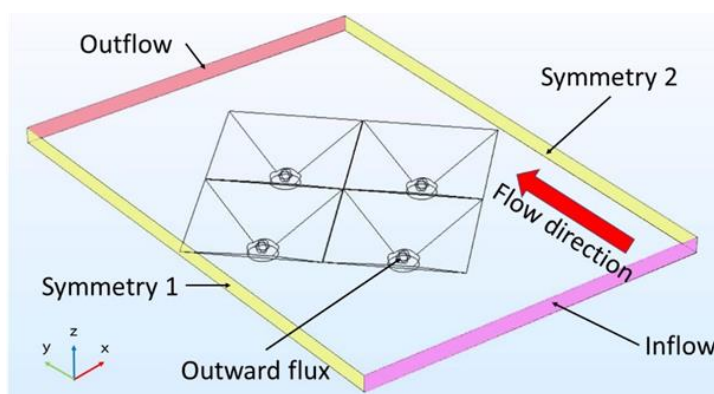
การกำหนดเงื่อนไขการถ่ายเทของสารเจือจางจะมีข้อ้อย่างนี้ ทางเข้า การใช้สารอาหาร กลูโคสโดยเซลล์ สมมาตร และทางออก ตามลำดับ ซึ่งแต่ละหัวข้อนี้เกิดจากการตั้งค่าในหัวข้อ Transport of Diluted Species จากนั้นเลือกหัวข้อข้อ้อย่างนี้

- ทางเข้า (Inflow) กำหนดให้ความเข้มข้นกลูโคสที่ทางเข้ามีค่า 25 mol/m^3 (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ) แสดงด้วยสีชมพู ในรูปที่ 3.4

- การใช้กลูโคสโดยเซลล์ (Flux) กำหนดให้การใช้กลูโคสของเซลล์เป็นการแพร่กลูโคสออกจากระบบ ที่บริเวณผนังทรงกลมเป็นไปตามความสัมพันธ์ของสมการด้านล่าง (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ) แสดงด้วยสีน้ำเงิน ในรูปที่ 3.4

$$k(C) = \left(\frac{(2000 \times 4.42 \times 10^{-16})}{0.004 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}, \text{ m/s}$$

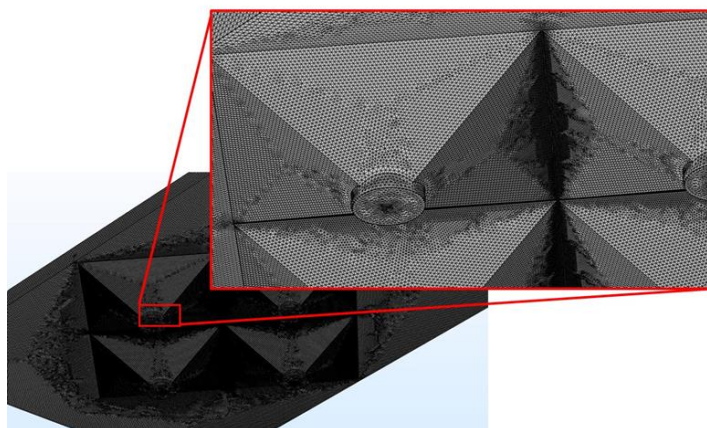
- สมมาตร (Symmetry) กำหนดให้ผนังด้านซ้าย และขวามีความสมมาตร โดยระบบจะทราบว่ามีระบบที่เหมือนกันเรียงทางซ้าย และขวาของระบบที่เรา กำลังพิจารณาอยู่ เพื่อลดเวลา และทรัพยากรในการคำนวณเป็นอย่างมาก แสดงด้วยสีเหลือง ในรูปที่ 3.4
- ทางออก (Outflow) กำหนดให้มีการไหลออกที่ส่วนท้ายของโดเมนเพื่อเป็นไปตามกฎทรงมวล แสดงด้วยสีส้ม ในรูปที่ 3.4
- บริเวณที่ไม่มีการแพร่ของความเข้มข้น (No flux) กำหนดให้ผนังของระบบที่เหลือไม่มีการแพร่ของความเข้มข้นผ่านเข้า-ออก ไม่แสดงสี



รูปที่ 3.4 การกำหนดเงื่อนไขขอบในการคำนวณความเข้มข้นกลูโคส

3.1.3.4 การกำหนดเงื่อนไขการตั้งค่าเมช

การกำหนดเมชจะทำการกำหนดความละเอียดเมชของภาพรวมระบบในหัวข้อ Finer โดยรูปร่างเมชเป็นรูปร่างสามเหลี่ยม (Tetrahedron) เนื่องจากเมชรูปร่างสามเหลี่ยมจะให้ความละเอียดของเมชมากกว่าเมชรูปร่างอื่น และกำหนดความละเอียดเมชในหลุมสูงกว่าบริเวณอื่นเนื่องจากบริเวณหลุมเป็นจุดสนใจ และเป็นจุดสำคัญในการพิจารณาการไหล และค่าอื่น ๆ โดยการกำหนดการกระจายตัวของเมชเพิ่มขึ้นมา เพิ่มบนขอบของหลุมสามเหลี่ยม ส่งผลให้จำนวนเอลิเมนต์ของเมช ณ บริเวณนั้นมีความหนาแน่นมากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.5 จากนั้นทำการศึกษาให้มั่นใจว่าการเพิ่มจำนวนเอลิเมนต์จากเงื่อนไขนี้แทบจะไม่ส่งผลต่อผลการคำนวณอีกต่อไป (Grid independent study) เพื่อยืนยันว่าผลลัพธ์ที่ได้ และจำนวนเอลิเมนต์ที่มี อยู่ภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสม และเชื่อถือได้ต่อการวิเคราะห์ต่อไปโดยจำนวนเมชของโมเดลอยู่ที่ประมาณ 2,500,000 – 3,000,000 สำหรับกรณีช่องการไหล อย่างไรก็ตามการใช้คำสั่งกำหนดการกระจายตัวของเมชอาจส่งผลต่อเมชที่อยู่ตำแหน่งติดกันแต่มีขนาดของเมชแตกต่างกันมากเกินไปทำให้การคำนวณมีผลคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงได้



รูปที่ 3.5 รูปแบบความละเอียดของการตีเมช โดยเส้นสีแดงของภาพขยายทางด้านขวาเป็นส่วนของการเพิ่มความหนาแน่นของเมช

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสรุปพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณดังตารางที่ 3 โดยการสมการที่ใช้ในการคำนวณการไหลคือ สมการนาเวียร์ - สโตกส์

3.2 ผลการจำลองการไหล

ผลจากการจำลองการไหลใช้การแสดงผลผ่านการพล็อตเส้นการไหล (Streamlines) และเส้นสีแดงแสดงเค้าโครง (Contour) ของการหมุนวน (Vorticity) และดัชนีอื่น ๆ ภายในหลุม และช่องการไหลตามความเหมาะสมของข้อมูลนั้น ๆ ภายใต้คุณสมบัติ และเงื่อนไขข้อกำหนดต่าง ๆ เพื่อตอบวัตถุประสงค์มากที่สุดอีกทั้งยังเป็นแนวทางในการตีกรอบตัวแปรการศึกษาต่าง ๆ ให้แคบลง เพื่อลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการสร้างชิ้นงานรวมไปถึงการทดลองจริง

3.2.1. การเคลื่อนที่ของของไหลผ่านตำแหน่งต่าง ๆ ของหลุม

ตำแหน่งที่พิจารณาการไหลของของไหลคือ ตำแหน่ง $X = 0$ (กึ่งกลางหลุม) ผนังแนวตั้งกึ่งกลางระหว่างระยะจากผนังแนวตั้งหลุมถึงขอบหลุม และขอบหลุม ตามลำดับ

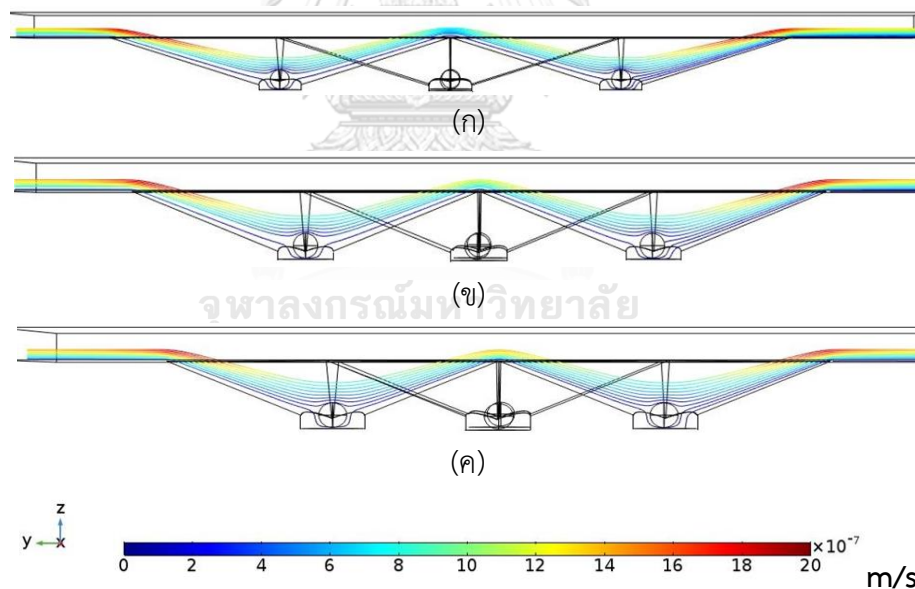
- การไหลผ่านหลุมที่ตำแหน่ง $X = 0$

ผลการคำนวณแสดงเส้นการไหลที่เคลื่อนที่เข้าไปภายในหลุมทรงพีระมิดทั้งสามที่มีมุมแตกต่างกัน เมื่อของไหลเคลื่อนที่ตามทิศทางแกน Y ผ่านหลุม ของไหลตำแหน่งใกล้พื้นช่องการไหลจะเคลื่อนที่ลงสู่หลุมสำหรับของไหลตำแหน่งนอกเหนือจากพื้นจะไหลผ่านไปชนกับผนังเอียงแล้วออกไปทางท้ายหลุม

มุม 66 องศา: เส้นการไหลที่ไหลเข้าสู่หลุมมีความเร็วเฉลี่ยทั้งระนาบ ZY มากที่สุดเท่ากับ 0.899 ไมโครเมตรต่อวินาที ที่ผนังเอียงมีเส้นการไหลลงมาตามความเอียงของผนังก่อนไหลลงสู่หลุมผนังตั้งที่โดยความเร็วภายในหลุมดังกล่าวมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.12 ไมโครเมตรต่อวินาที และเส้นการไหลลงไปถึงก้นหลุมก่อนชนผนังตั้งท้ายหลุม และเคลื่อนที่ออกจากหลุมไปโดยไม่มีการหมุนวนของเส้นการไหลเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.6 (ก)

มุม 90 องศา: เส้นการไหลที่ไหลเข้าสู่หลุมมีความเร็วเฉลี่ยทั้งระนาบ ZY มากที่สุดเท่ากับ 0.856 ไมโครเมตรต่อวินาที ที่ผนังเอียงมีเส้นการไหลลงมาตามความเอียงของผนัง ก่อนจะไหลลงสู่หลุมที่มีผนังอยู่ในแนวตั้งที่โดยความเร็วภายในหลุมดังกล่าวมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.1 ไมโครเมตรต่อวินาที และเส้นการไหลเหมือนกับหลุมจุลภาคมุม 66 องศา ดังแสดงในรูปที่ 3.6 (ข)

มุม 106 องศา: เส้นการไหลที่ไหลเข้าสู่หลุมมีความเร็วเฉลี่ยทั้งระนาบ ZY มากที่สุดเท่ากับ 0.833 ไมโครเมตรต่อวินาที ที่ผนังเอียงมีเส้นการไหลลงมาตามความเอียงของผนังก่อนจะไหลลงสู่หลุมที่มีผนังอยู่ในแนวตั้งที่โดยความเร็วภายในหลุมดังกล่าวมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.8 ไมโครเมตรต่อวินาที และเส้นการไหลเหมือนกับหลุมจุลภาคมุม 66 และ 90 องศา ดังแสดงในรูปที่ 3.6 (ค)



รูปที่ 3.6 แสดงผลการจำลองการไหลของเส้นความเร็วตำแหน่งกึ่งกลางหลุม ($X = 0$) ของหลุมจุลภาค

(ก) มุมแหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) (ค) มุมป้าน (106 องศา)

- การไหลผ่านหลุมที่ตำแหน่ง $X =$ ผนังแนวตั้ง

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงเส้นการไหลที่เคลื่อนที่ผ่านหลุมจุลภาคทรงพีระมิตทั้ง 3 รูปร่าง พบว่าเส้นการไหลของของไหลเคลื่อนที่เข้าหากึ่งกลางหลุม หลังจากนั้นเส้นการไหลเบนเข้าหา

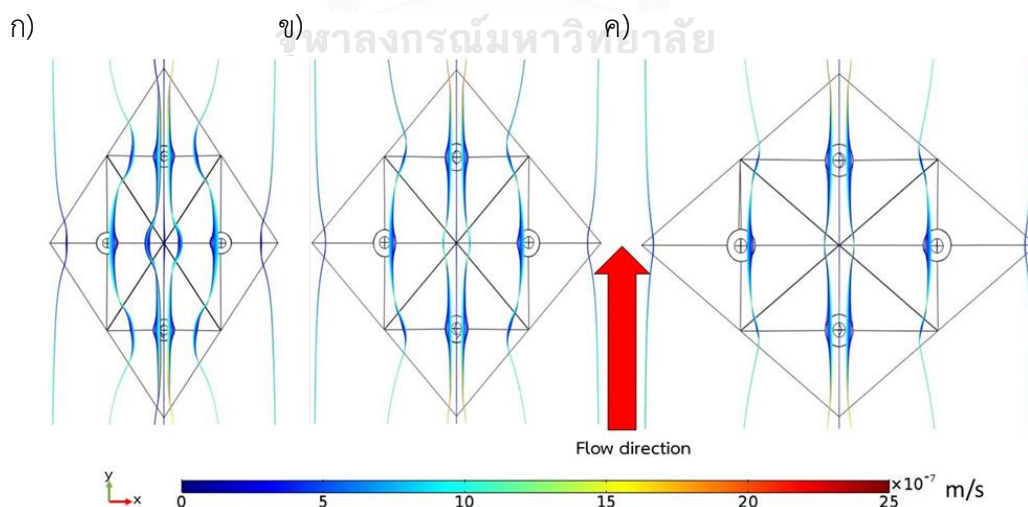
แนวการไหลเดิมก่อนที่จะเคลื่อนที่ลงมาในหลุมแถวถัดไป เป็นเช่นนี้ในหลุมทั้ง 3 รูปร่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ก)-(ค)

- การไหลผ่านหลุมที่ตำแหน่ง X = กึ่งกลางระหว่างระยะจากผนังแนวตั้งหลุมถึงขอบหลุม

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงเส้นการไหลที่เคลื่อนที่เข้าไปภายในหลุมทรงพีระมิดทั้งสามที่มีมุมแตกต่างกัน เมื่อของไหลเคลื่อนที่ผ่านหลุมจุลภาคมุมแหลม (66 องศา) พบว่าตำแหน่งหลุมแถวแรก ของไหลมีการเบี่ยงเบนเข้าหาที่กึ่งกลางค่อนข้างมาก หลังจากไหลผ่านหลุมแถวแรก แล้วของไหลจะเบี่ยงเบนเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมในแถวถัดไป ลักษณะเส้นทางการไหลของของไหลผ่านหลุมจุลภาคมุม 66 องศา จะมีลักษณะเป็นตัว S ในขณะที่เส้นทางการไหลที่ไหลผ่านหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา มีการเบี่ยงเบนเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมน้อยกว่ามุม 66 องศา อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ก)-(ค)

- การไหลผ่านหลุมที่ตำแหน่ง X = ขอบหลุม

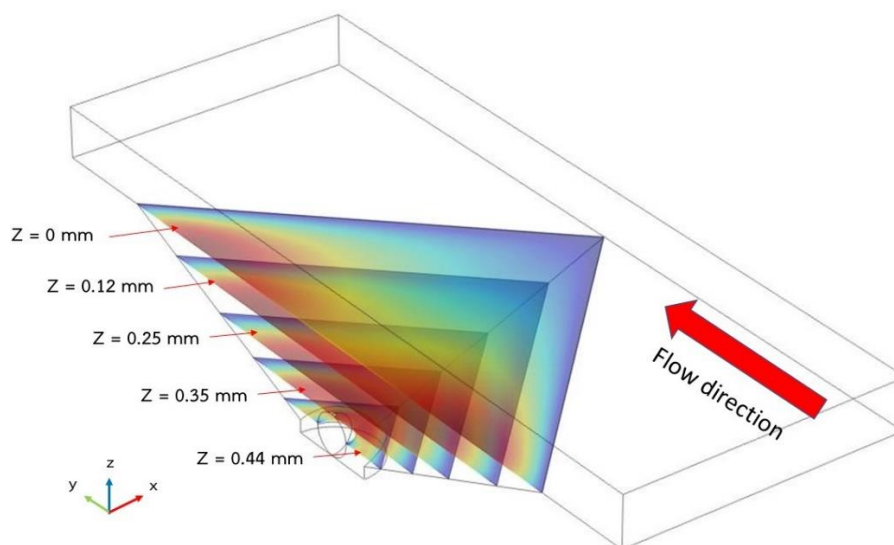
ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงเส้นการไหลที่เคลื่อนที่เข้าไปภายในหลุมทรงพีระมิดทั้งสามที่มีมุมแตกต่างกัน มีความคล้ายคลึงกับเส้นการไหลของตำแหน่งขอบหลุม แต่ต่างกันตรงที่เส้นการไหลที่เกิดจากหลุมที่หันมุมป้าน (106 องศา) เข้าหาการไหลนั้นมีเส้นการไหลเบนเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมน้อยกว่าหลุมจากมุม 90 และ 106 องศา อย่างเห็นได้ชัด ก่อนที่จะเบนกลับเข้าแนวการไหลเดิมแล้วออกไปทางท้ายหลุม และไม่มีการหมุนวนของเส้นการไหลเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ก)-(ค) ซึ่งการเบี่ยงเบนของเส้นทางการไหลจะแสดงให้เห็นถึง การพาอาหารไปให้เซลล์ ค่าความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นกับเซลล์ และความเร็วของไหลภาคในหลุม มีค่าแตกต่างกัน



รูปที่ 3.7 โครงสร้างการไหลเมื่อของไหลเคลื่อนที่ผ่านหลุมจุลภาคมุม (ก) มุมแหลม (66 องศา) (ข) มุมเท่า (90 องศา) (ค) มุมป้าน (106 องศา)

3.2.2 การกระจายตัวความเร็ว และการหมุนที่ระนาบต่าง ๆ

การแสดงผลกระจายตัวความเร็ว และการหมุนนั้นจะแสดงผลเป็นระนาบแกน XY ความลึก 0 (ปากหลุมผนังเอียง), 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร ของหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่างคือ มุมแหลม (66 องศา) มุมเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) ดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ตำแหน่งบนระนาบ XY เพื่อวิเคราะห์ผลการจำลองที่ความลึก 0 (ปากหลุมผนังเอียง), 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร

3.2.2.1 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบต่าง ๆ

การพิจารณาความเร็วเฉลี่ยต่อพื้นที่ที่ระนาบความลึกสามระดับคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร เพื่อเปรียบเทียบว่าที่ความลึกต่าง ๆ นั้นแต่ละหลุมมีความเร็วเฉลี่ยเป็นอย่างไร ซึ่งความเร็วตามระนาบความลึกจะส่งผลต่อนำอาหารไปให้เซลล์บริเวณก้นหลุมเป็นอย่างมาก

- ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดที่ความลึก 0.44 มิลลิเมตร

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงขนาดความเร็วเฉลี่ยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งความลึก 0.44 มิลลิเมตร พบว่าขนาดความเร็วของของไหลเฉลี่ยบริเวณรอบ ๆ เซลล์ของหลุมรูปร่างพีระมิดมุม 66 องศา มีค่ามากที่สุดคือ 5.705×10^{-8} เมตรต่อวินาที สำหรับมุม 90 และ 106 องศา มีขนาดความเร็วเฉลี่ย 5.216×10^{-8} และ 3.237×10^{-8} เมตรต่อวินาที ซึ่งความเร็วของของไหลบริเวณรอบ ๆ เซลล์นี้แสดงให้เห็นถึงการนำอาหารมาให้เซลล์บริเวณก้นหลุมดังแสดงรูปที่ 3.9 ก

- ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดที่ความลึก 0.35 มิลลิเมตร

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงขนาดความเร็วเฉลี่ยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งความลึก 0.35 มิลลิเมตร พบว่า ความเร็วของของไหลเฉลี่ยที่ระนาบความลึก 0.35 มิลลิเมตร ของหลุมจุลภาคมุม

แหลม มุมเท่า และมุมป้าน คือ 2×10^{-7} , 1.81×10^{-8} และ 1.34×10^{-8} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ ซึ่งความเฉื่อยนี้จะสูงกว่าความเฉื่อยที่ระนาบความลึก 0.44 มิลลิเมตร ในทุก ๆ รูปร่างของหลุมจุลภาค แสดงดังรูปที่ 3.9 ข

- ความเร็วเฉื่อยทั้งหมดที่ความลึก 0.25 มิลลิเมตร

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงขนาดความเร็วเฉื่อยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งความลึก 0.25 มิลลิเมตร ว่าเมื่อของไหลลงสู่หลุมจุลภาคขนาดความเร็วของของไหลจะสูงที่สุด ณ ตำแหน่งมุมกึ่งกลางหลุมค่อนข้างสูงกว่าด้านข้างของหลุม ลักษณะขนาดความเร็วที่ผ่านหลุมมีความสมมาตร โดยขนาดความเร็วเฉื่อยบนระนาบ XY ของของไหลที่ผ่านหลุมที่มีมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 4.07×10^{-7} , 3.722×10^{-7} และ 3.186×10^{-7} เมตรต่อวินาที ดังแสดงรูปที่ 3.9 ค

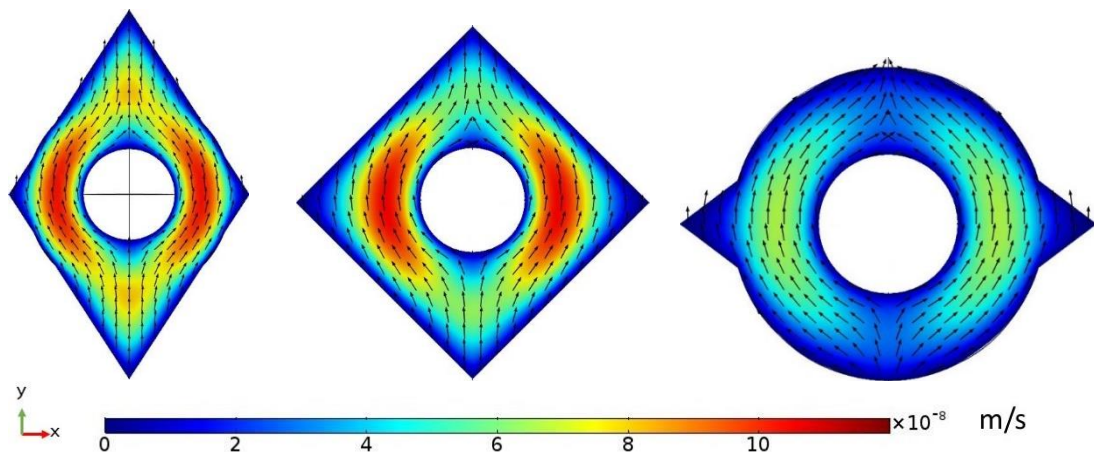
- ความเร็วเฉื่อยทั้งหมดที่ความลึก 0.12 มิลลิเมตร

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงขนาดความเร็วเฉื่อยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งความลึก 0.12 มิลลิเมตร พบว่าความเร็วของของไหลเฉื่อยที่ระนาบความลึก 0.12 มิลลิเมตร ของหลุมจุลภาคมุมแหลม มุมเท่า และมุมป้าน คือ 5.8×10^{-7} , 5.3×10^{-8} และ 4.9×10^{-8} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ ซึ่งในตำแหน่งกึ่งกลางหลุมจุลภาคมีความเร็วสูงกว่าบริเวณขอบหลุมสังเกตได้จากสีแดงที่แสดงผลการจำลองการไหล ดังรูปที่ 3.9

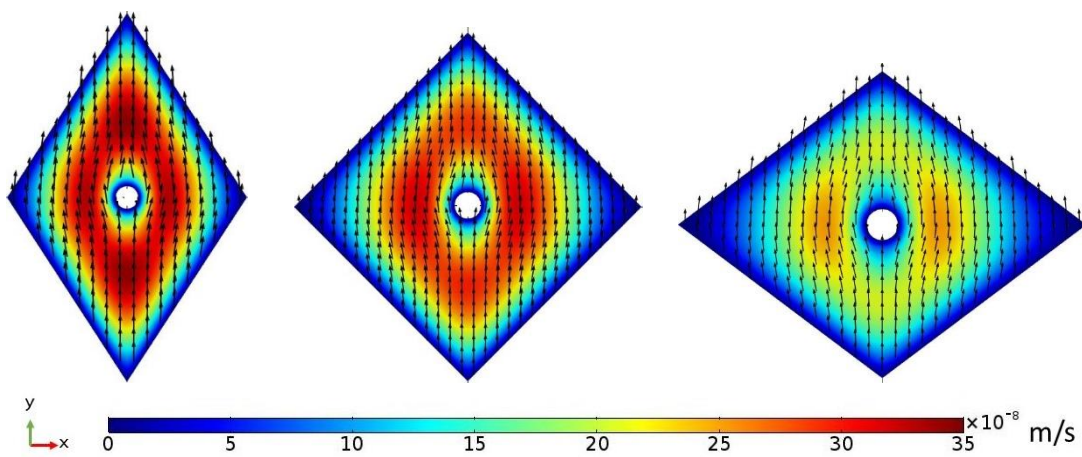
- ความเร็วเฉื่อยทั้งหมดที่ความลึก 0 มิลลิเมตร (ปากหลุมผนังเอียง)

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงขนาดความเร็วเฉื่อยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งปากหลุมผนังเอียงว่า เมื่อของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาค ขนาดความเร็วของของไหลจะสูงที่สุด ณ ตำแหน่งมุมด้านหน้าหลุม หลังจากนั้นความเร็วจะลดลงบริเวณกึ่งกลางหลุมและสูงขึ้นอีกบริเวณด้านท้ายของหลุม โดยขนาดความเร็วเฉื่อยบนระนาบ XY ของของไหลที่ผ่านหลุมที่มีมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 7.7×10^{-7} , 7.4×10^{-7} และ 7.2×10^{-7} เมตรต่อวินาที ดังแสดงรูปที่ 3.9

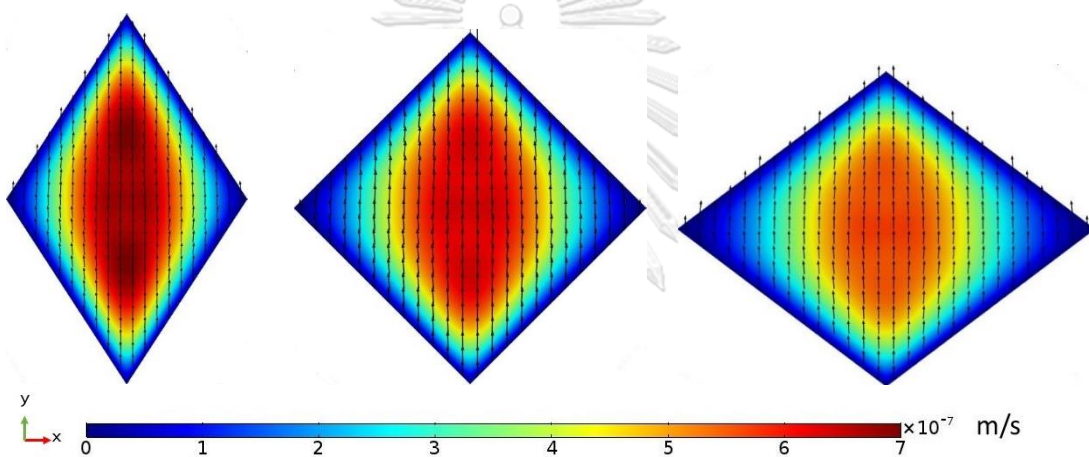
(ก)



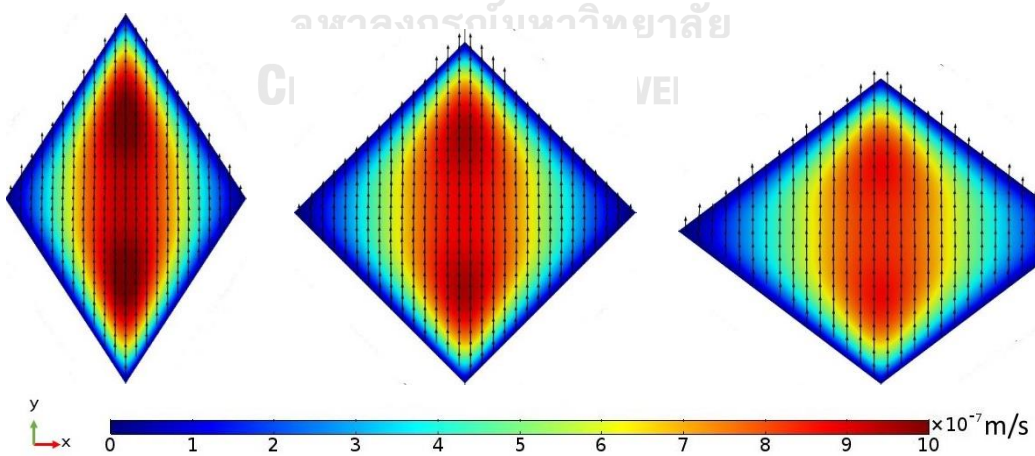
(จ)



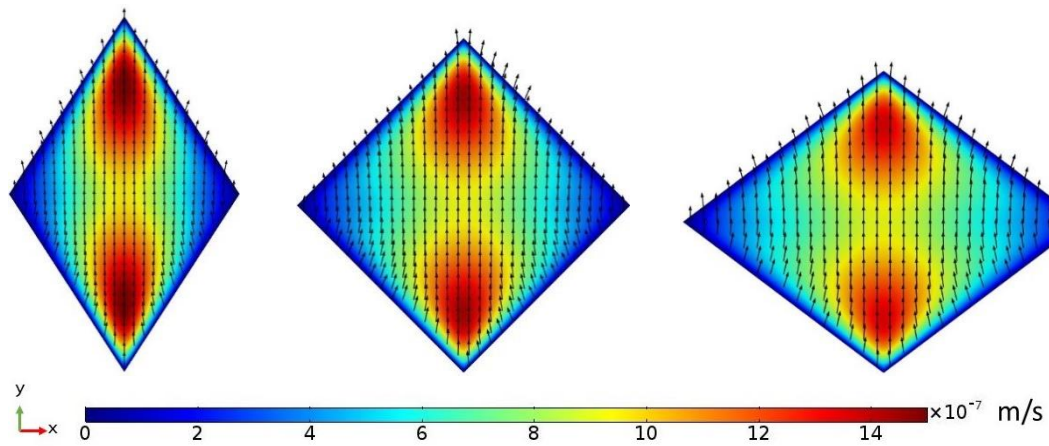
(ค)



(ง)

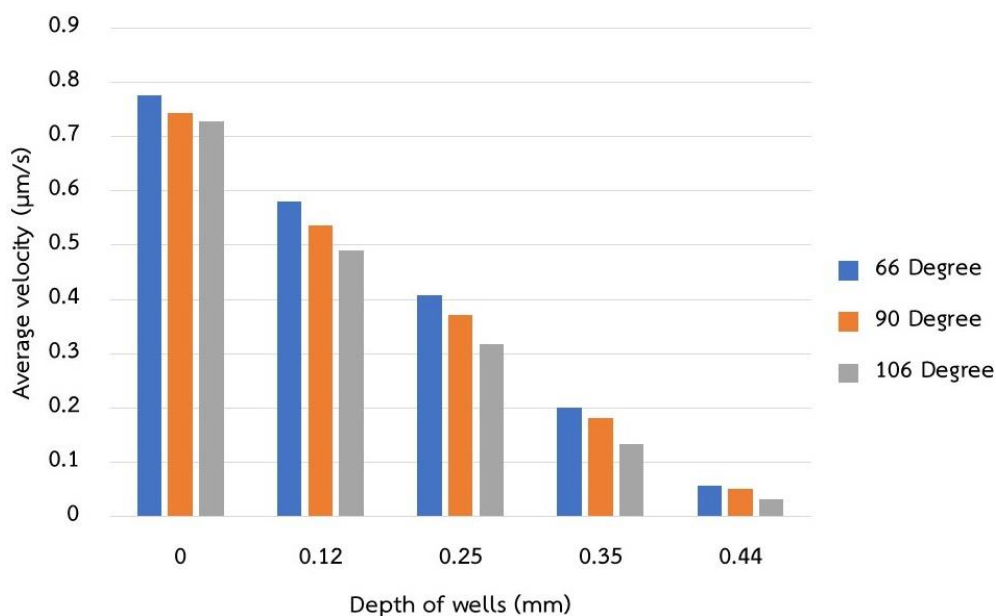


(จ)



รูปที่ 3.9 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดบนระนาบ XY ที่ของหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (จ) 0 มิลลิเมตร

ผลพิจารณาความเร็วเฉลี่ยต่อพื้นที่ที่ระนาบความลึกห้าระดับคือ 0.44, 0.35, 0.25, 0.12 และ 0 มิลลิเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจในการแสดงผล และเปรียบเทียบว่าที่ความลึกต่าง ๆ นั้นแต่ละหลุมมีความเร็วเฉลี่ยเป็นอย่างไร โดยหลุมที่มีมุม 66 องศา มีความเร็วเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือมุม 90 และ 106 องศา ตามลำดับ ที่ตำแหน่งระนาบ 0.44 มิลลิเมตร มีความเร็วเฉลี่ยของของไหลที่มุม 106 องศา เป็นค่าเพียงครึ่งหนึ่งของหลุมมุม 66 องศา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า หลุมมุม 106 องศา มีการนำอาหารลงไปให้เซลล์ที่ก้นหลุมน้อยที่สุด เส้นการไหลเข้าไปในบริเวณผนังตั้งเหมือนกันทุกหลุม ทำให้มีโอกาสที่เซลล์จะตกลงไปในหลุมเหมือนกันทุกแบบ รวมไปถึงการนำอาหารไปเลี้ยงเซลล์ภายในหลุมจุลภาค และความเร็วของของไหลจะมีแนวโน้มที่ลดลงตามความลึกของหลุมจุลภาค ดังแสดงในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคกับ ระบายความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z = 0 มิลลิเมตร

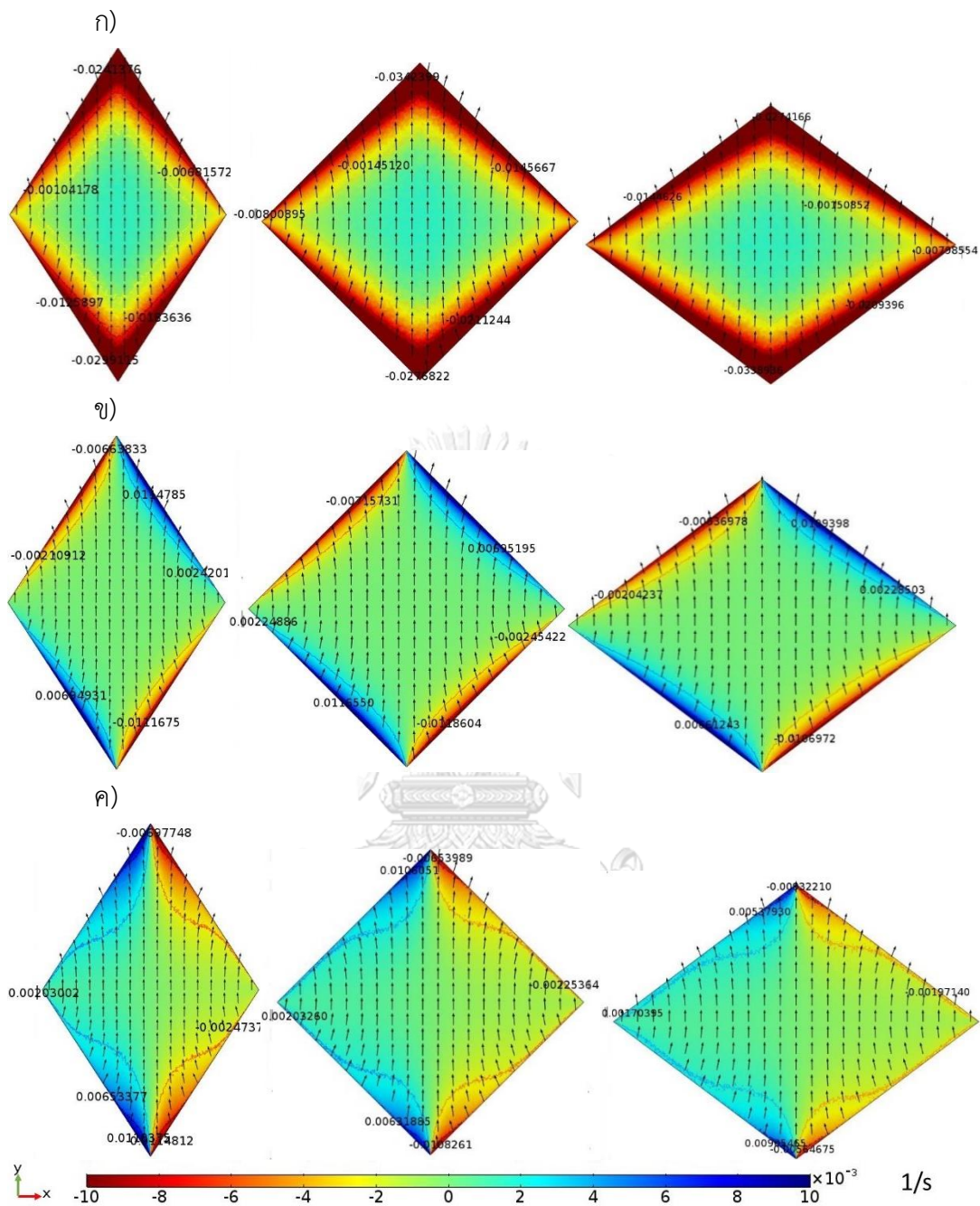
3.2.2.2 การกระจายตัวการหมุนที่ตำแหน่งระบายต่าง ๆ

- การหมุนวนที่ความลึกเท่ากับ 0 มิลลิเมตร (ปากหลุมผนังเอียง)

แกน X: เกิดการหมุนในทิศ -X ขึ้นที่บริเวณใกล้กับขอบด้านข้าง มีขนาดการหมุนวนสูงที่สุด ประมาณ 0.07 s^{-1} เท่ากันทั้งสามรูปแบบ ที่ระยะห่างจากขอบหลุมเข้าหากกลางหลุมขนาดการหมุนมีค่าลดลงจนเป็นศูนย์จากนั้นกลับทิศการหมุนที่กลางหลุมขนาดเล็กกว่าขนาดบริเวณขอบ โดยขนาดการหมุนที่กึ่งกลางหลุมดังกล่าวเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ หลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา (ขนาด และทิศทางสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวา) ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (ก)

แกน Y: การหมุนวนในช่วงต้นมีแกนการหมุนตรงข้ามกับทิศการไหล เกิดขึ้นบริเวณขอบหลุมด้านข้างแผ่นที่แคบ ขนาดการหมุนวนสูงสุด 0.02 s^{-1} อยู่ใกล้ขอบ และลดลงเมื่อห่างจากขอบหลุมออกมา และลดขนาดลงจนเป็นศูนย์บริเวณกลางหลุมแผ่นที่ครอบคลุมเกือบทั้งหลุม ขอบหลุมช่วงตอนกลางขนาดการหมุนเข้าใกล้ศูนย์ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นช่วงท้ายหลุม โดยขนาดมีความสมมาตรกับช่วงต้นหลุมเพียงแต่กลับทิศการ ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (ข)

แกน Z: การหมุนในทิศ -Z เกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุมช่วงต้นใกล้มุมยอดขนาดสูงสุด 0.02 s^{-1} อยู่ใกล้ขอบ จากนั้นลดขนาดลงจนเกือบเป็นศูนย์ แผ่นที่กว้างช่วงกลางหลุม และขอบหลุมด้านข้างก่อนจะเพิ่มขนาดขึ้นในช่วงท้าย โดยมีความสมมาตรกับช่วงต้นหลุมทุกประการ (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (ค)



รูปที่ 3.11 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z

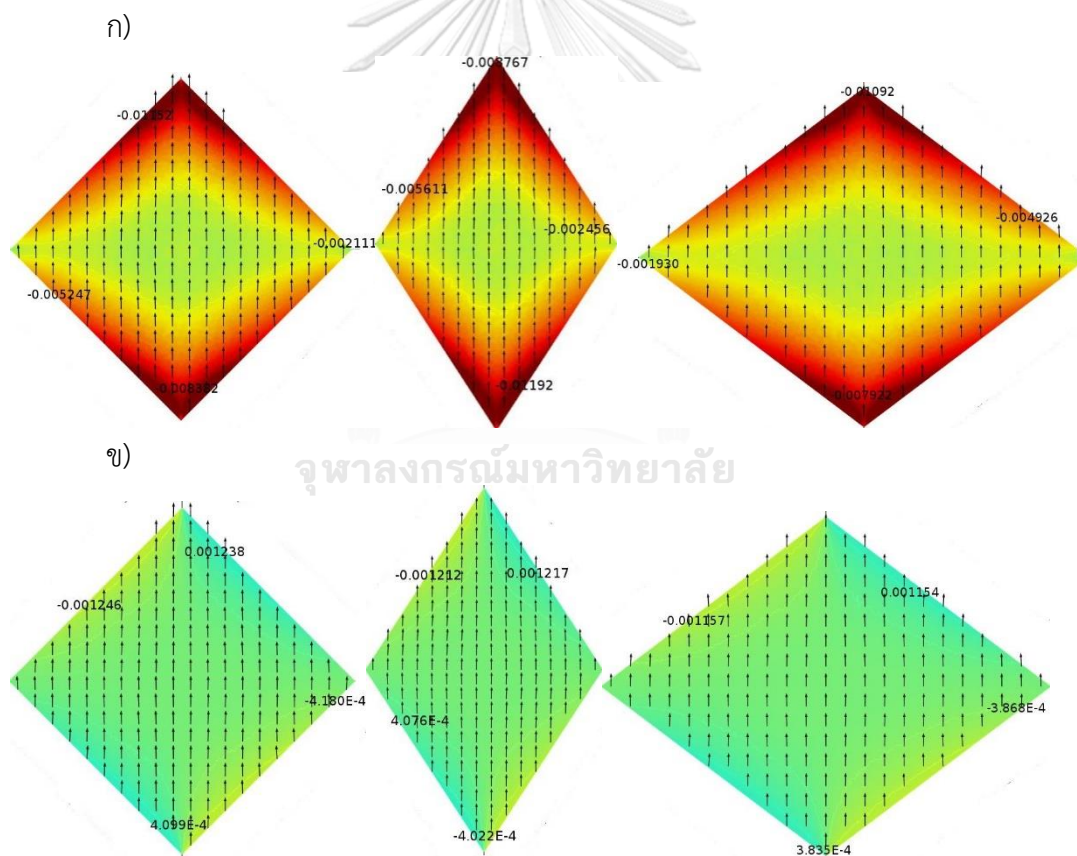
- การหมุนวนที่ความลึกเท่ากับ 0.12 มิลลิเมตร

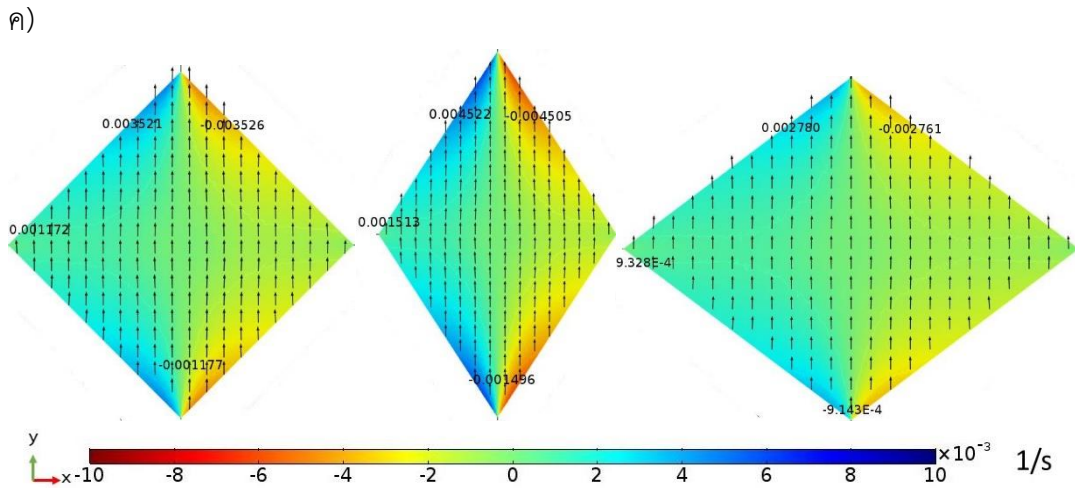
แกน X: เกิดการหมุนในทิศ $-X$ ขึ้นที่บริเวณใกล้กับขอบด้านข้าง มีขนาดการหมุนวนสูงที่สุด ประมาณ 0.002 s^{-1} ทั้งสามรูปแบบ โดยขนาดการหมุนที่ครอบคลุมกลางหลุมดังกล่าวเรียงลำดับจาก

มากไปน้อยได้ดังนี้ มุม 66 90 และ 106 องศา (ขนาด และทิศทางสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวา) ดังแสดงในรูปที่ 3.12 (ก)

แกน Y: การหมุนวนในช่วงต้นมีแกนการหมุนตรงข้ามกับทิศการไหล เกิดขึ้นบริเวณขอบหลุม ด้านข้าง และขนาดลดลงเมื่อออกห่างจากขอบหลุม ช่วงกลางหลุมขนาดการหมุนลดลงจนเป็นศูนย์ หลุมจุลภาคมุม 66 องศา มีขนาดการหมุนสูงที่สุด รองลงมาเป็นหลุมมุม 90 และ 106 องศา ตามลำดับ (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.12 (ข)

แกน Z: การหมุนในทิศ -Z เกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุมช่วงต้นใกล้มุมยอด จากนั้นลดขนาดลงจนเกือบเป็นศูนย์ โดยมีความสมมาตรกับช่วงต้นหลุมทุกประการ ขนาดการหมุนของหลุมจุลภาคมุม 66 องศา มากกว่าหลุมมุม 90 และ 106 องศา (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.12 (ค)





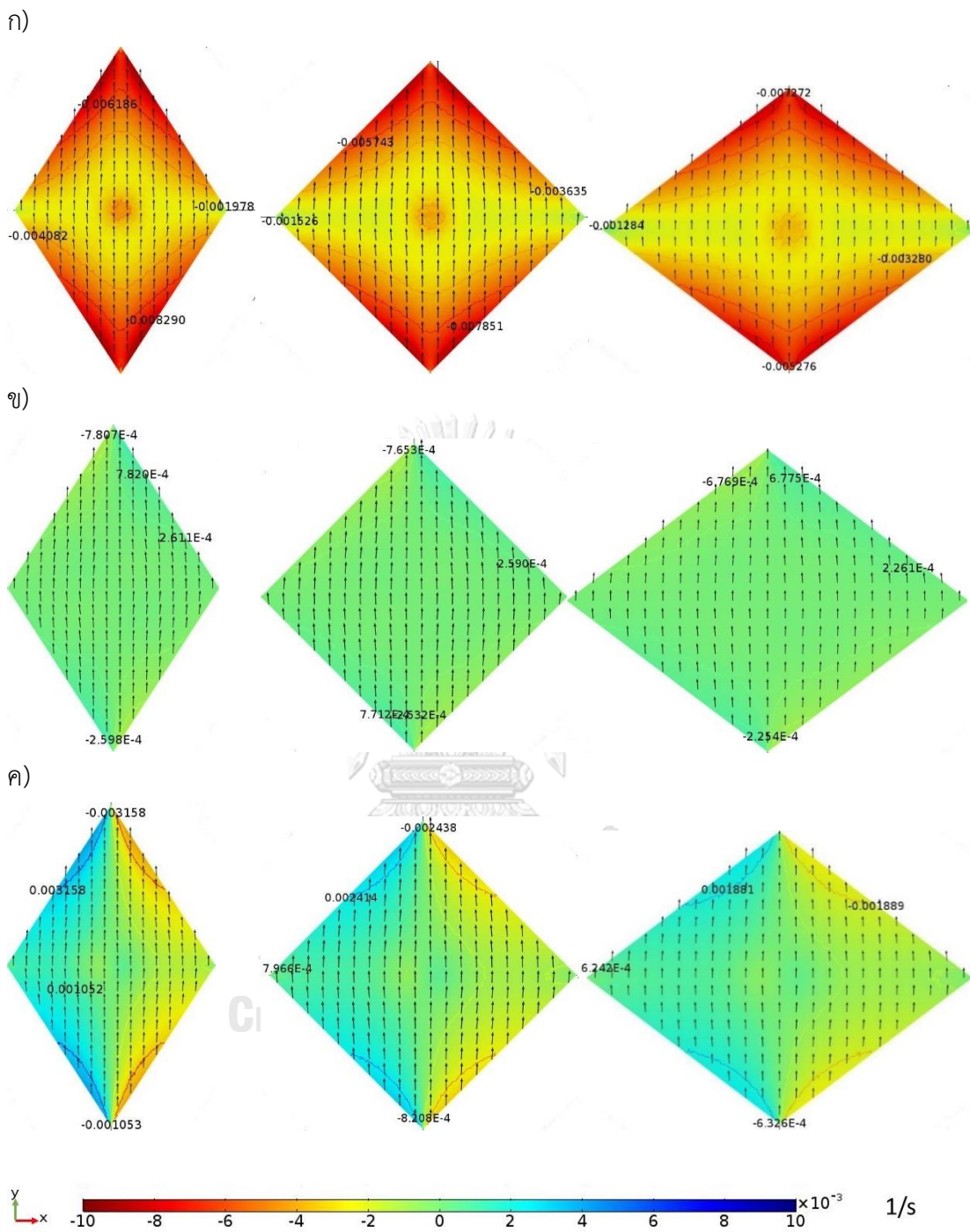
รูปที่ 3.12 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.12 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z

- การหมุนวนที่ความลึกเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร

แกน X: เกิดการหมุนในทิศ $-X$ ขึ้นที่บริเวณใกล้กับขอบด้านข้าง มีขนาดการหมุนวนสูงที่สุดประมาณ 0.02 s^{-1} เท่ากันทั้งสามรูปแบบ ที่ระยะห่างจากขอบหลุมเข้าหากกลางหลุมขนาดการหมุนมีค่าลดลงจนเป็นศูนย์จากนั้นก็กลับทิศการหมุนที่กลางหลุมโดยมีขนาดเล็กกว่าขนาดบริเวณขอบ โดยขนาดการหมุนที่ครอบคลุมกลางหลุมดังกล่าวเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ มุม 66 90 และ 106 องศา (ขนาด และทิศทางสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวา) ดังแสดงในรูปที่ 3.13 (ก)

แกน Y: การหมุนวนในช่วงต้นมีแกนการหมุนตรงข้ามกับทิศการไหล เกิดขึ้นบริเวณขอบหลุมด้านข้างแผ่พื้นที่แคบมาก และขนาดลดลงเมื่อออกห่างจากขอบหลุม ช่วงกลางหลุมขนาดการหมุนลดลงจนเป็นศูนย์บริเวณกลางหลุมแผ่พื้นที่ครอบคลุมเกือบทั้งหลุม ขอบหลุมช่วงตอนกลางขนาดการหมุนเข้าใกล้ศูนย์ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นช่วงท้ายหลุม โดยขนาดมีความสมมาตรกับช่วงต้นหลุมเพียงแต่กลับทิศการหมุน หลุมที่มีมุม 66 องศา มีขนาดการหมุนสูงที่สุด รองลงมาเป็นหลุมมุม 90 และ 106 องศา ตามลำดับ (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.13 (ข)

แกน Z: การหมุนในทิศ $-Z$ เกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุมช่วงต้นใกล้มุมยอด จากนั้นลดขนาดลงจนเกือบเป็นศูนย์ แผ่พื้นที่กว้างช่วงกลางหลุม และขอบหลุมด้านข้างก่อนจะเพิ่มขนาดขึ้นในช่วงท้าย โดยมีความสมมาตรกับช่วงต้นหลุมทุกประการ ขนาดการหมุนของหลุมมุม 66 องศา มากกว่าหลุมมุม 90 และ 106 องศา (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.13 (ค)



รูปที่ 3.13 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.25 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z

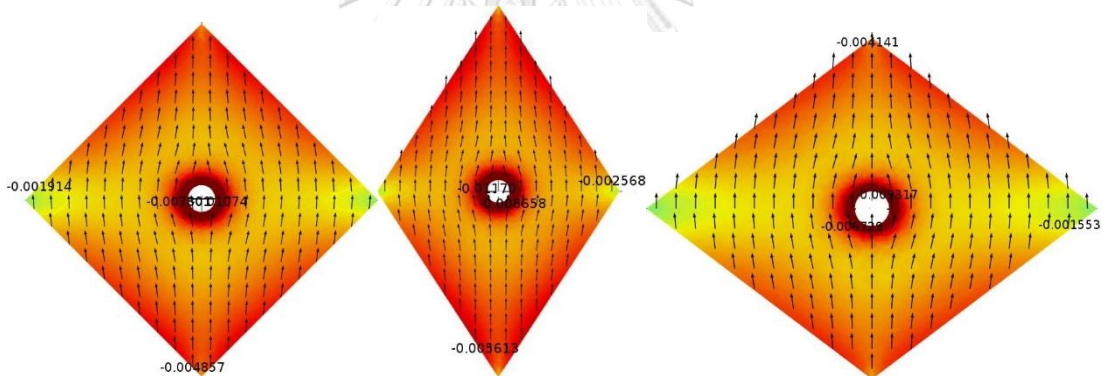
- การหมุนวนที่ความลึกเท่ากับ 0.35 มิลลิเมตร

แกน X: การหมุนวนมีทิศ -X เกิดขึ้นตั้งแต่บริเวณตอนต้นของหลุมจะเกิดขึ้นบริเวณขอบของหลุม และบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ ขนาดของการหมุนวนมากที่สุดคือหลุมมุม 66 องศา รองลงมาคือ 90 และ 106 องศา ตามลำดับ (ขนาด และทิศทางสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวา) ดังแสดงในรูปที่ 3.14 (ก)

แกน Y: ลักษณะการหมุนวนเกิดขึ้นที่บริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เท่านั้นสังเกตได้จากผลจำลองการไหลบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เป็นสีฟ้า และนอกเหนือจากบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะมีการหมุนวนในแกน Y น้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 3.14 (ข)

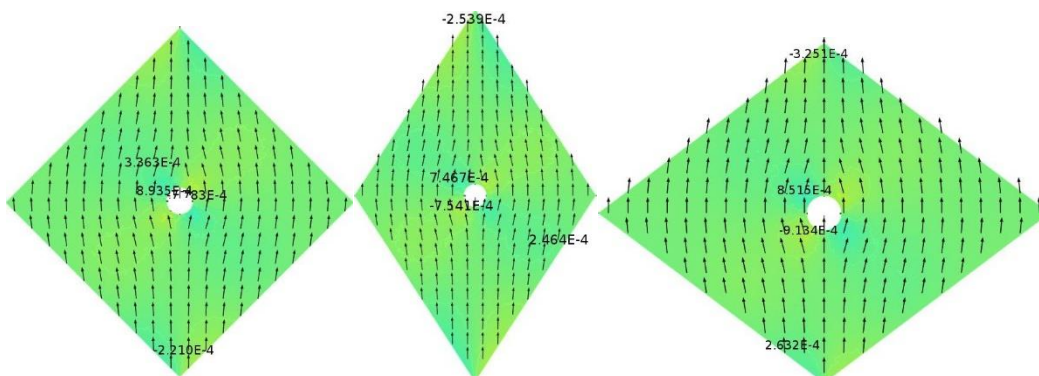
แกน Z: การหมุนวนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุม และรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ หลุมมุม 66 องศา มีพื้นที่การหมุนวนครอบคลุมแนวขอบหลุม และขนาดของการหมุนวนมากที่สุด รองลงมาคือหลุมมุม 90 และ 106 องศา บริเวณรอบ ๆ เซลล์ทางด้านขวาจะมีทิศการหมุนวน +Z และทางด้านซ้ายมีทิศการหมุนวน -Z ดังแสดงในรูปที่ 3.14 (ค)

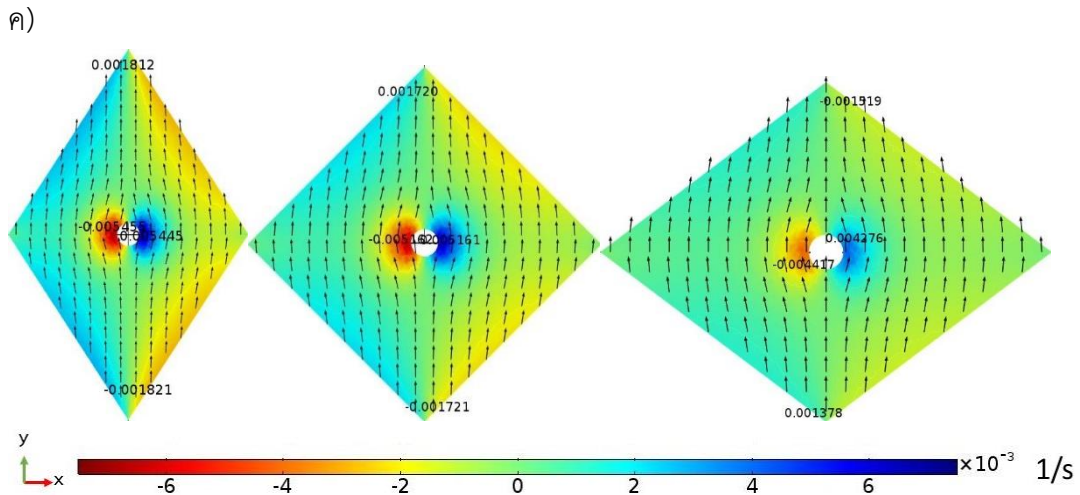
ก)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข)





รูปที่ 3.14 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.12 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z

- การหมุนวนที่ความลึกเท่ากับ 0.44 มิลลิเมตร

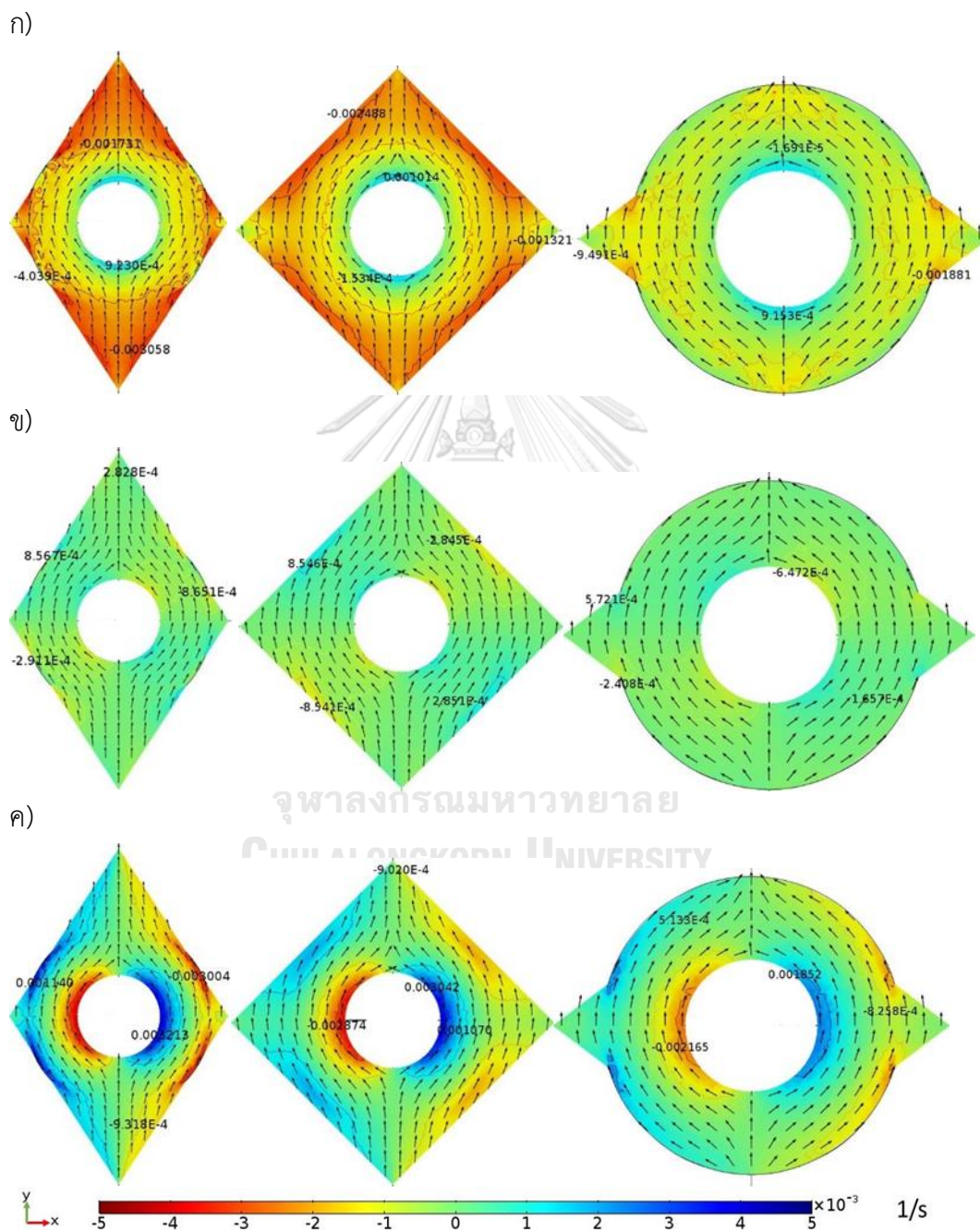
ระนาบของภาพสีแสดงการหมุนที่ระดับความลึกนี้มีรูปร่างต่างกันเนื่องมาจากรูปทรงมีรอยต่อระหว่างผนังเอียงผสานกับผนังตั้ง ระนาบเหล่านี้จะแสดงการหมุนวนครอบคลุมปากหลุมผนังตั้งเป็นส่วนใหญ่

แกน X: การหมุนวนมีทิศ $-X$ เกิดขึ้นตั้งแต่บริเวณตอนต้นของหลุม ซึ่งมีขนาดมากที่สุดที่บริเวณรอยต่อระหว่างผนังเอียง และผนังตั้ง ขนาดลดลงเมื่ออยู่ที่ขอบผนังตั้ง เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเมื่อถึงรอยต่อสองผนังช่วงกลาง หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงท้ายหลุม (มีความสมมาตรกับช่วงต้น) ที่ระยะห่างจากขอบหลุมเข้าหาถึงกลางหลุมขนาดการไหลค่อนข้างคงที่ครอบคลุมบริเวณส่วนใหญ่ของหลุมผนังตั้ง ขนาดของการหมุนมากที่สุดคือหลุมมุม 66 องศา รองลงมาคือ 90 และ 106 องศา ตามลำดับ (ขนาด และทิศทางสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวา) ดังแสดงในรูปที่ 3.15 (ก)

แกน Y: ลักษณะการหมุนวนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุมผนังตั้งเท่านั้นช่วงต้นหลุมมีทิศสวนทางกับทิศการหมุนขนาดมากที่สุดที่หลุมมุม 66 องศา รองลงมาคือ 90 และ 106 องศา ตามลำดับ บริเวณรอยต่อของสองผนังมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ พื้นที่ห่างจากขอบหลุมออกไปมีขนาดการหมุนวนเข้าใกล้ศูนย์ครอบคลุมพื้นที่ส่วนใหญ่ของหลุมผนังตั้ง ช่วงท้ายเกิดการหมุนวนกลับทิศ ขนาดสมมาตรกับช่วงต้น (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้าย และฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.15 (ข)

แกน Z: การหมุนวนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบหลุม และมีขนาดมากที่สุดที่รอยต่อระหว่างผนังทั้งสองแนวจากนั้นจะลดลง และแผ่พื้นที่ใกล้กับขอบหลุมผนังตั้ง หลุมมุม 66 องศา มีพื้นที่การหมุนวนครอบคลุม

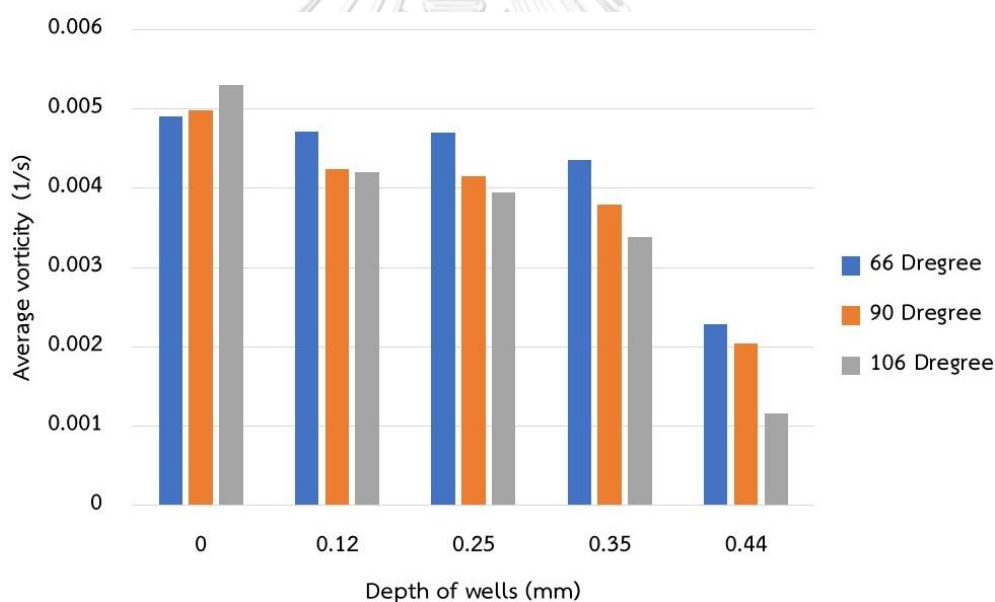
แนวขอบหลุม และขนาดการหมุนมากที่สุด รองลงมาคือหลุมมุม 90 และ 106 องศา ตามลำดับ ส่วนการหมุนที่ระยะห่างจากขอบหลุมออกมามีค่าลดลงจนเข้าใกล้ศูนย์ (ขนาดมีความสมมาตรทั้งฝั่งซ้ายและฝั่งขวาแต่กลับทิศการหมุน) ดังแสดงในรูปที่ 3.15 (ค)



รูปที่ 3.15 การหมุนวนในหลุมทรงพีระมิดบนระนาบ XY ที่ความลึก 0.44 มิลลิเมตร (ก) หมุนรอบแกน X (ข) หมุนรอบแกน Y และ (ค) หมุนรอบแกน Z

ผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่การหมุนวนเกิดขึ้นใกล้กับผนังของหลุม และมีขนาดลดลงเมื่อห่างออกมา ภายในหลุมเดียวกันแนวโน้มของขนาดการหมุนวนจะลดลงเมื่อความลึกเพิ่มขึ้น ลักษณะการหมุนวนจะมีความสมมาตรกันตามลักษณะความสมมาตรของรูปหน้าตัด กล่าวคือ หากมีแกนสมมาตรสองแกนก็จะมีลักษณะการหมุนวนที่สมมาตรทั้งสองแกน

ผลพิจารณาขนาดการหมุนวนเฉลี่ยทั้งหมดต่อพื้นที่ที่ตามระนาบความลึกสามระดับคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจในการแสดงผล และเปรียบเทียบว่าที่ความลึกต่าง ๆ นั้นแต่ละหลุมมีการหมุนวนเฉลี่ยเป็นอย่างไร ดังแสดงในรูปที่ 3.16 พบว่าที่ความลึก 0.44 มิลลิเมตร (บริเวณก้นหลุม) หลุมจุลภาคมุม 66 องศา มีขนาดการหมุนวนเฉลี่ยมากที่สุด ส่งผลให้กลุ่มเซลล์ถูกรบกวนจากการไหลของของไหลมากกว่าหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา ทำให้ค่าความเค้นเฉือนที่กระทำกับเซลล์จึงสูงตาม เนื่องจากผลของรูปร่าง และเส้นทางการไหลของหลุมจุลภาคมุม 66 องศา มีลักษณะโค้งไปมา ทำให้กลุ่มเซลล์ถูกรบกวนจากของไหลสูง และขนาดการหมุนวนของของไหลมีแนวโน้มลดลงตามความลึกเช่นเดียวกับขนาดความเร็ว

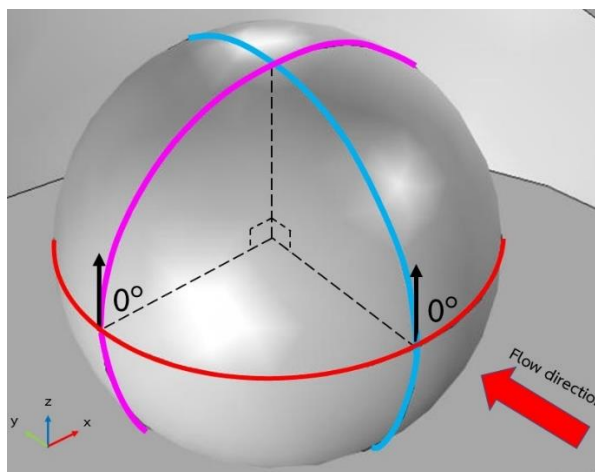


รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ยของค่าสมบูรณการหมุนวนของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด $Z = 0$ มิลลิเมตร

3.2.2.3 แรงเฉือนของของไหลที่กระทำบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

แรงเฉือนทั้งหมดของของไหลที่กระทำบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ จะวิเคราะห์ตามระนาบคือ ระนาบ ZY ทิศทวนเข็มนาฬิกา ซึ่งตำแหน่ง $0 - 180^\circ$ (ครึ่งบน) จะอยู่ตำแหน่งบนเส้นแบ่งครึ่งสีแดง สำหรับการวิเคราะห์แรงเฉือนรอบ ZX ตามเข็มนาฬิกา ซึ่งตำแหน่ง $0 - 180^\circ$

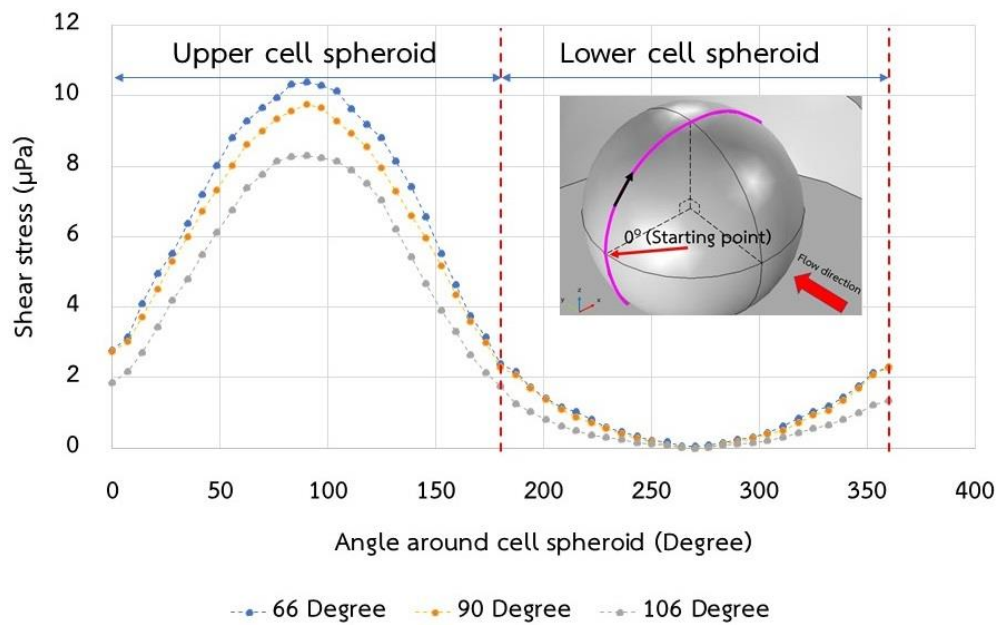
(ครึ่งบน) จะอยู่ตำแหน่งบนเส้นแบ่งครึ่งสีแดงเช่นกัน (วิธีคำนวณตำแหน่งมุมรอบ ๆ กลุ่มเซลล์แสดงดังภาคผนวก ฉ) ดังรูปที่ 3.17



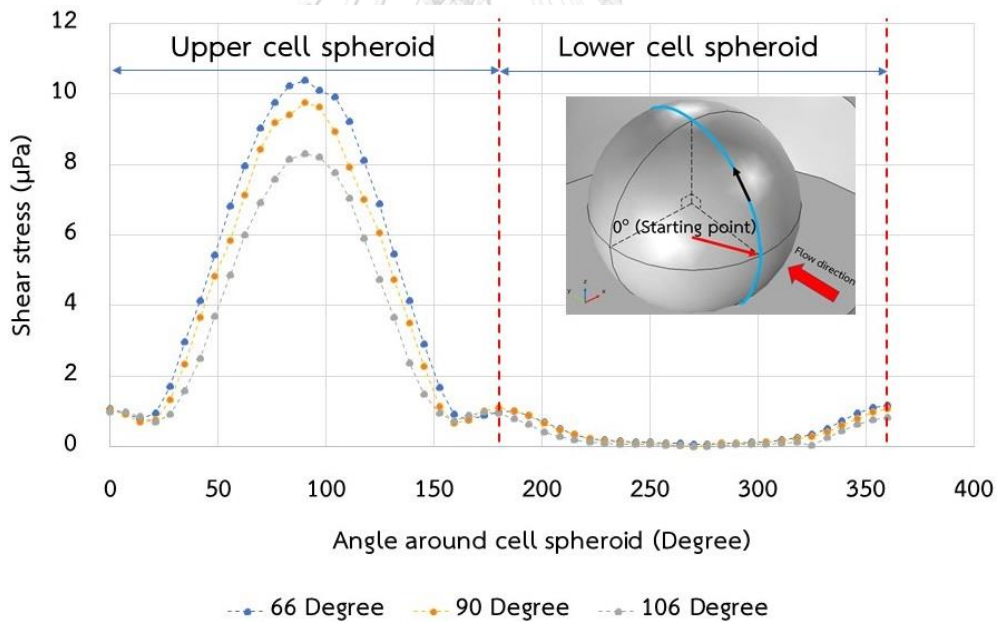
รูปที่ 3.17 แสดงรูปร่างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในการวิเคราะห์ค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์

การคำนวณค่าความเค้นเฉือนของของไหลที่กระทำบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ ระบาย YZ แรงเฉือนที่เกิดขึ้นกับกลุ่มเซลล์จะค่อยๆ สูงขึ้นจากตำแหน่งบริเวณรอบข้างของกลุ่มเซลล์ จาก 0 องศา จนถึงตำแหน่ง 180 องศา (ครึ่งบนของกลุ่มเซลล์) ผลการจำลองการไหลพบว่า หลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66, 90 และ 106 องศา มีค่าความเค้นเฉือนสูงสุดตำแหน่งด้านบนของกลุ่มเซลล์ทั้งระนาบ YZ และ XZ คือ 10.51, 9.66 และ 8.47 μPa แสดงดังรูป 3.18 ก) และ ข) ซึ่งค่าความเค้นเฉือนของหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 องศา มีค่าสูงที่สุดเนื่องจาก รูปร่างของหลุมจุลภาคมุม 66 องศา มีลักษณะเรียวยาวตามทิศทางการไหลของของไหล และของไหลเมื่อไหลผ่านหลุมจุลภาคของไหลมีการเบี่ยงเบนเข้าหาใจกลางมากที่สุด ทำให้เมื่อของไหลไหลผ่านหลุม ของไหลจึงไหลลงไปที่หลุมได้มากซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเซลล์ได้เช่นกัน ส่วนค่าความเค้นเฉือนของหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 106 องศา มีค่าต่ำที่สุดเนื่องจากรูปร่างของหลุมจุลภาคบริเวณปากหลุมมีลักษณะเป็นมุมป้านทำให้ของไหลไหลลงไปที่บริเวณก้นหลุมได้น้อย และการเบี่ยงเบนของของไหลเมื่อไหลผ่านหลุมน้อย ส่งผลให้ค่าความเค้นเฉือนที่กระทำกับกลุ่มเซลล์น้อยเช่นกัน ในขณะที่ค่าความเค้นเฉือนบริเวณใต้กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ ($180 - 360^\circ$) จะมีค่าเข้าใกล้ 0 μPa เนื่องจากบริเวณนี้ความเร็วของของไหลน้อยมากจึงส่งผลให้ค่าความเค้นเฉือนต่ำที่สุด

ก)



ข)

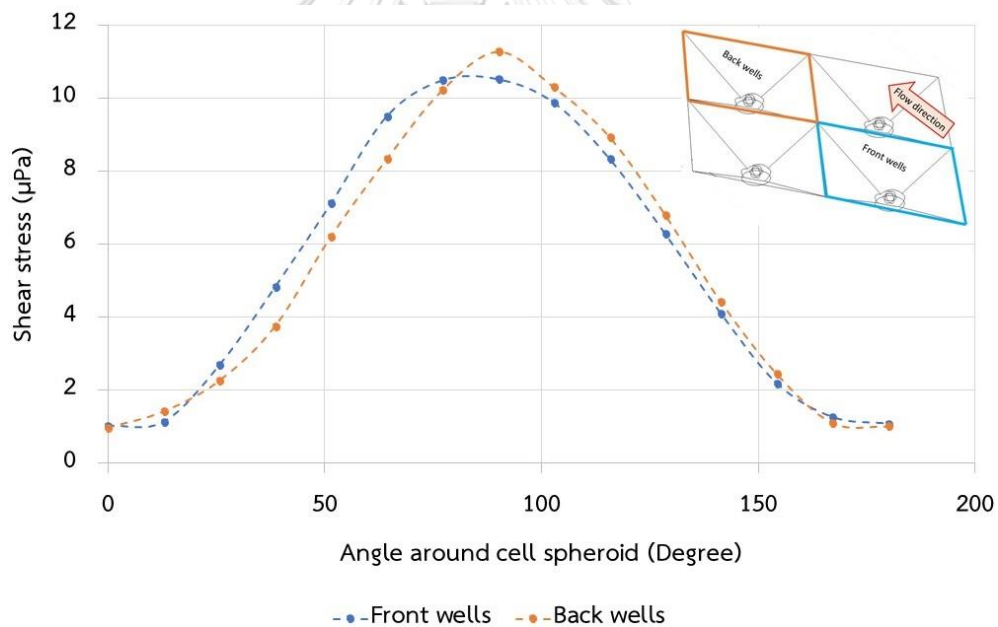


รูปที่ 3.18 ค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360°

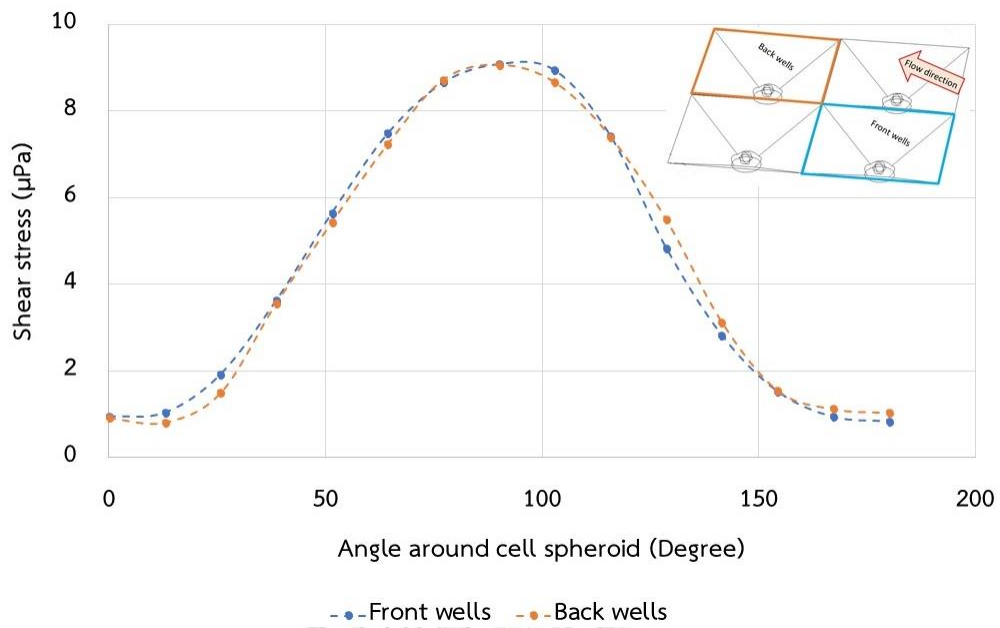
จากการศึกษาเพิ่มเติมโดยการคำนวณความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อตามแนวแกน ZY ตั้งแต่ 0 - 180° (ตำแหน่ง 0° เริ่มต้นเหมือนรูปที่ 3.18ข) ภายในหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุมต่าง ๆ จำนวนสี่หลุมต่อเนื่องกันเพื่อจำลองให้คล้ายกับการทดลองให้มากขึ้นพบว่าหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 องศา มีค่าความเค้นเฉือนของของไหลสูงสุดที่

กระทำบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในแถวที่ 2 มีค่าสูงกว่าในแถวแรก ดังรูปที่ 3.19 (ก) เนื่องจากการไหลที่ไม่คงที่ (ไหลโค้งไปมา) ทำให้เห็นความแตกต่างของค่าความเค้นเฉือนระหว่างหลุมด้านหน้า และหลุมด้านหลังอย่างชัดเจน จากผลการจำลองผู้วิจัยเชื่อว่าค่าความเค้นเฉือนที่กระทำรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะสูงต่ำสลับกันไปเรื่อย ๆ ตามจำนวนแถวของหลุมจุลภาค ในขณะที่ความเค้นเฉือนของของไหลที่กระทำกับเซลล์ระหว่างตำแหน่งด้านหน้า และด้านหลัง ของหลุมจุลภาค รูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 90 และ 106 องศา มีค่าไม่ต่างกันมากเนื่องจากเส้นทางการไหลของของไหลมีการเบี่ยงเบนเข้าหากึ่งกลางหลุมน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 องศา ของไหลส่วนใหญ่ เคลื่อนที่เข้าหาเซลล์ (ลักษณะสันตรง) ทั้งหลุมด้านหน้า และหลุมด้านหลัง ทำให้ลักษณะการไหลคงที่ ค่าความเค้นเฉือนระหว่างหลุมแถวแรกกับแถวหลังไม่ต่างกันมา จากผลการจำลองผู้วิจัยเชื่อว่าค่าความเค้นเฉือนที่กระทำรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะของหลุมจุลภาคมุม 90 กับ 106 องศา ในตำแหน่งหลุม ถัดไปค่าความเค้นเฉือนมีแนวโน้มจะมีค่าใกล้เคียงกัน ดังรูป 3.19 (ข)-(ค)

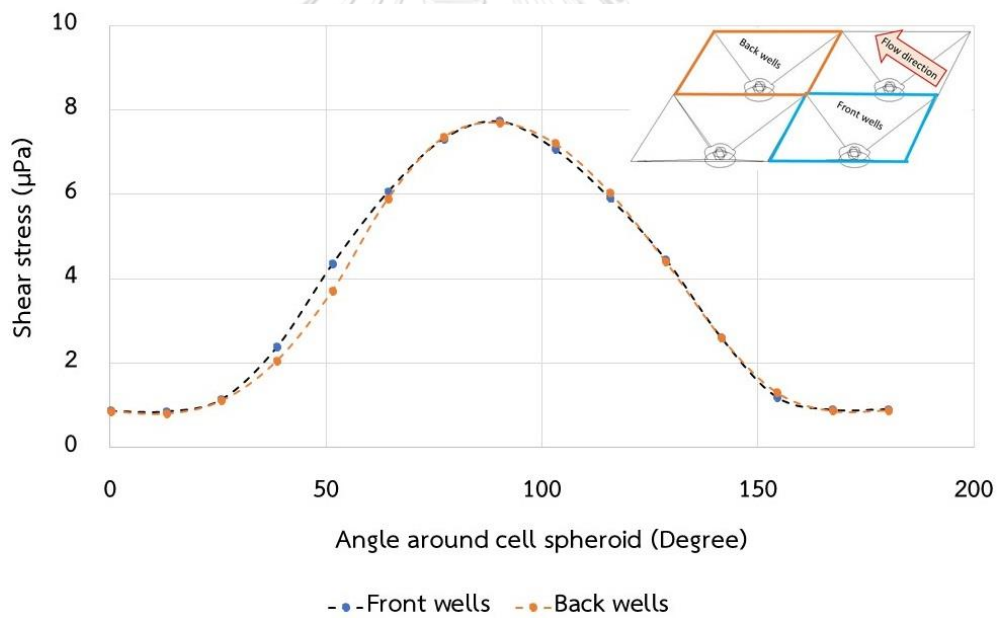
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 3.19 เปรียบเทียบค่าความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ ที่ระนาบ ZY ระหว่างหลุมจุลภาค ตำแหน่งด้านหน้า และด้านหลัง รูปร่างหลุมจุลภาคสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม (ก) 66 (ข) 90 และ (ค)

3.3 ผลการกระจายตัวของความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส และออกซิเจน

โดเมนของการคำนวณส่วนนี้เป็นโมเดลเรขาคณิตสร้างด้วยโปรแกรมเขียนแบบสามมิติ Solid work โดยแบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนของช่องทางการไหล และส่วนของหลุม โดยส่วนของช่องทางการไหล หลักนี้จะมีลักษณะเหมือนกันทั้งหลุมทรงกระบอก และหลุมทรงพีระมิด การคำนวณการกระจายตัวของสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในระบบหลุมจุลภาคจะพิจารณาความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปของสารสองชนิดคือแก๊สออกซิเจน และกลูโคสซึ่งเป็นสารที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ในอันดับต้น ๆ การคำนวณจะใช้สมการการแพร่ และการพาซึ่งอยู่ในโมดูลสำเร็จรูป Transport of Diluted Species ควบคู่กับสมการการไหลแบบราบเรียบโดยผลการคำนวณการกระจายความเข้มข้นของสารที่จำเป็นต่อเซลล์

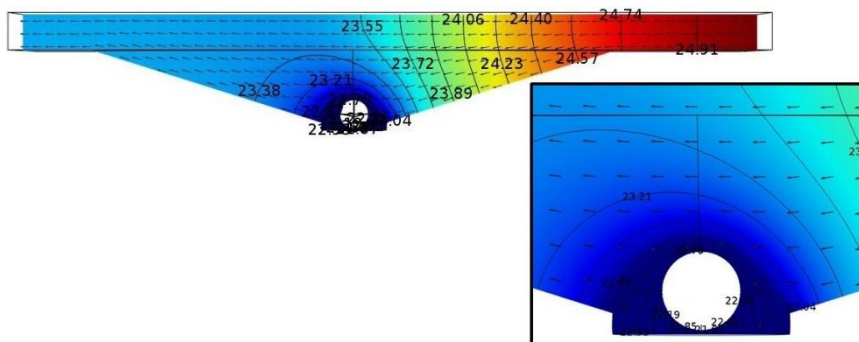
3.3.1 ผลการจำลองการกระจายตัวความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส

ผลการคำนวณการกระจายความเข้มข้นของสารที่จำเป็นต่อเซลล์ถูกแสดงผลออกมาในรูปแบบของภาพสี เส้นสีแสดงระดับความเข้มข้นบนระนาบ YZ ที่ตำแหน่ง $X = 0$ หรือกึ่งกลางของหลุม และการกระจายตัวของสารอาหารตามระนาบความลึก

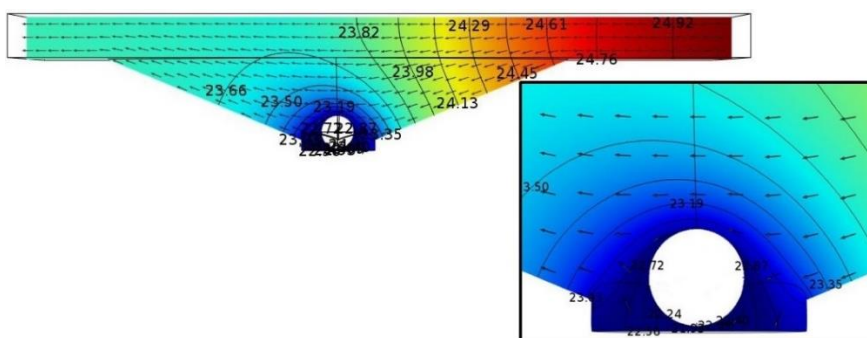
3.3.1.1 การกระจายความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคส

การกระจายตัวของความเข้มข้นในช่องทางการไหลในลักษณะจากทางเข้าไปทางออก ภายในหลุมเกิดขึ้นในลักษณะจากด้านบนลงสู่ด้านล่าง ไล่ระดับความเข้มข้นจากมากไปน้อย ความเข้มข้นในหลุมมีค่าอยู่ในช่วง $23 - 25 \text{ mol/m}^3$ ดังแสดงในรูปที่ 3.20 (ก)-(ค) จากรูปแสดงให้เห็นว่าบริเวณรอบ ๆ เซลล์มีบริเวณสีเข้ม (ฟ้า-น้ำเงิน) กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งหลุมผนังตั้ง ยิ่งความลึกมากขึ้นสียิ่งเข้มขึ้น และบริเวณทางออกของหลุมจุลภาคมุม 66 องศา แสดงเป็นสีเขียวซึ่งบ่งชี้ว่า หลุมจุลภาครูปร่างนี้มีการใช้กลูโคสมากที่สุดอย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 5.20 (ก) เนื่องมาจากผลของรูปร่างของหลุมจุลภาคทำให้ปริมาณอาหารลงไปให้กลุ่มเซลล์บริเวณก้นหลุมได้มากกว่าหลุมจุลภาครูปร่างอื่น ๆ ทำให้สารอาหารถูกแพร่จากบนหลุมลงสู่ก้นหลุมไปให้กลุ่มเซลล์ได้ดี

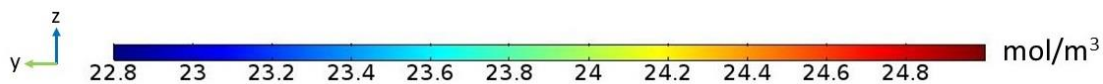
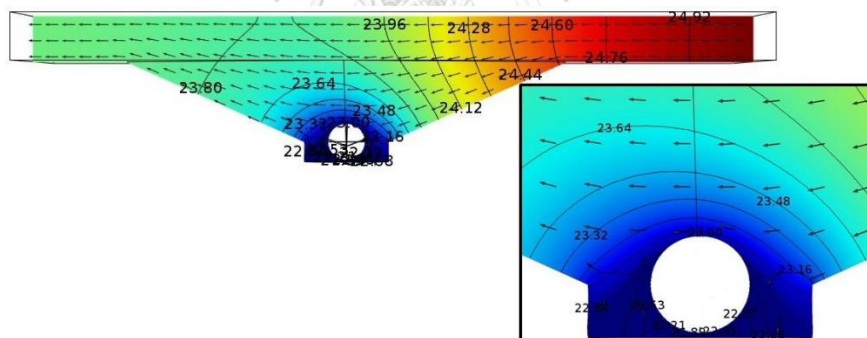
(ก)



(ข)



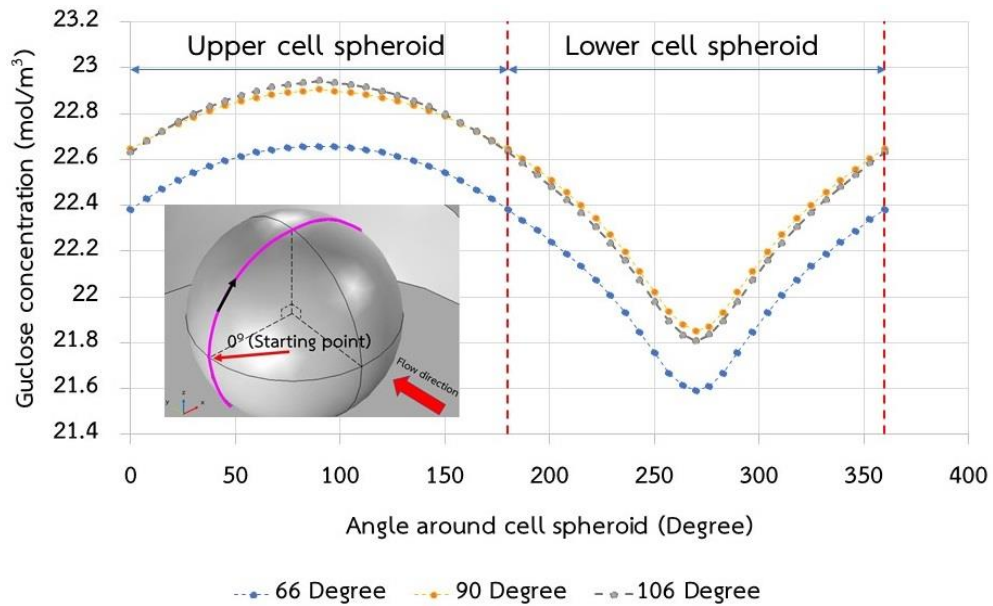
(ค)



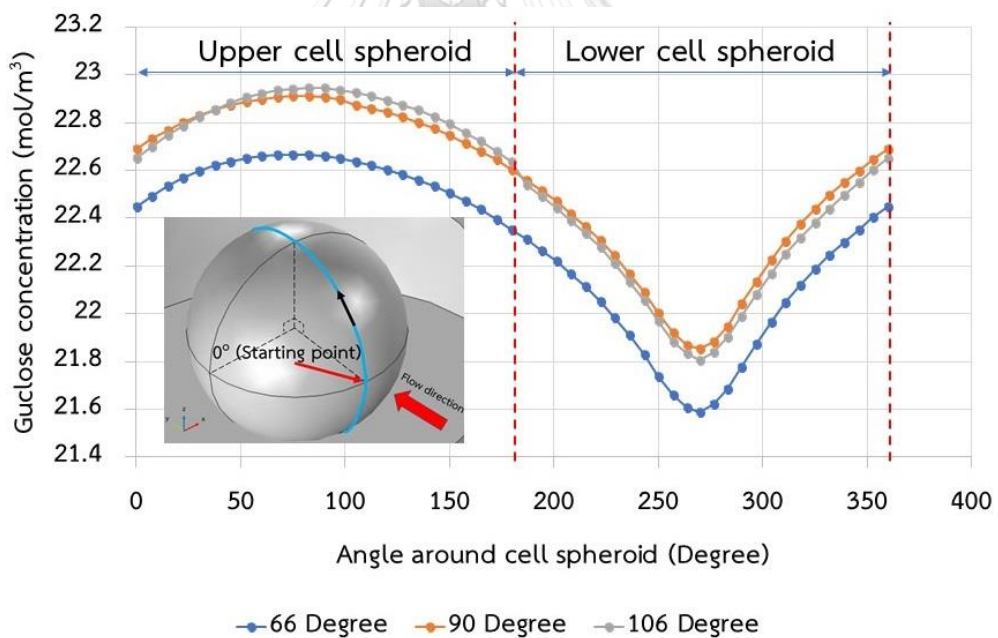
รูปที่ 3.20 การกระจายตัวของปริมาณกลูโคสภายในหลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม ก) 66 ข) 90 และ ค) 106 องศา

3.3.1.2 ปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

ก)



ข)



รูปที่ 3.21 ปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360°

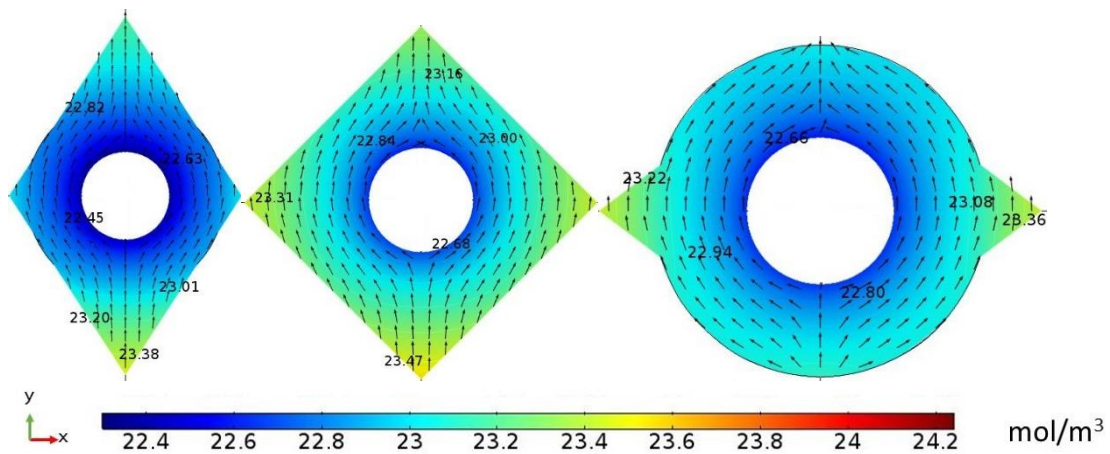
ปริมาณกลูโคสบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะถูกพิจารณา 2 ระนาบรอบแกน ZY และ ZX โดยเริ่มจาก 0 - 360° ดังที่กล่าวไว้ดังรูป 3.21 เมื่อพิจารณาการกระจายตัวปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ZX ตั้งแต่ 0 - 360° พบว่าปริมาณกลูโคสที่กระจายตัวบริเวณครึ่งบนของกลุ่มเซลล์ (0 - 180°) และครึ่งล่างของกลุ่มเซลล์ (180 - 360°) มีความคงที่ (Uniform) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่ม

เซลล์มีการบริโภคกลูโคสสม่ำเสมอในทิศทางรอบแกน ZX ดังรูปที่ 3.21 ก) สำหรับการกระจายตัว ปริมาณกลูโคสรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ZY ตั้งแต่ $0 - 360^\circ$ พบว่าปริมาณกลูโคสที่กระจายตัว บริเวณครึ่งบนของกลุ่มเซลล์ ($0 - 180^\circ$) ไม่คงที่ (กราฟไม่สมมาตร) แสดงให้เห็นว่าการบริโภคกลูโคส ของกลุ่มเซลล์ไม่สม่ำเสมอเนื่องจากตำแหน่ง $0 - 90^\circ$ เป็นตำแหน่งที่มีการปะทะกับของไหล (ปริมาณ กลูโคส) มากกว่าตำแหน่ง $90 - 180^\circ$ จึงทำให้การบริโภคสารอาหารของกลุ่มเซลล์ครึ่งบน ($0 - 180^\circ$) ไม่สม่ำเสมอ (ไม่สมมาตร) ในขณะที่การบริโภคกลูโคสตำแหน่ง $180 - 360^\circ$ (ครึ่งล่างของกลุ่มเซลล์) มีความสม่ำเสมอ (สมมาตร) เนื่องจากผลกระทบของการไหลของของไหลน้อยมากจึงส่งการแพร่ของ กลูโคสมืออิทธิพลมากกว่าการพาของสารอาหาร ดังรูปที่ 3.21 ข)

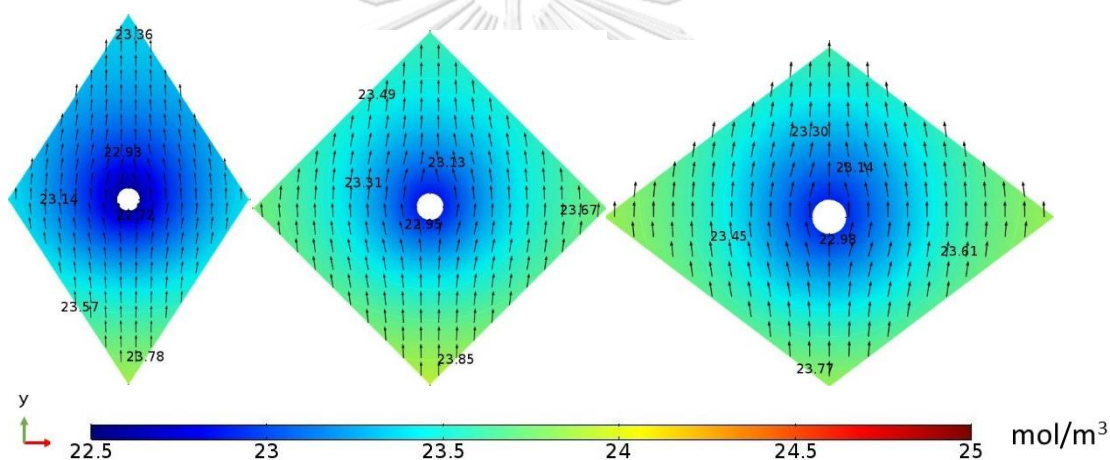
3.3.1.3 ความเข้มข้นกลูโคสเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบความลึกต่าง ๆ

การพิจารณาการกระจายความเข้มข้นกลูโคสเฉลี่ยต่อพื้นที่ที่ระนาบความลึกสามระดับคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร ดังแสดงรูปที่ 3.22 (ก) - (ค) เพื่อเปรียบเทียบว่าที่ความลึก ต่าง ๆ นั้นแต่ละหลุมมีการกระจายตัวของความเข้มข้นของกลูโคสเฉลี่ยเป็นอย่างไร ซึ่งการกระจายตัว ของกลูโคสตามระนาบความลึกจะแสดงถึงการใช้อาหารของเซลล์ภายในหลุมจุลภาค ผลการคำนวณ แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของกลูโคสเฉลี่ยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งทุก ๆ ความลึก พบว่าเมื่อ ของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาครูปปร่างต่าง ๆ ปริมาณการกลูโคสเฉลี่ยของหลุมรูปร่างพีระมิดมุม 66 องศา มีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์ ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุม 66 องศา จะมีการใช้กลูโคสมากกว่าหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา อย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากหลุมจุลภาครูปปร่างนี้มีการนำอาหารลงมาให้เซลล์บริเซลล์กันหลุมได้ มากกว่าหลุมจุลภาคมุมอื่น (ดังที่เคยกล่าวไว้ในหัวข้อก่อนหน้านี้) ในขณะที่หลุมจุลภาคมุม 106 องศา มี ปริมาณสารอาหารภายในตามระดับความลึกเหลือมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแพร่ของสารอาหาร จากบนหลุมสู่กันหลุมน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 และ 90 องศา

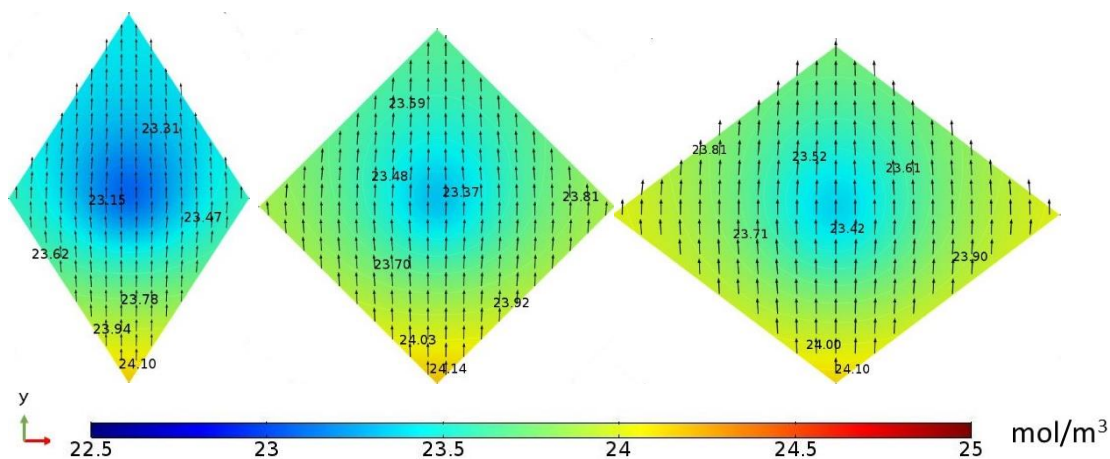
ก)

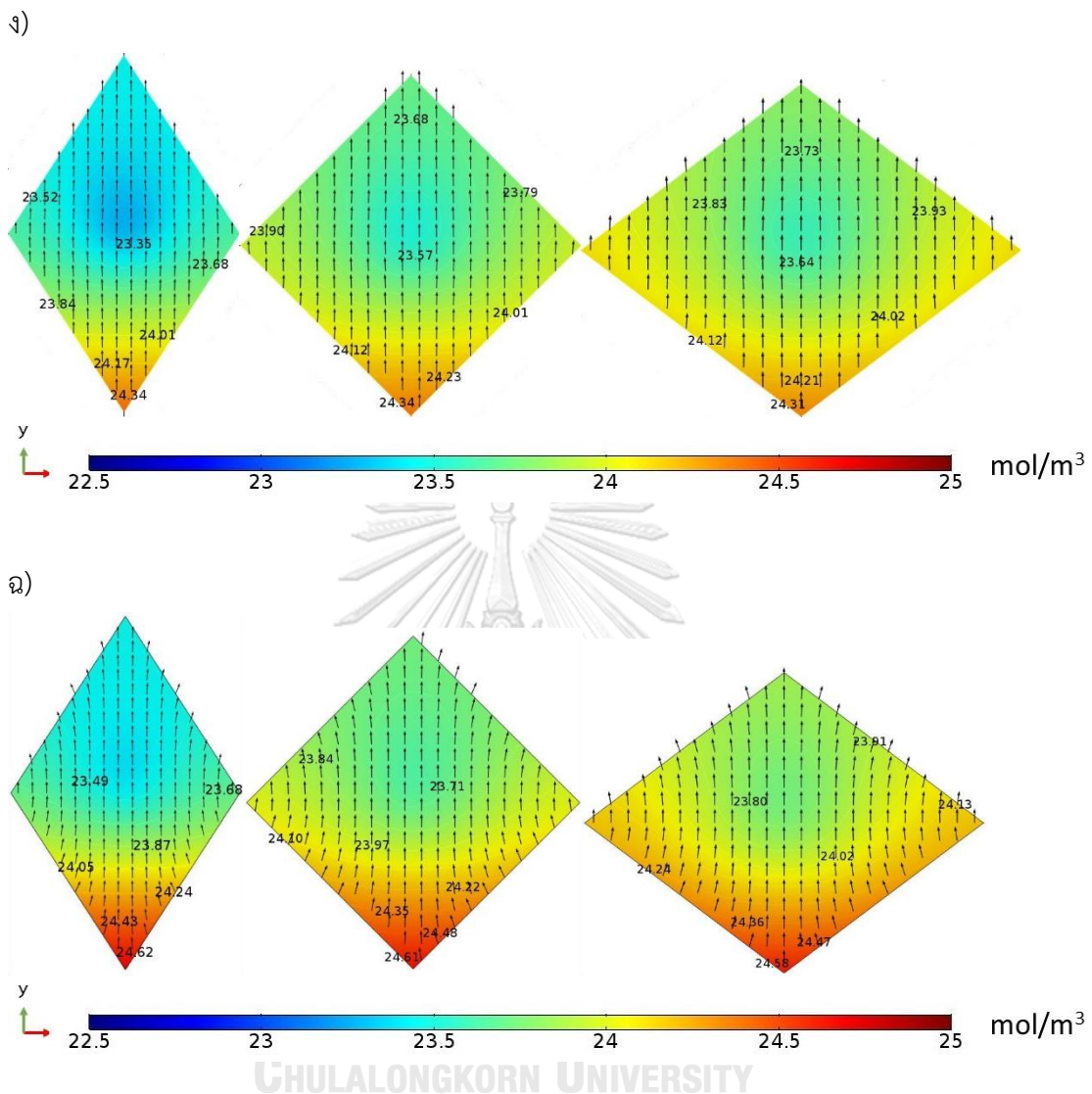


ข)



ค)

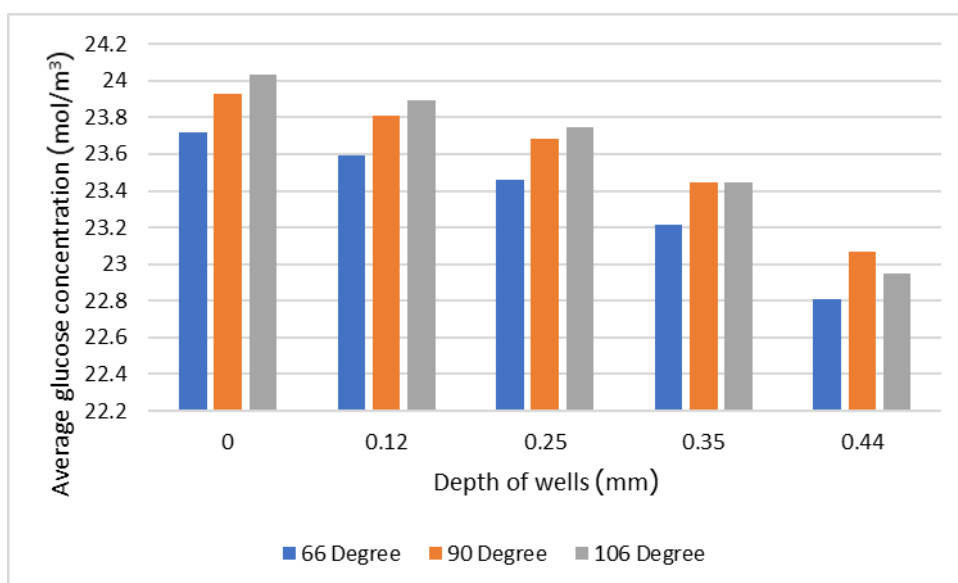




รูปที่ 3.22 ปริมาณกลูโคสบนระนาบ XY ที่ของหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (ฉ) 0 มิลลิเมตร

ผลพิจารณาขนาดการกระจายความเข้มข้นของกลูโคสเฉลี่ยทั้งหมดต่อพื้นที่ตามระนาบความลึกคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจในการแสดงผลเป็นแผนภูมิแท่ง ดังแสดงในรูปที่ 3.23 พบว่าเมื่อของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาค ปริมาณสารอาหารกลูโคสจะค่อยๆ ลดลงตามความลึกของหลุมจุลภาค และเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของสารอาหารของหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา พบว่าในทุก ๆ ความลึก หลุมจุลภาคมุม 66 องศา จะมีปริมาณสารอาหารกลูโคสเฉลี่ยน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา อย่างชัดเจน (ดังเหตุผลที่เคยกล่าวไว้ในหัว

ก่อนหน้า) จากการสังเกตแผนภูมิแท่งในรูปที่ 3.23 แต่ละความลึกพบว่า ปริมาณกลูโคสมีแนวโน้มลดลงตามความลึกของหลุมจุลภาค และปริมาณกลูโคสจะเหลือน้อยสุดที่ตำแหน่งก้นหลุม



รูปที่ 3.23 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความเข้มข้นปริมาณกลูโคสเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z = 0 มิลลิเมตร

3.3.2 ผลการจำลองการกระจายความเข้มข้นของออกซิเจน

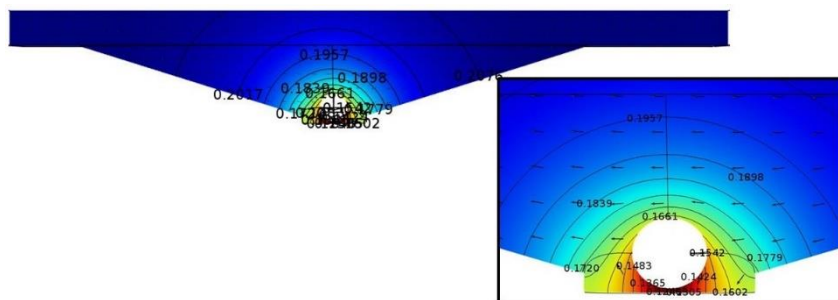
ผลการคำนวณการกระจายออกซิเจนต่อเซลล์ถูกแสดงผลออกมาในรูปของภาพสี เส้นสีแสดงระดับความเข้มข้นบนระนาบ ZY ที่ตำแหน่ง X = 0 หรือกึ่งกลางของหลุม และการกระจายตัวของสารอาหารตามระนาบความลึก

3.3.2.1 การกระจายความเข้มข้นของออกซิเจน

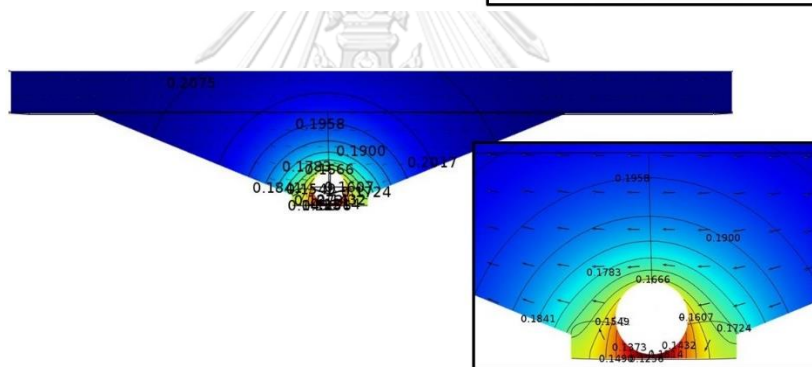
การกระจายตัวของความเข้มข้นในช่องการไหลในลักษณะจากทางเข้าไปทางออก ภายในหลุมเกิดขึ้นในลักษณะจากด้านบนลงสู่ด้านล่าง ไล่ระดับความเข้มข้นจากมากไปน้อยเช่นเดียวกับหลุมทรงกระบอก ความเข้มข้นในหลุมมีค่าอยู่ในช่วง 0.14 - 0.21 mol/m³ ภาพสีที่แสดงรูปที่ 3.24 (ก) - (ค) แสดงให้เห็นว่าบริเวณรอบ ๆ เซลล์มีบริเวณสีเข้ม (สีส้ม-แดง) กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งหลุมผนังตั้ง ยิ่งความลึกมากขึ้นสียิ่งเข้มขึ้น และมีความสมมาตรทั้งตอนต้นและตอนท้ายของหลุมผนังตั้ง ปริมาณการใช้ออกซิเจนของเซลล์ภายในหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่างมีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากมีออกซิเจนเข้าสู่ระบบ 2 ทางคือ ทางเข้า และผนังด้านบนของหลุมจุลภาค ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่

ถูกใช้ไปภายในหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่างต่างกันน้อย สำหรับหลุมจุลภาคมุม 66 องศา ปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เหลือน้อยที่สุดแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการใช้ออกซิเจนในปริมาณที่เยอะ ซึ่งการแพร่ของออกซิเจนจากบริเวณปากหลุมถึงก้นหลุมจะดีเนื่องจากความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนระหว่างก้นหลุม และปากหลุมมาก จึงทำให้การแพร่ของออกซิเจนดี ในขณะที่หลุมจุลภาคมุม 106 องศา ปริมาณออกซิเจนบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เหลือมากที่สุด การแพร่ของออกซิเจนระหว่างก้นหลุม และปากหลุมอาจไม่ดีเมื่อเทียบกับหลุมจุลภาคมุม 66 องศา

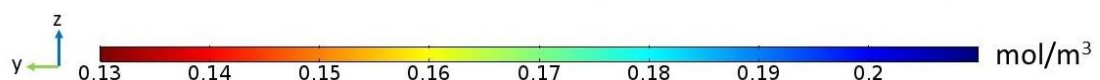
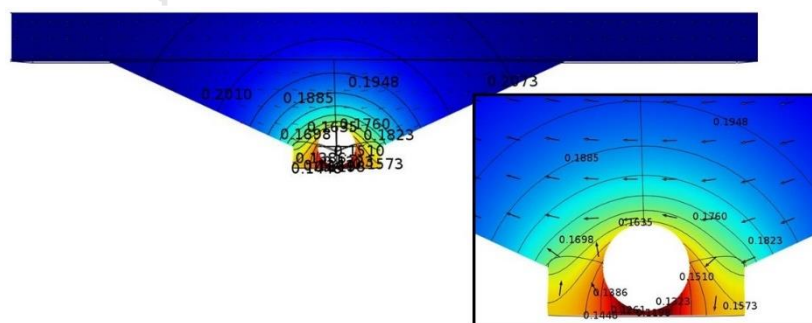
(ก)



(ข)



(ค)

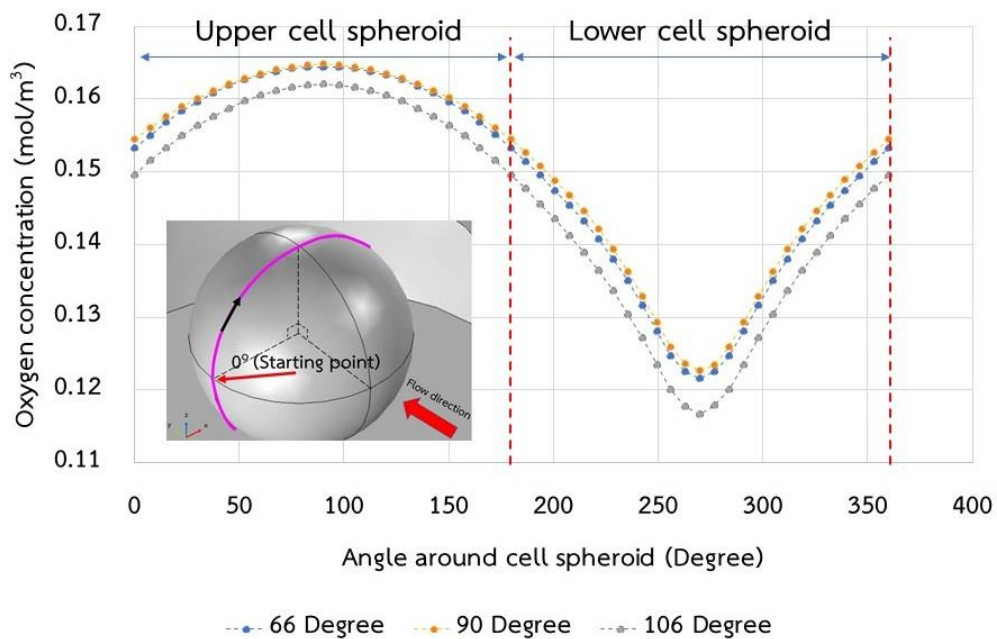


รูปที่ 3.24 การกระจายตัวของออกซิเจนผ่านหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม ก) 66 ข)

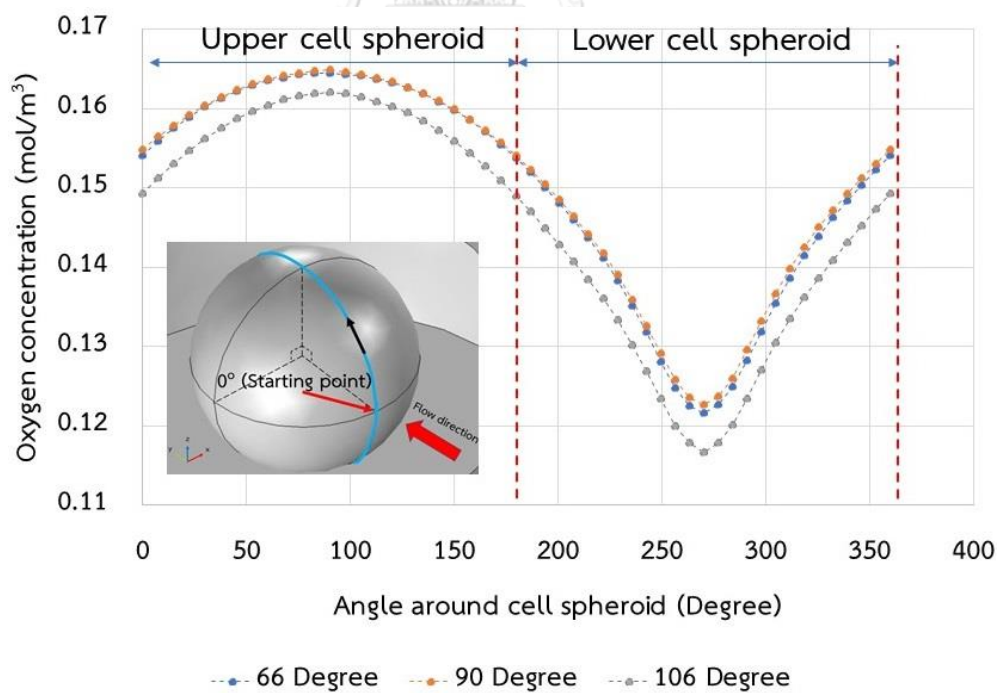
90 และ ค) 106 องศา

3.3.2.2 ปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

ก)



ข)

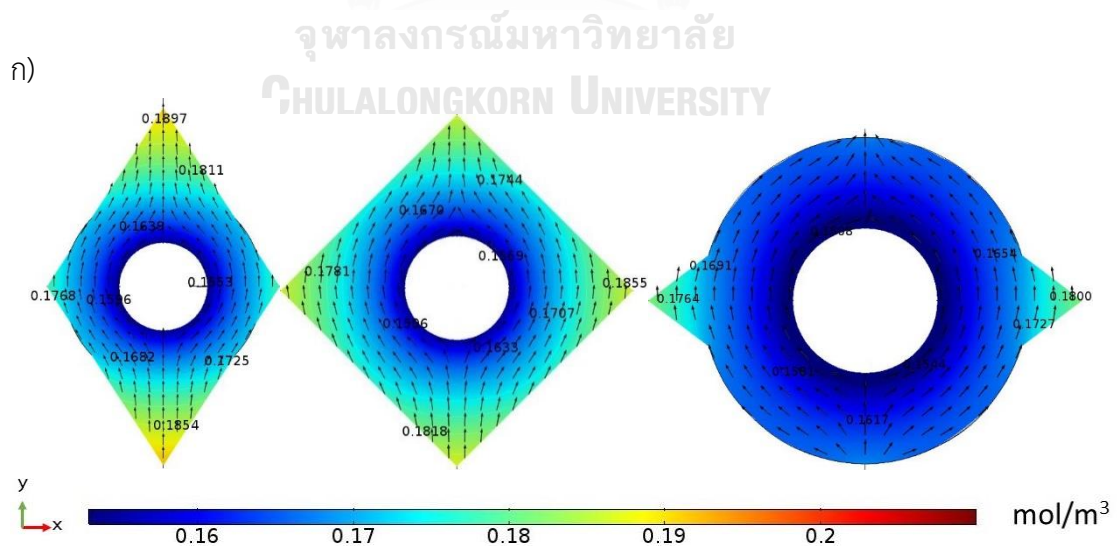


รูปที่ 3.25 ปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ก) ZX และ ข) ZY ตั้งแต่ตำแหน่ง 0 - 360°

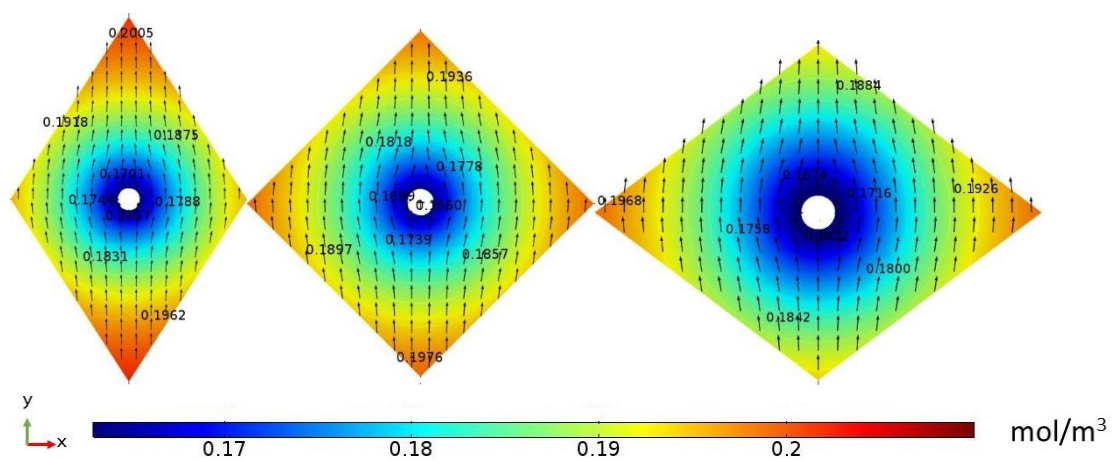
ปริมาณออกซิเจนบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะถูกพิจารณา 2 ระนาบรอบแกน ZY และ ZX โดยเริ่มจาก 0 - 360° ดังที่กล่าวไว้ดังรูป 3.17 เมื่อพิจารณาปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามทิศทาง ZX และ ZY พบว่าการบริโภคออกซิเจนของกลุ่มเซลล์มีความสม่ำเสมอ (0 - 360°) ทั้งรอบแกน ZX และ ZY เนื่องจากปริมาณออกซิเจนมีการแพร่ผ่านผนังด้านบน (PDMS) ของระบบของไหลจุลภาคเข้ามาให้เซลล์ ทำให้อิทธิพลของการแพร่ออกซิเจนไปให้เซลล์บริเวณกันหลุมมีมากกว่าการพาออกซิเจนจากการไหลของของไหลจึงทำให้การบริโภคออกซิเจนบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์คงที่และสม่ำเสมอทั้งแกน ZX และ ZY ดังรูปที่ 3.25

3.3.2.3 ความเข้มข้นออกซิเจนเฉลี่ยทั้งหมดที่ตำแหน่งระนาบความลึกต่าง ๆ

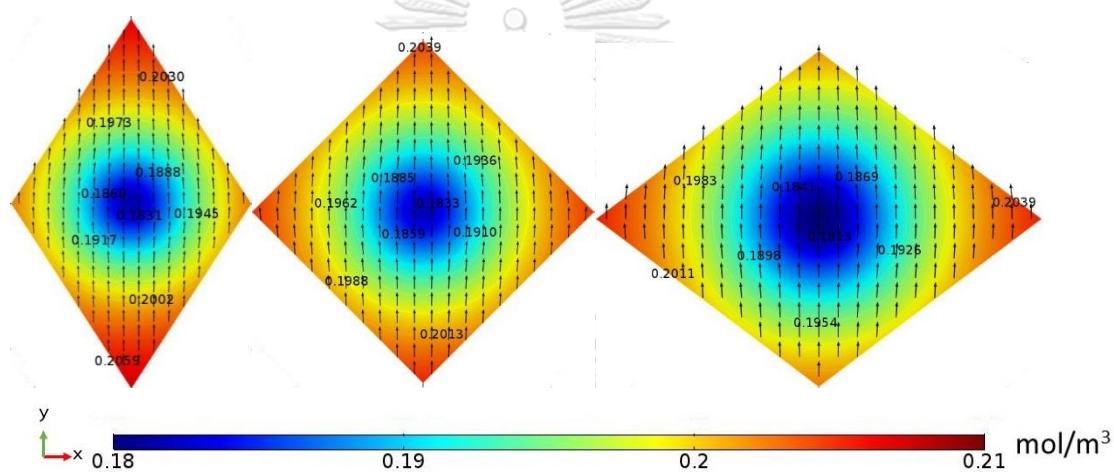
การพิจารณาการกระจายความเข้มข้นของออกซิเจนเฉลี่ยต่อพื้นที่ที่ระนาบความลึกสามระดับคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร ดังแสดงรูปที่ 3.26 (ก) - (ค) เพื่อเปรียบเทียบว่าที่ความลึกต่าง ๆ นั้นแต่ละหลุมมีการกระจายตัวของความเข้มข้นของกลูโคสเฉลี่ยเป็นอย่างไร ซึ่งการกระจายตัวของออกซิเจนตามระนาบความลึกจะแสดงถึงการใช้ออกซิเจนของเซลล์ภายในหลุมจุลภาค ผลการคำนวณแสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของออกซิเจนเฉลี่ยบนระนาบ XY ที่ตำแหน่งทุก ๆ ความลึก พบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหลือบริเวณรอบ ๆ เซลล์ของกลุ่มรูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดแต่ละมุมต่างกันไม่มาก เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่นำมาให้เซลล์บริเวณกันหลุมนั้นมี 2 ทางคือ บริเวณทางเข้า (มาพร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์) และด้านบนของระบบของไหลจุลภาค (แพร่ผ่าน PDMS) ซึ่งปริมาณออกซิเจนมีมากพอสำหรับการเลี้ยงเซลล์ในแต่ละครั้ง



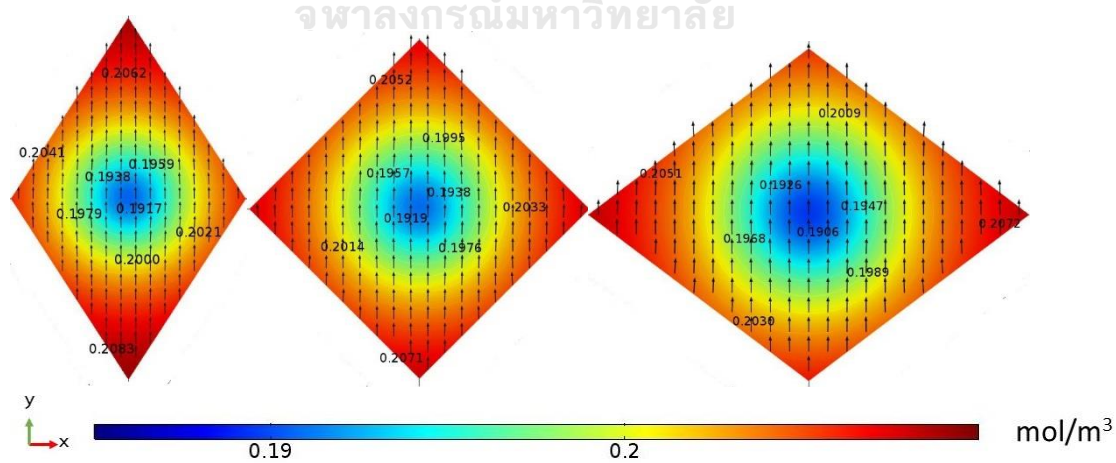
จ)

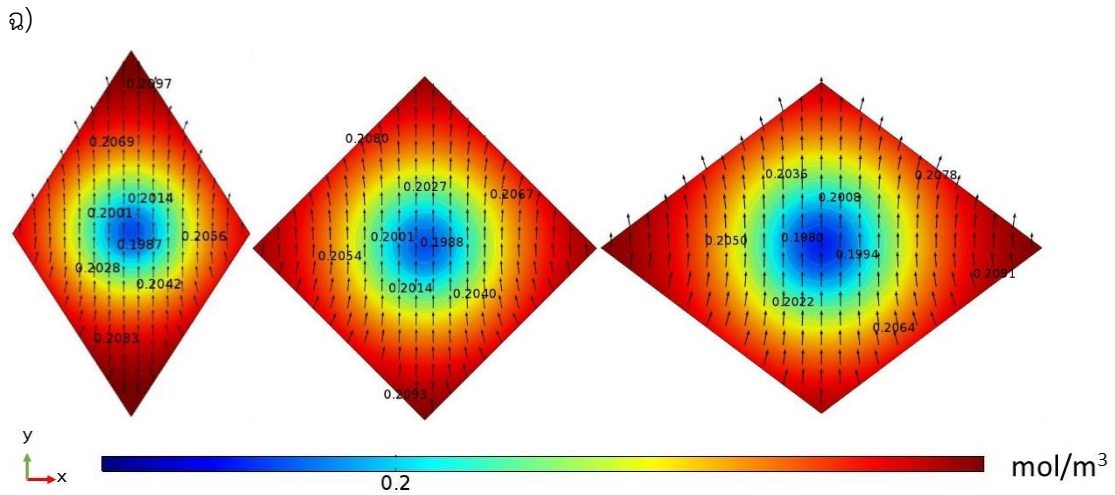


ค)



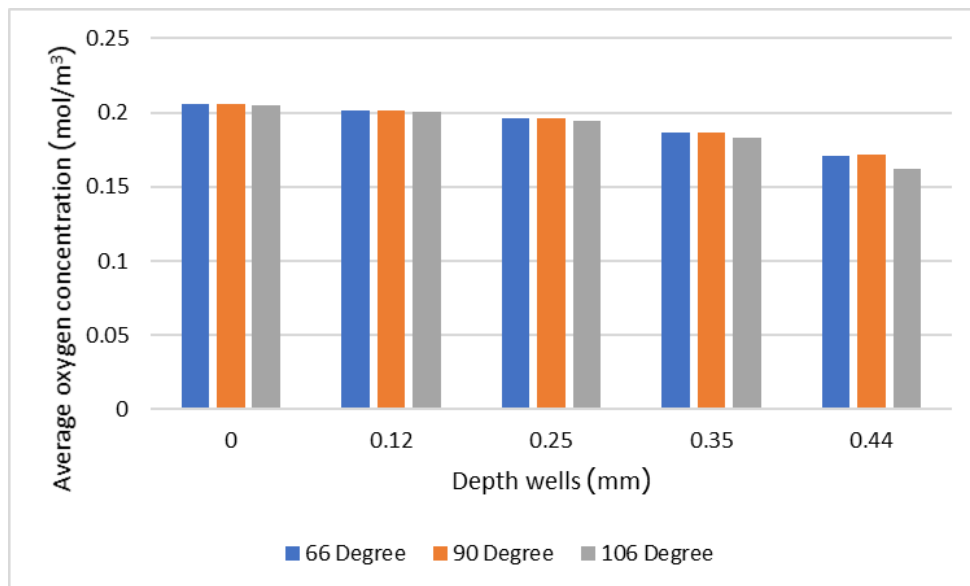
ง)





รูปที่ 3.26 ความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดบนระนาบ XY ที่ของหลุมรูปร่าง 66 90 และ 106 องศา ที่ความลึก (ก) 0.44 (ข) 0.35 (ค) 0.25 (ง) 0.12 และ (ฉ) 0 มิลลิเมตร

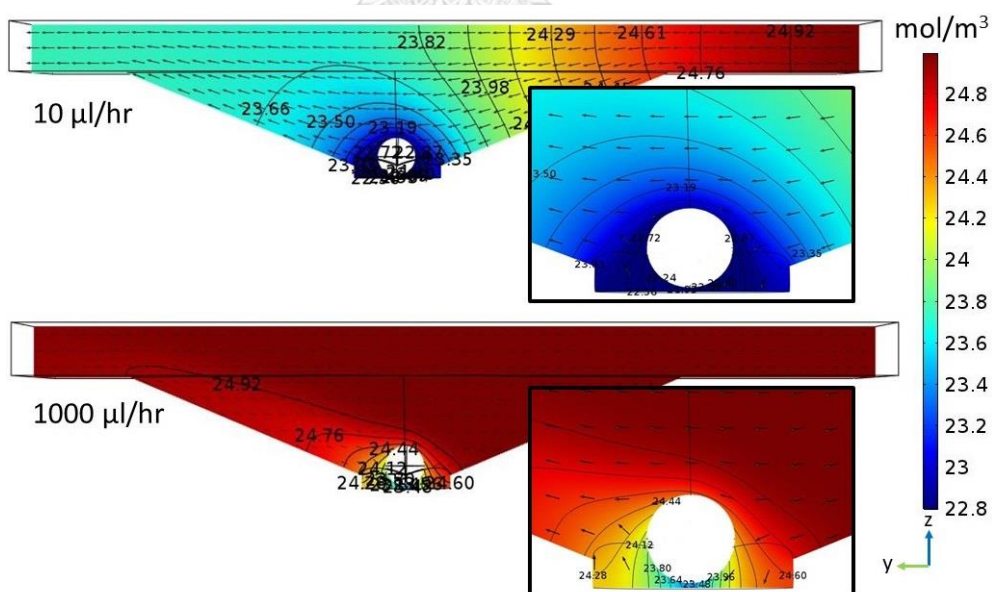
ผลพิจารณาขนาดการกระจายความเข้มข้นของออกซิเจนเฉลี่ยทั้งหมดต่อพื้นที่ตามระนาบ ความลึกคือ 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจในการแสดงผลเป็น แผนภูมิแท่ง ดังแสดงในรูปที่ 3.26 พบว่าเมื่อของไหลไหลผ่านหลุมจุลภาค ปริมาณสารอาหาร ออกซิเจนจะค่อย ๆ ลดลงตามความลึกของหลุมจุลภาค และเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของออกซิเจน ของหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา พบว่าในทุก ๆ ความลึก หลุมจุลภาคมุม 66 องศา จะมี ปริมาณสารอาหารออกซิเจนเฉลี่ยน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 90 และ 106 องศา อย่างชัดเจน (ดัง เหตุผลที่เคยกล่าวไว้ในหัวข้อก่อนหน้านี้) จากการสังเกตแผนภูมิแท่งในรูปที่ 3.27 แต่ละความลึก พบว่า ประมาณออกซิเจนมีแนวโน้มลดลงตามความลึกของหลุมจุลภาค และเหลือน้อยสุดที่ตำแหน่ง ก้นหลุมเช่นเดียวกับกลูโคส



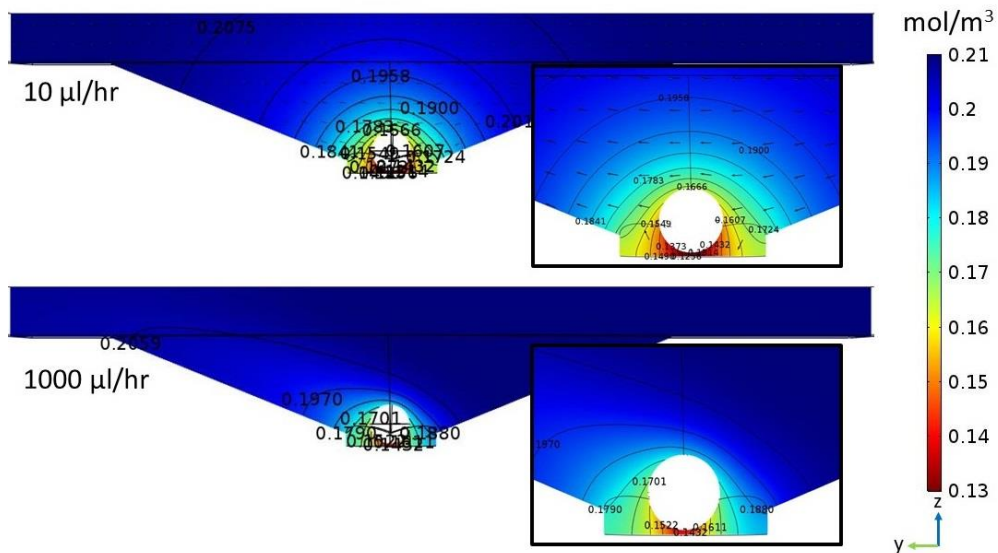
รูปที่ 3.27 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความเข้มข้นออกซิเจนเฉลี่ยทั้งหมดของของไหลกับความลึกของหลุมจุลภาคที่ระนาบความลึก 0, 0.12, 0.25, 0.35 และ 0.44 มิลลิเมตร จากจุด Z=0 มิลลิเมตร

3.3.3 ผลกระทบของอัตราการไหลของของไหลเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น 100 เท่า

ก)



ข)

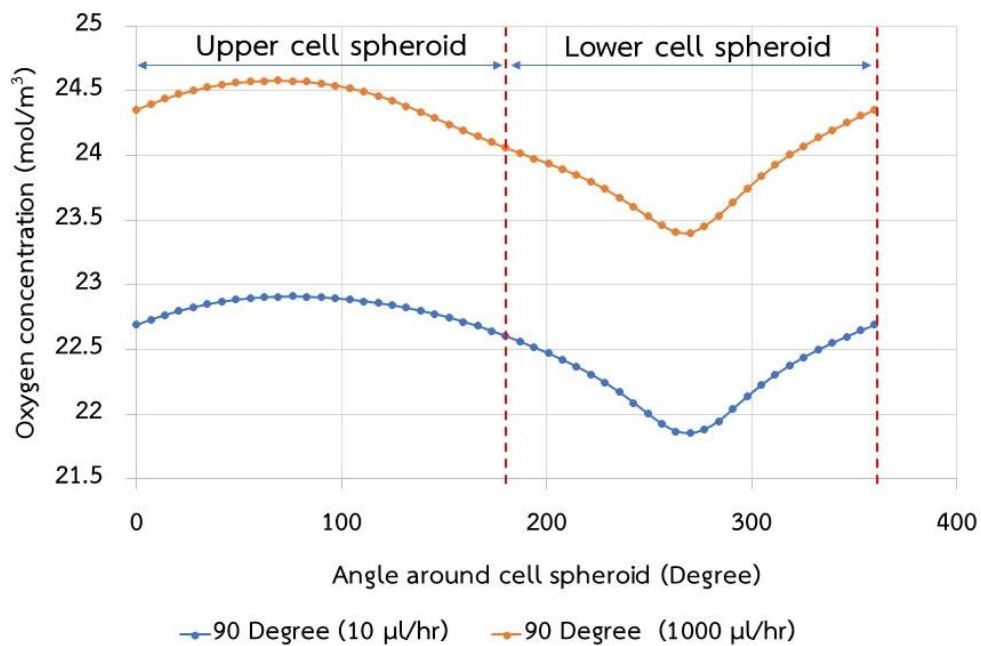


รูปที่ 3.28 การกระจายตัว ก) สารอาหารกลูโคส ข) ออกซิเจน บริเวณกึ่งกลางหลุมที่อัตราการไหล 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง

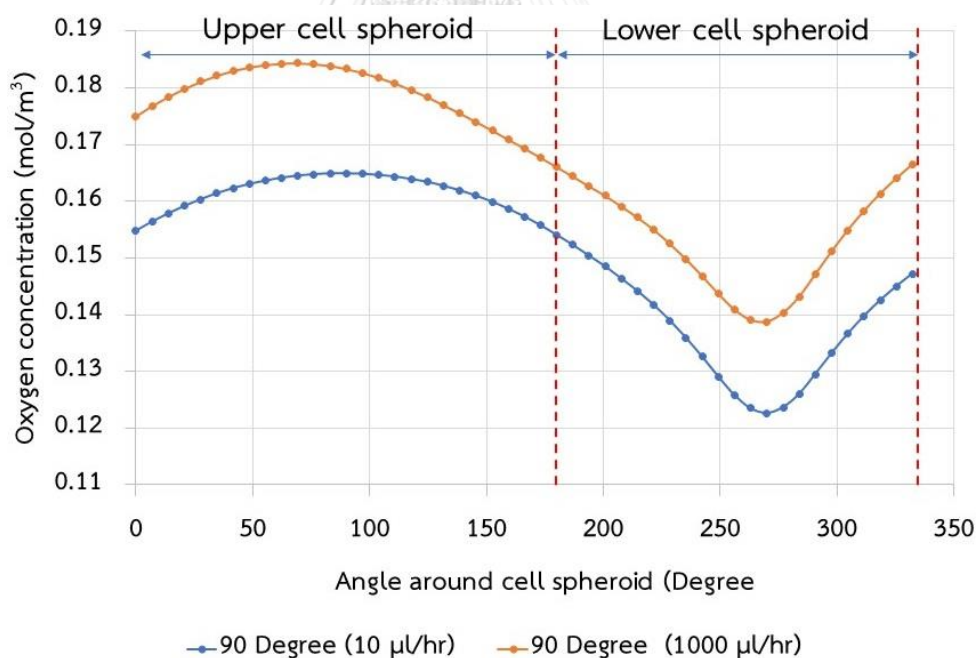
หัวข้อนี้จะพิจารณาผลการกระจายตัวของสารอาหาร และออกซิเจน โดยเปรียบเทียบอัตราการไหลระหว่าง 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง รูปร่างหลุมจุลภาคที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบคือหลุมจุลภาคสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 90 องศา พบว่า อัตราการไหลของของไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง กลูโคส และออกซิเจนจะถูกแพร่ และพาลงมาให้เซลล์บริเวณก้นหลุม การกระจายตัวของกลูโคส และออกซิเจนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะสมมาตร และเมื่ออัตราการไหลสูงขึ้นปริมาณกลูโคส และออกซิเจนจะถูกพาลงมาให้กลุ่มเซลล์มากขึ้น การกระจายตัวของกลูโคส และออกซิเจนจะไม่สมมาตรชัดเจน ดังรูปที่ 3.28

และเมื่อพิจารณาปริมาณสารอาหาร และออกซิเจนบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามระนาบ ZY (0-360°) โดยเปรียบเทียบอัตราการไหลของของไหลระหว่าง 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง พบว่า อัตราการไหลของของไหล 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณสารอาหาร และออกซิเจนบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ตามแกน ZY ไม่คงที่ (Uniformity) อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ดังรูปที่ 3.29 เนื่องจากอัตราการไหลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การพากลูโคส และออกซิเจนให้เซลล์บริเวณก้นหลุมสูงขึ้น กลูโคส และออกซิเจน จะถูกนำไปให้กลุ่มเซลล์แต่ละตำแหน่งไม่คงที่ บริเวณด้านหน้าของกลุ่มเซลล์ที่ปะทะกับของไหล (0 - 90°) จะเป็นตำแหน่งที่รับกลูโคส และออกซิเจนมากกว่าบริเวณด้านหลังของกลุ่มเซลล์ (90 - 180°) สำหรับบริเวณครึ่งล่างของกลุ่มเซลล์ (180 - 360°) สารอาหาร และออกซิเจนบริเวณนี้จะสม่ำเสมอ เนื่องจากการพากลูโคส และออกซิเจนจากการไหลมีอิทธิพลน้อยมากจึงเกิดการแพร่ของปริมาณกลูโคส และออกซิเจนอย่างเดี่ยว

ก)



ข)



รูปที่ 3.29 ปริมาณความเข้มข้น ก) สารอาหารกลูโคส และ ข) ออกซิเจน บริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ คล้ายเนื้อเยื่อที่อัตราการไหล 10 และ 1000 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง

3.4 สรุปผลการจำลองการไหล

ผลการจำลองการไหล พบว่า กรณีหลุมจุลภาคที่มีมุมแหลม (66 องศา) ของไหลที่ไหลผ่านหลุมจุลภาคมีการเบี่ยงเบนทิศทางการไหลเข้าสู่กึ่งกลางหลุมมากกว่าหลุมแบบอื่น จึงส่งผลให้ปริมาณสารอาหารกลูโคส และออกซิเจนถูกแพร่ และพาลงมาให้เซลล์บริเวณก้นหลุมได้มากที่สุด ในขณะที่เดียวกันค่าความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะสูงเช่นกัน ในกรณีหลุมจุลภาคมุมเท่า (90 องศา) ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางลดลง ทำให้ปริมาณสารอาหารกลูโคส และออกซิเจนถูกพาลงมาให้กลุ่มเซลล์บริเวณก้นหลุมลดลง และค่าความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์จะลดลง และเมื่อหลุมจุลภาคมีมุมป้าน (106 องศา) ของไหลที่ไหลผ่านหลุมจุลภาคมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมน้อยลงมาก จึงส่งผลให้ปริมาณสารอาหารกลูโคส และออกซิเจนถูกแพร่ และพาลงมาให้เซลล์บริเวณก้นหลุมได้น้อยเช่นกัน



บทที่ 4

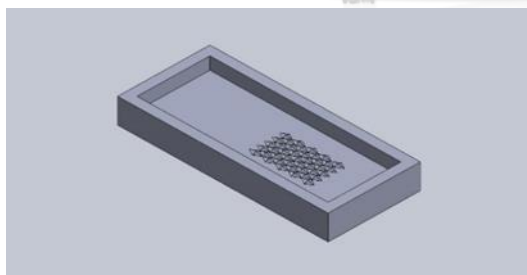
ผลการทดลอง

ในบทนี้จะกล่าวถึงการสร้างระบบของไหลจุลภาค และผลการทดลองของอุปกรณ์ที่ได้ศึกษา โดยอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคประกอบไปด้วยส่วนช่องการไหลหลักรูปแบบมีท่อแยกฝั่งขาเข้าแยกออกเป็น 8 ท่อย่อยก่อนจะเข้าสู่ช่องการไหลหลัก และพื้นช่องการไหลหลักมีหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด 3 รูปแบบคือ หลุมจุลภาคสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา ซึ่งรูปร่างหลุมสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดนั้นจะวางชิดติดกันเป็นแถวเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะหรือการสูญเสียเซลล์ลงได้ และมุมปะทะด้านหน้ายังสร้างโครงสร้างการไหลที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการทดลองจะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน และจะทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง การแสดงผลการทดลองจะมีดังนี้ 1) ผลการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cells spheroid) 2) จำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ 3) การรอดชีวิตของเซลล์ และ 4) การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

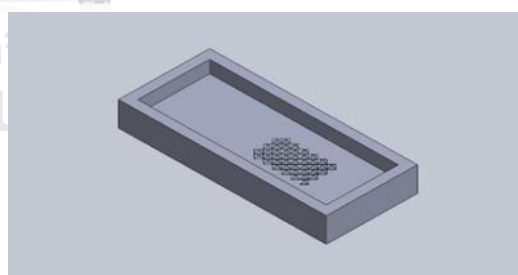
4.1 การสร้างแม่พิมพ์ของระบบของไหลจุลภาค

การสร้างระบบของไหลจุลภาคนั้นต้องเริ่มจากการออกแบบรูปร่างของแม่พิมพ์ผ่านโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ Solidwork ดังรูป 4.1 ก)-ข)

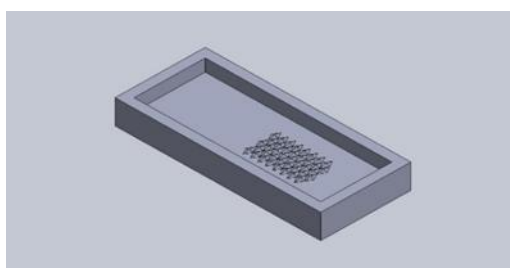
ก)



ข)



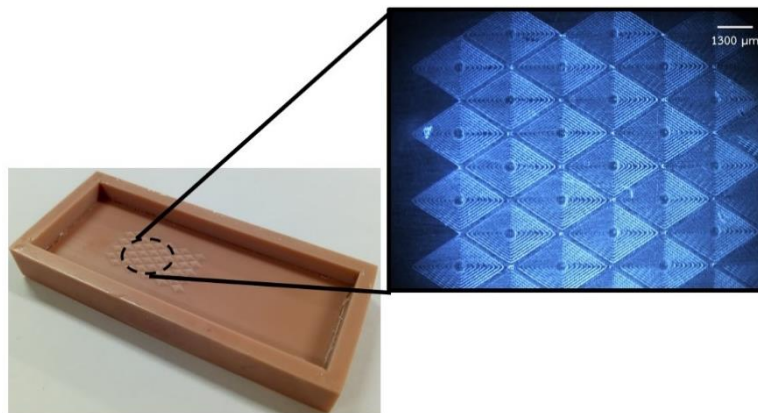
ค)



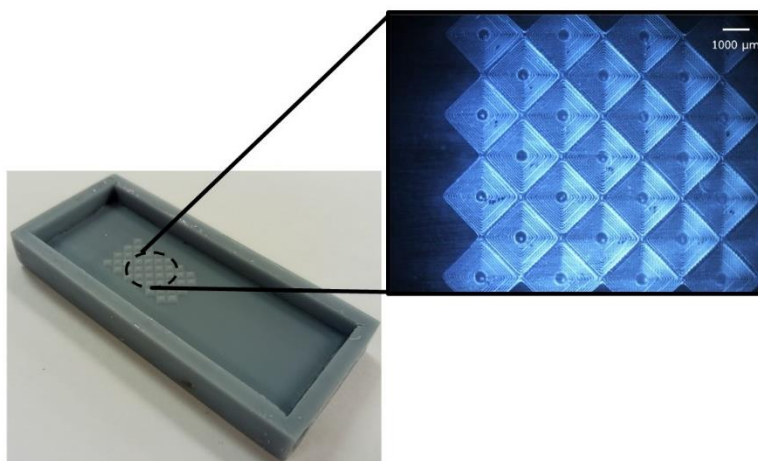
รูปที่ 4.1 ลักษณะแม่พิมพ์ตามมุมต่าง ๆ ก) แม่พิมพ์หลุมจุลภาคมุมปากหลุม 66 ข) 90 และ ค) 106 องศา

หลังจากออกแบบแม่พิมพ์ในโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์เรียบร้อยแล้ว ทำการสร้างแม่พิมพ์ด้วยกระบวนการปรีน 3 มิติ โดยใช้วัสดุคือ Resin monomer ดังรูปที่ 4.2

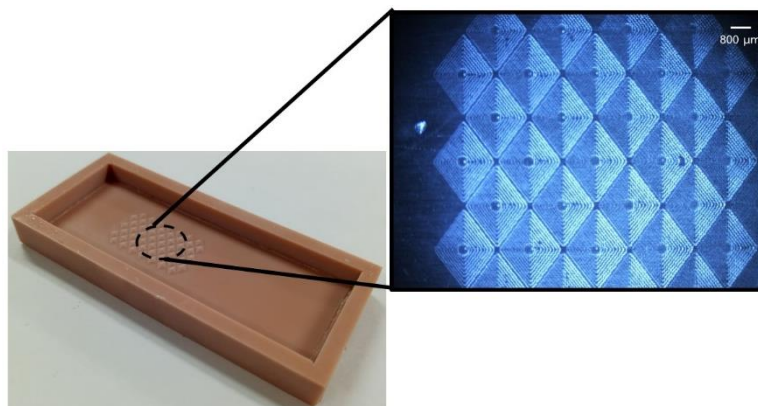
ก)



ข)



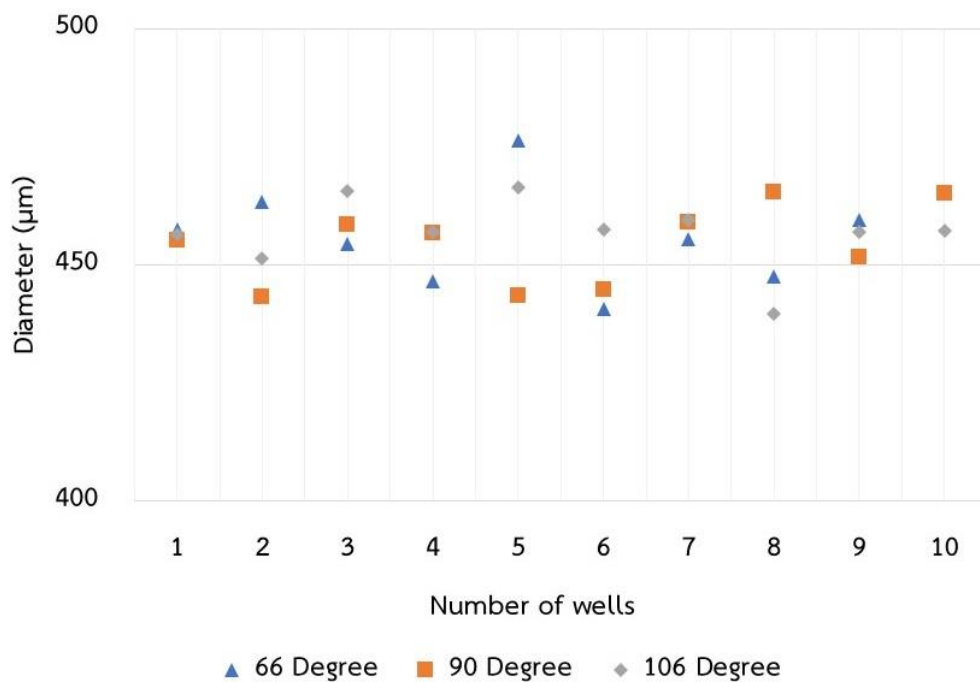
ค)



รูปที่ 4.2 ขนาดหลุมจุลภาคจริงหลังจากการพิมพ์สามมิติสำหรับหลุมจุลภาคทรงพีระมิดมุม (ก) 66

(ข) 90 และ (ค) 106 องศา

เมื่อได้แม่พิมพ์จากกระบวนการพิมพ์สามมิติ แล้วหลังจากนั้นทำการวัดขนาดจริง โดยวัดขนาดของทรงกระบอก 10 หลุม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังรูป 4.3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางทั้ง 10 ค่าของแม่พิมพ์ของหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา มีขนาดเฉลี่ย คือ 456.68 ± 9.82 , 454.36 ± 7.88 และ 456.79 ± 7.08 ไมโครเมตร ตามลำดับ และคลาดเคลื่อนจากการออกแบบในโปรแกรมคอมพิวเตอร์คือ 2.15 ± 1.52 , 0.96 ± 0.91 และ 1.5 ± 0.93 % ตามลำดับ

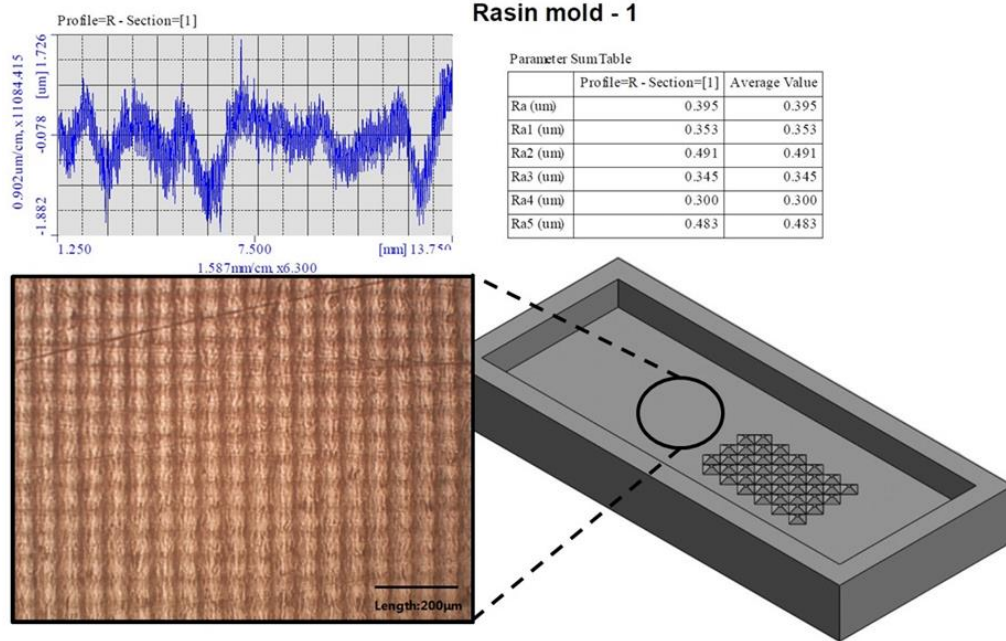


รูปที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางทรงกระบอกของแม่พิมพ์จริง

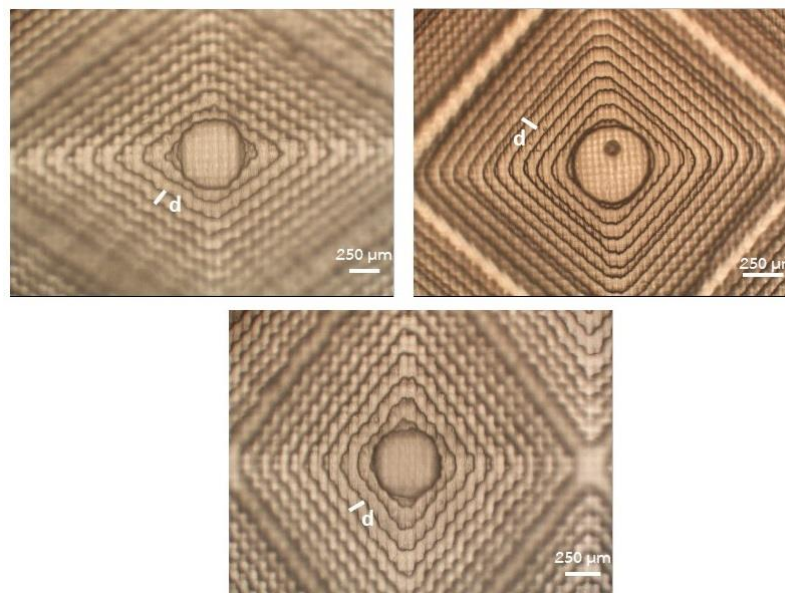
CHULALONGKORN UNIVERSITY

และจากการวัดค่าความหยาบ (Roughness) ด้วยเครื่อง Surface Roughness Tester (Mitutoyo SV-3000) พบว่าค่าความหยาบเฉลี่ยคือ 0.395 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.4ก ซึ่งมีค่าน้อยมาก และไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างการไหลของของไหล และเมื่อพิจารณาหลุมจุลภาคหลังจากการพิมพ์ 3 มิติ พบว่าเกิดชั้นบันไดตรงพีระมิดแต่ละรูปร่าง ความกว้างของชั้นบันได (d) อยู่ในช่วง 30 - 60 ไมโครเมตร และความสูงของชั้นบันไดอยู่ในช่วง 10 - 30 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.4ข

ก)



ข)

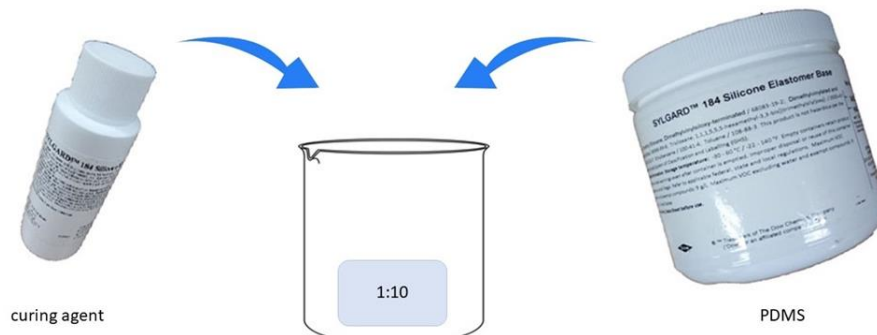


รูปที่ 4.4 วัดขนาดแม่พิมพ์ (ก) ค่าความหยาบของแม่พิมพ์ที่ และ (ข) ค่าความกว้างของชั้นบันไดที่เกิดขึ้นหลังการพิมพ์สามมิติ

4.2 การสร้างระบบของไหลจุลภาค

- การเตรียมพอลิเมอร์เหลว PDMS (Poly-dimethyl siloxane)

เทพอลิเมอร์เหลว PDMS ลงในถ้วยพลาสติก ผสมให้เข้ากันกับตัวเร่งปฏิกิริยาการแข็งตัวของ พอลิเมอร์ (Curing Agent) ในอัตรา 10 : 1 ตามลำดับ ดังรูป 4.5 (ก) จากนั้นใช้แท่งคนผสมให้เข้ากัน โดยสารผสมที่เตรียมนี้จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการขึ้นรูปต่อไป ระบบของไหลจุลภาคจำนวนหนึ่งขึ้นซึ่งประกอบด้วยส่วนบน และล่างประกบกันจะใช้พอลิเมอร์เหลวประมาณ 10-15 กรัม



รูปที่ 4.5 การเตรียมพอลิเมอร์เหลว PDMS การผสมระหว่าง PDMS กับ Curing agent

- การดูดฟองอากาศด้วยเครื่องอบสุญญากาศ

นำพอลิเมอร์เหลวที่ผสมไปใส่ตู้อบสุญญากาศเพื่อดูดฟองอากาศ (ต่ำกว่า -0.1 MPa) ที่เกิดในพอลิเมอร์เหลวจนหมด ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 การดูดฟองอากาศด้วยเครื่องอบสุญญากาศ

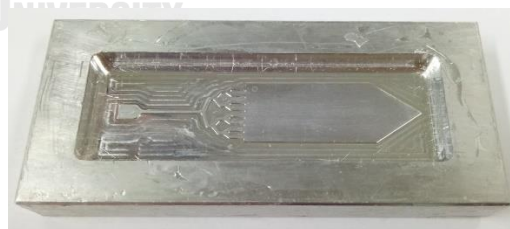
- การเตรียมแม่พิมพ์

ทีมผู้วิจัยเลือกใช้วัสดุอะลูมิเนียมในการทำเป็นแม่พิมพ์ที่เป็นช่องทางการไหลซึ่งถูกสร้างลวดลายบนผิวโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า การควบคุมเชิงตัวเลขด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Computer Numerical Control ; CNC) เป็นการใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงานของเครื่องจักรกล ส่งผลให้ได้ชิ้นงานที่มีความถูกต้องแม่นยำ ใช้หัวกัดขนาดเล็กสุด 250 ไมโครเมตร ซึ่งเครื่องจักรจะผลิตแบบตาม

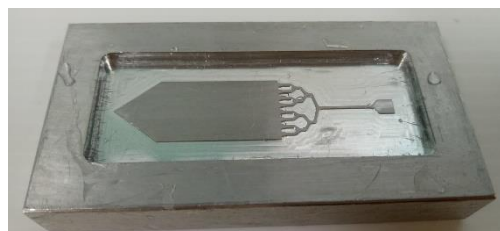
ซอฟต์แวร์ที่ออกแบบโดยคอมพิวเตอร์ โดยจะกล่าวอย่างละเอียดในบทถัดไปมีข้อดีคือ ความแม่นยำของชิ้นงานสูง อย่างไรก็ตามการสร้างแม่พิมพ์ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของราคา และหากแบบมีความละเอียดสูง (ขนาดต่ำกว่า 50 ไมโครเมตร) ค่าใช้จ่ายจะสูงตามด้วย ในส่วนของแม่พิมพ์หลุมจุลภาคเลือกใช้วัสดุ Resin monomer เนื่องจากการควบคุมเชิงตัวเลขด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Computer Numerical Control ;CNC) มีข้อจำกัดในการผลิตชิ้นงานที่เป็นผิวเอียง และต้นทุนในการผลิตแม่พิมพ์จาก Resin monomer ค่อนข้างต่ำจึงเป็นสาเหตุที่เลือกใช้วัสดุนี้ในการสร้างแม่พิมพ์ขึ้นมาในหัวข้อก่อนหน้านี้

- การขึ้นรูปชิ้นงาน

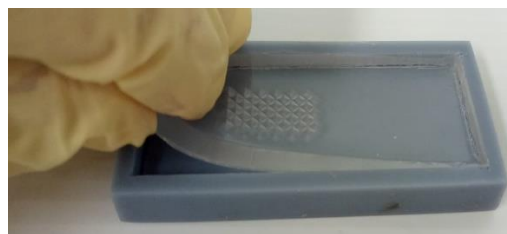
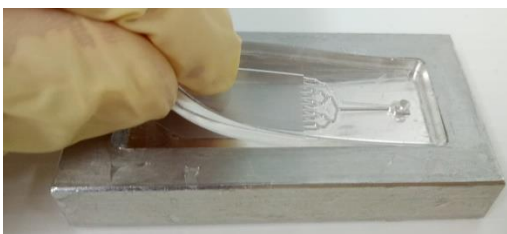
เมื่อเตรียมแม่พิมพ์ที่มีลวดลายตามต้องการโดยจะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ หลุมจุลภาค ดังรูปที่ 4.7 (ก) (รูปซ้าย) และช่องทางการไหล ดังรูป 4.7 (ข) (รูปขวา) แล้วให้ทำความสะอาดแม่พิมพ์ด้วยสารละลาย IPA (Isopropyl alcohol) ตามด้วยน้ำปราศจากไอออนหลังจากนั้นนำแก๊สออกซิเจนเป่าเศษน้ำที่ตกค้าง ในตัวแม่พิมพ์ออกจนหมด เทพอลิเมอร์เหลว PDMS ที่เตรียมไว้แล้วขึ้นต้นในหัวข้อ 4.7 (ข) เทลงไปในแม่พิมพ์เรซิน และแม่พิมพ์อลูมิเนียมที่เตรียมไว้ จนของเหลวกระจายจนทั่วพื้นที่หน้าตัดของแม่พิมพ์ จากนั้นนำไปใส่ตู้อบสุญญากาศเพื่อดูดฟองอากาศ (ต่ำกว่า -0.1 MPa) ที่เกิดในพอลิเมอร์เหลวจนหมด ต่อด้วยการอุ่นด้วยความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 120 นาที เพื่อให้พอลิเมอร์เริ่มแข็งตัว เมื่อพอลิเมอร์เริ่มแข็งตัวดีแล้วทำการลอกพอลิเมอร์ออกจากแม่พิมพ์ และตกแต่งขอบด้วยมีดขนาดเล็ก ดังรูปที่ 4.7 (ค) จากนั้นใช้ตัวเจาะ เจาะรูบนพอลิเมอร์ที่เป็นช่องทางการไหลที่ปลายทั้งสองข้างเพื่อสร้างรูทางเข้า และทางออกเตรียมเพื่อใช้เป็นจุดเชื่อมต่อกับท่อทางเดินต่อไป



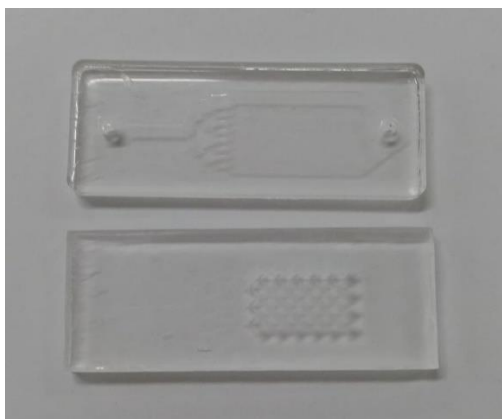
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.7 การขึ้นรูประบบของไหลจุลภาค (ก) แม่พิมพ์ 3 มิติ (ข) เท PDMS ลงในแม่พิมพ์ (ค) ลอก PDMS ลอกจากแม่พิมพ์ (ง) การประกบชิ้นงานระหว่าง PDMS กับ PDMS เข้าหากัน

- การประกบชิ้นงานเข้าหากัน

การประกบของชิ้นงานได้นั้นต้องผ่านกรรมวิธีที่เรียกว่า การปรับสภาพผิวด้วยไอออนของก๊าซออกซิเจน (Oxygen plasma treatment) โดยมีลำดับขั้นตอนดังนี้

- ทำความสะอาดผิวชิ้นงานด้วยน้ำ DI และเป่าให้แห้ง
- นำชิ้นงาน PDMS ที่ทำขึ้น 2 ชิ้น ดังรูป 4.8 (ง) ใส่เข้าไปในตู้อบออกซิเจนพลาสมา โดยหันหน้าชิ้นงานที่ต้องการประกบกันให้หงายขึ้นเพื่อสัมผัสกับพลาสมา
- เปิดเครื่องจนเครื่องเข้าอยู่ในโหมดสุญญากาศ ปรับปุ่มช่องของการไหลเข้าจนสีในตู้ ออกซิเจนพลาสมาเปล่งแสงสีม่วงซึ่งเป็นผลจากการกำเนิดของพลาสมาจากนั้นทิ้งไว้ 3 นาที
- นำชิ้นงานออกและประกบเข้าหากันทันที โดยการปรับสภาพผิวของชิ้นงานสามารถใส่ชิ้นงานได้หลายชิ้นต่อการปรับผิวหนึ่งครั้ง
- เมื่อทำการประกบกันเรียบร้อยแล้วจะได้ชิ้นงานดังรูป 4.7 (ง)

4.3 เงื่อนไขการทดลอง

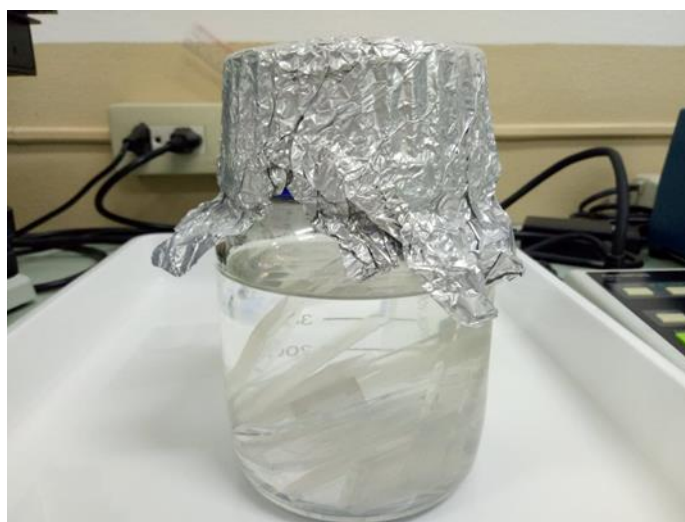
ตารางที่ 4 เงื่อนไขการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์

Parameter	value
Number of cell per well	2000
Number of cells 66 Degree (Cell)	1.73×10^5
Number of cells 90 Degree (Cell)	1.83×10^5
Number of cells 106 Degree (Cell)	1.98×10^5
Flow rate of nutrient ($\mu\text{l/hr}$)	10
Cell culture (Day)	3
Concentration of nutrient (mol/m^3)	25
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	37
Hight of chamber (mm)	250
Width of chamber (mm)	1250

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

ระบบของไหลจุลภาคจากข้อ 4.2 ใช้เทคนิคการดูดย้อนกลับเป็นกลไกในการนำของไหล และอนุภาคเข้าสู่ระบบของไหลจุลภาค โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ระบบของไหลจุลภาคจากข้อ 4.2 ถูกนำมาฆ่าเชื้อโดยการนำระบบของไหลจุลภาคไปแช่สารละลายบัฟเฟอร์ PBS ดังรูปที่ 4.8 แล้วนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

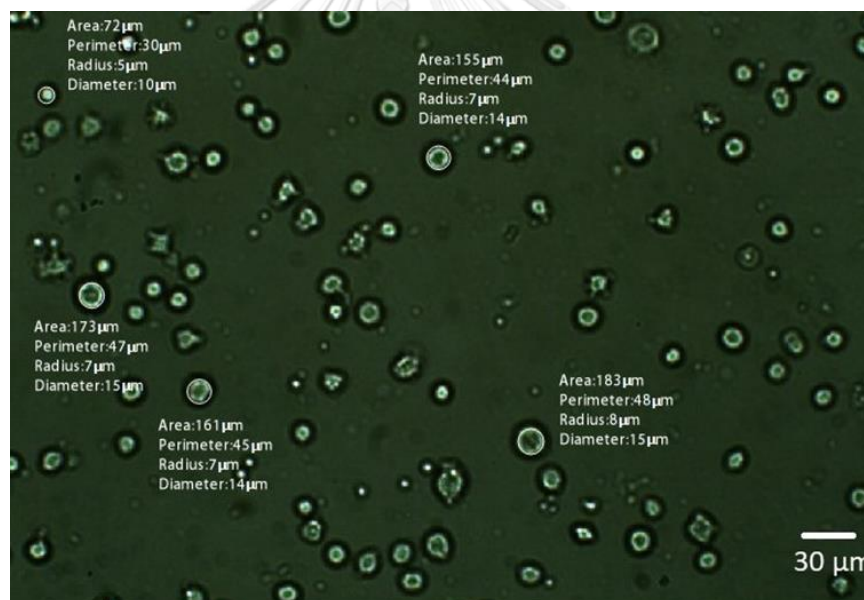


รูปที่ 4.8 ระบบของไหลจุลภาคถูกแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS

- สารละลายบัฟเฟอร์ PBS ค่อย ๆ ถูกฉีดเข้าไปยังระบบของไหลจุลภาคด้วยมือเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศจนมั่นใจว่ามีสารละลายทั่วทั้งช่องการไหล และท่อทางเข้า และออก

- การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มจากนำไฟโบรบลาสต์ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเชื้อ เก็บไว้ในตู้ฆ่าเชื้อก่อนเป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นตั้งสารอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานฆ่าเชื้อที่มีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยปิเปต แล้วใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) ล้างสารอาหารเพื่อทำให้เซลล์ที่เกาะติดกับจานฆ่าเชื้อแยกออกจากกัน และดูด PBS ออกจากจานฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ให้ผสมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เข้าเครื่องหมุนหมุนเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ตกตะกอน ในขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่อีกครั้งแล้วผสมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อให้กลายเป็นเซลล์แขวนลอย โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ในช่วง 10 – 15 ไมโครเมตร ดังรูป

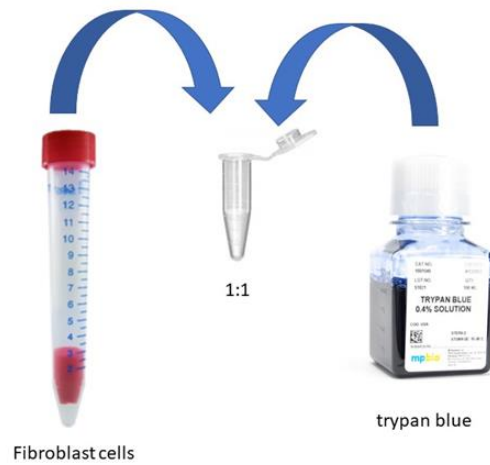
4.9



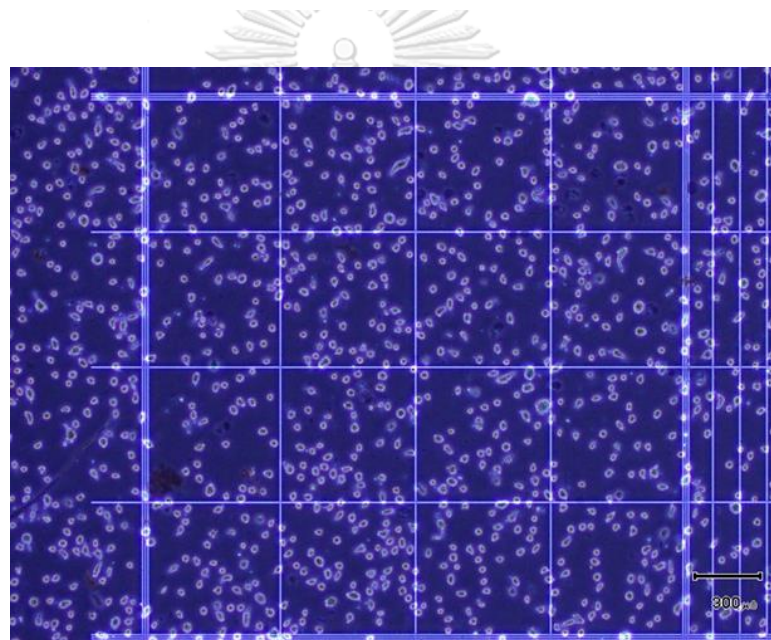
รูปที่ 4.9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

- วิธีการนับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในขั้นต้นนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เตรียมไว้ (ปริมาณเล็กน้อย) มาผสมกับสีย้อม Trypan blue ในสัดส่วน 1:1 ดังรูป 4.10 (ก) หลังจากนั้นนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผสมกับ Trypan blue หยดเข้าไปในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วของ Hemocytometer แล้วนับเซลล์บนพื้นที่ตามตารางกริด ดังรูปที่ 4.10 (ข)

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.10 การนับจำนวนเซลล์ ก) การย้อมสีเซลล์ และ ข) จำนวนเซลล์ที่อยู่ใน Hemocytometer

หลังจากนับเซลล์ที่อยู่ในกริด 16 ช่อง เสร็จแล้วนำจำนวนเซลล์มาคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เตรียมจากสมการดังนี้ ค่าที่ได้จากสมการนี้คือจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

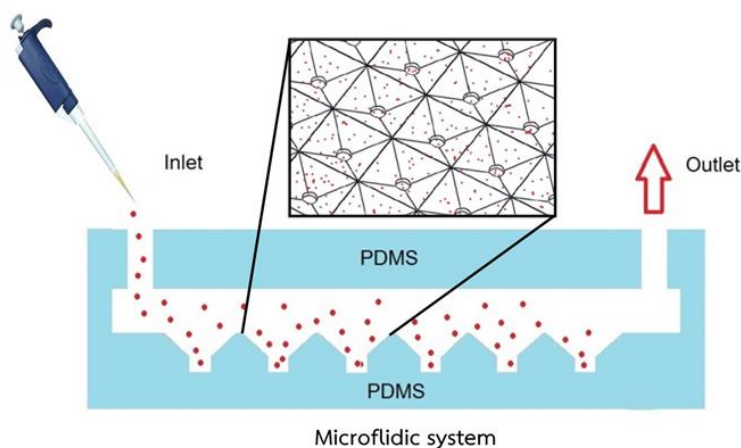
$$\text{Number of cells to be prepared} = \frac{(\text{Number of cells in 16 grid}) \times 10^4}{4} \times \text{diluted factor}$$

- จำนวนเซลล์ไฟโบบลาสต์ที่เตรียมสำหรับเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 1.73×10^5 , 1.83×10^5 และ 1.98×10^5 เซลล์ ซึ่งการเตรียม

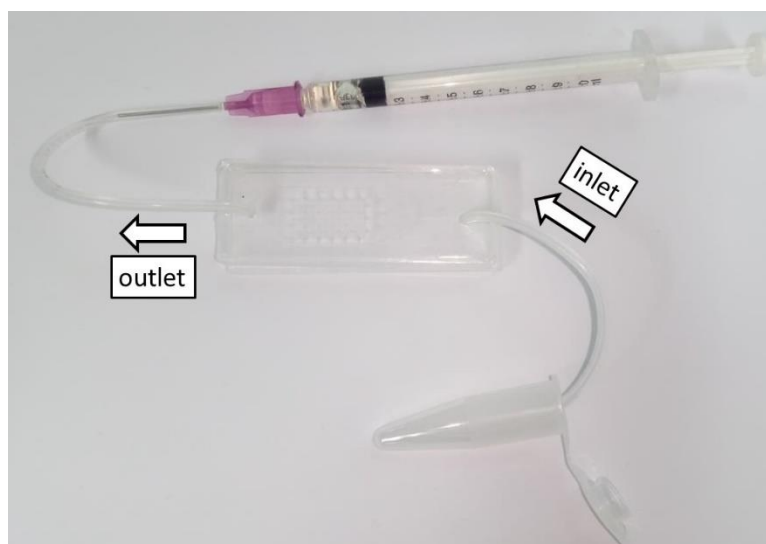
เซลล์แต่ละครั้งอาจคลาดเคลื่อนไปจากที่กำหนดไว้ (รายละเอียดการคำนวณ และนับ จำนวนเซลล์ แสดงที่ภาคผนวก ก)

- เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เตรียมไว้ถูกใส่เข้าไปในระบบของไหลจุลภาคด้วยปิเปต ดังรูป 4.11 (ก)
- ท่อซิลิโคนถูกต่อเข้ากับทางเข้า และทางออกของระบบของไหลจุลภาค ท่อฝั่งขาออกถูกเตรียมโดยนำหลอดฉีดยาเปล่าขนาด 10 มิลลิลิตร ต่อกับท่อซิลิโคน เพื่อที่จะดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ย้อนกลับ ท่อฝั่งขาเข้าถูกเตรียมโดยนำปลายท่อซิลิโคนไปจุ่มกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ดังรูปที่ 4.11 (ข)

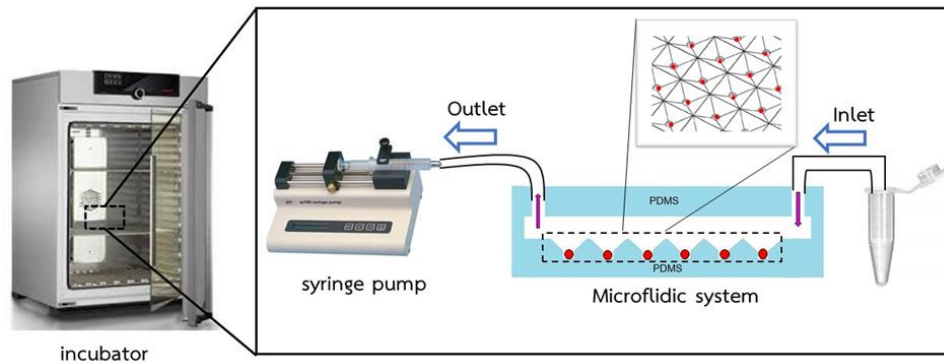
- ระบบของไหลจุลภาคที่ต่อเข้ากับหลอดฉีดยาแล้วถูกต่อเข้ากับ Syringe pump แล้วนำเข้าสู่ตู้ปลอดเชื้อ (Incubator) ดังรูปที่ 4.11 (ค) หลังจากนั้น นำระบบที่ติดตั้งทั้งหมดเข้าสู่ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) และเริ่มทำการทดลองโดยการเปิดปั๊มแบบดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ทั้งหมด 1.5 มิลลิลิตร ภายใต้อัตราการไหลของของไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง (ก)



(ข)



(ค)

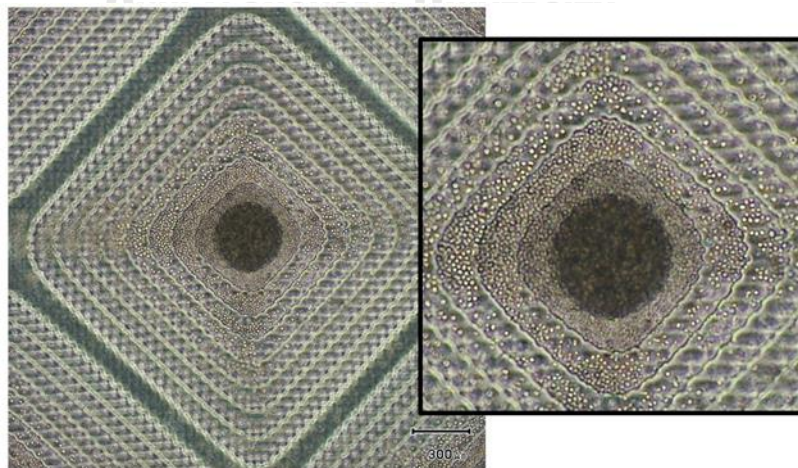


รูปที่ 4.11 ติดตั้งการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ (ก) นำเซลล์เดี่ยวเข้าไปในระบบของไหลจุลภาค (ข) ต่อสายยาง และหลอดฉีดยาเข้ากับระบบของไหลจุลภาค และ (ค) ติดตั้ง Syringe pump กับระบบของไหลจุลภาค

4.5 การเก็บผลการทดลอง

เก็บภาพนิ่ง และภาพเคลื่อนไหวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Seek รุ่น US-300 โดยในหัวข้อนี้จะแสดงตัวอย่างการนับเซลล์ที่ตกลงหลุมในขั้นตอนการใส่เซลล์ แสดงขั้นตอนดังนี้

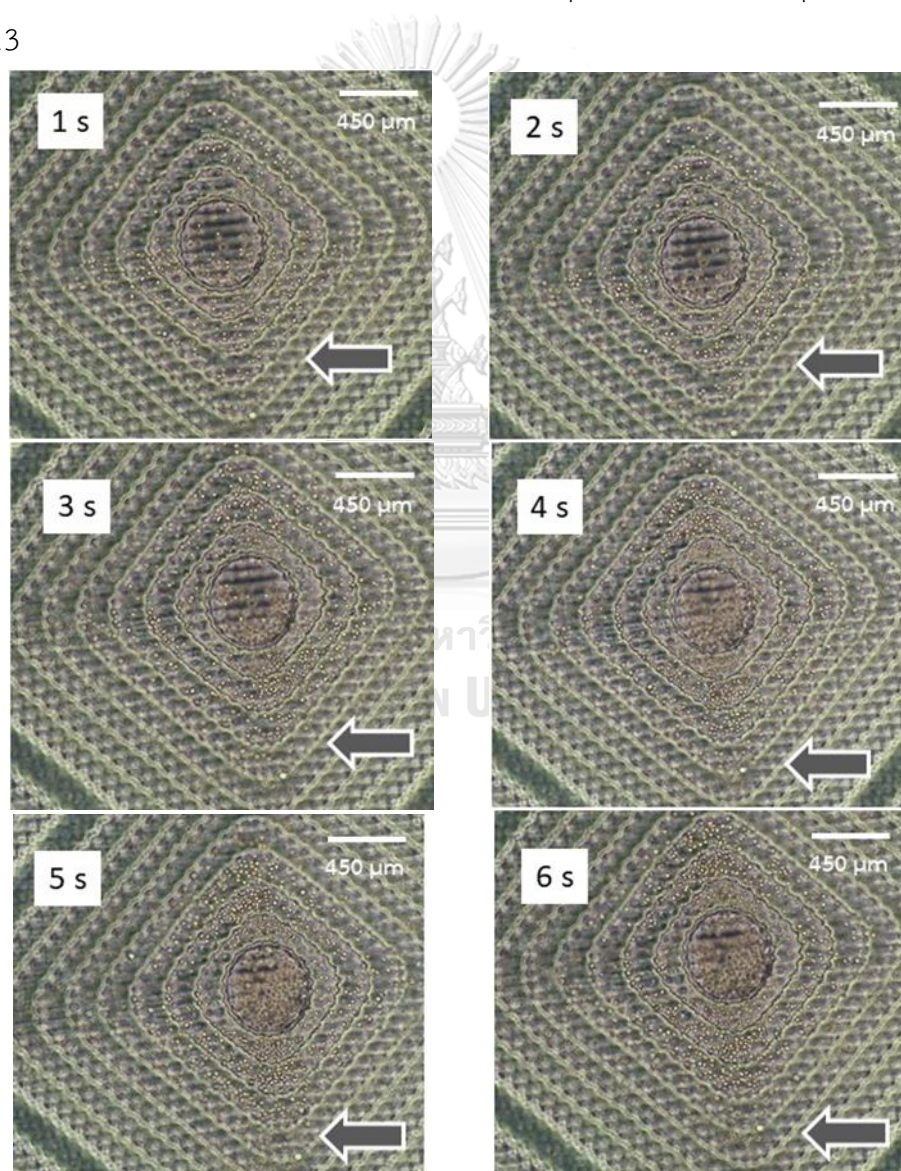
ตัวอย่างการนับเซลล์ตกลงหลุมในขั้นตอนการใส่เซลล์ เริ่มจากถ่ายภาพหลุมจุลภาค หลังจากใส่เซลล์เรียบร้อยแล้ว ดังรูปที่ 4.12 เนื่องจากภาพที่ถ่ายเป็นภาพจากมุมบน เซลล์ที่ตกลงในหลุมจะซ้อนกันตามความลึกของหลุม ดังนั้นวิธีนับเซลล์คือ คำนวณเซลล์ที่อยู่ในทรงกระบอก (ปริมาตรทรงกระบอก/ปริมาตรเซลล์) บวกกับจำนวนเซลล์ที่อยู่รอบ ๆ ทรงกระบอก (นับ)



รูปที่ 4.12 ตัวอย่างภาพถ่ายหลังจากการใส่เซลล์ (ก) โฟกัสบริเวณรอบ ๆ ทรงกระบอก (ข) ภาพบริเวณทรงกระบอกกลาง

4.6 ผลการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ (Cells spheroid)

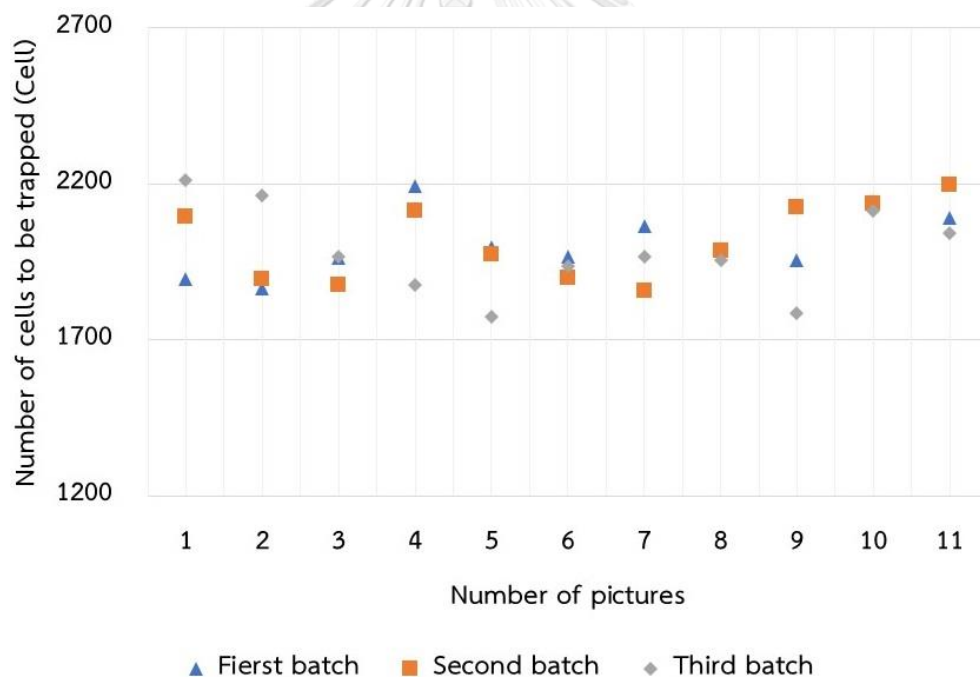
ในการทำการทดลองมีการทดลองที่มีการทดสอบที่อัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง โดยในชั้นแรกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อยู่ในสถานะสารแขวนลอยถูกใส่เข้าไปในหลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา ด้วยปิเปตตามจำนวนที่กำหนดไว้คือ 2000 เซลล์ต่อหลุม ดังนั้นจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ต้องใส่ในหลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 1.73×10^5 , 1.83×10^5 และ 1.98×10^5 เซลล์ (รายละเอียดการคำนวณ และนับจำนวนเซลล์แสดงที่ภาคผนวก ก) ผลการทดลองในชั้นแรกสำหรับการใส่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปในหลุมจุลภาค หลังจากใส่เซลล์ด้วยปิเปต เซลล์เริ่มเคลื่อนที่ผ่านหลุม และตกลงไปในหลุมในเวลาต่อมา ดังรูปที่ 4.13



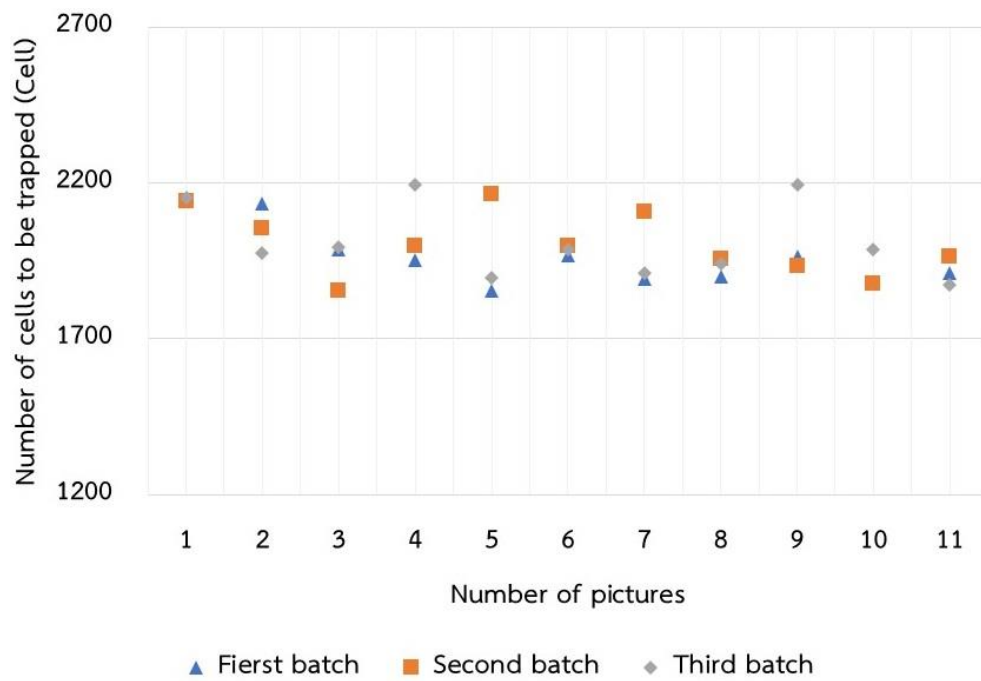
รูปที่ 4.13 การดักจับเซลล์ในเวลาต่าง ๆ

และนับเซลล์ที่ถูกดักจับภายในหลุมจำนวน 11 หลุม แสดงดังรูป 4.14 (ก)-(ค) หลังจากนั้น นำจำนวนเซลล์ทั้ง 11 หลุม นี้มาเฉลี่ยเป็นจำนวนเซลล์ที่ถูกดักจับภายในหลุมจุลภาคแสดงดังตาราง 5 พบว่า จำนวนเซลล์ที่ตกลงไปในหลุมจุลภาคอยู่ในช่วง 1700 – 2300 เซลล์ ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ที่กำหนดไว้คือ 2000 เซลล์ต่อหลุม ผู้วิจัยเชื่อว่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยนี้เป็นตัวแทนของจำนวนเซลล์ที่ถูกดักจับในทุก ๆ หลุมเนื่องจากการส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่ในหลุมมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยจำนวนเซลล์เฉลี่ยแต่ละหลุม (Number of average cells to be trapped) ได้มาจากการนับจำนวนเซลล์จากถ່ายรูปของหลุมจุลภาคแต่ละหลุม หลังจากนั้นเฉลี่ยซึ่งจำนวนเซลล์ในการทดลองแต่ละครั้งไม่เท่ากันเนื่องมาจากการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละการทดลองจะคิดจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร และขึ้นอยู่กับ การเตรียมเซลล์เริ่มต้น (Number of cells to be prepared) ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะเตรียมเซลล์ให้มีจำนวนที่เท่ากันในการทดลองแต่ละครั้ง

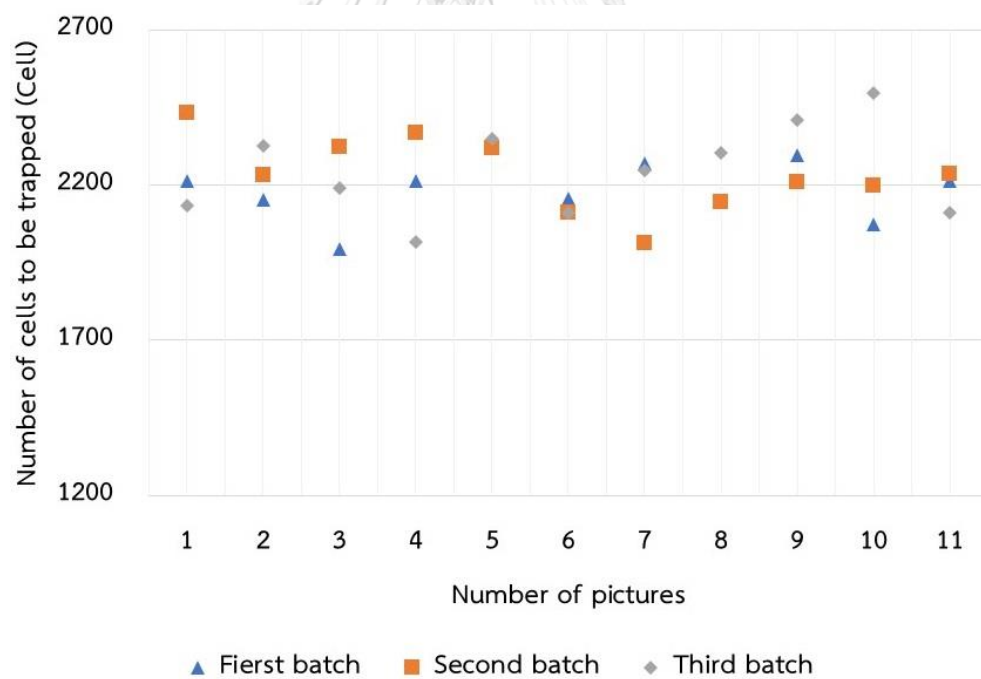
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ที่ถูกดักจับภายในหลุมจุลภาคมุม (ก) 66 (ข) 90 และ(ค) 106 องศา

ตารางที่ 5 จำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแต่ละการทดลอง

Shape of microwells	First batch				
	Targeted number of cell (2000 cells/well)	Prepared cells from culture (1000 μ l)	volume (μ l)	Added medium	Total volume (μ l)
66	173,828	2,380,000	73.03	18.51	91.5
90	183,389	3,730,000	49.16	42.38	
106	198,769	2,750,000	72.27	19.27	

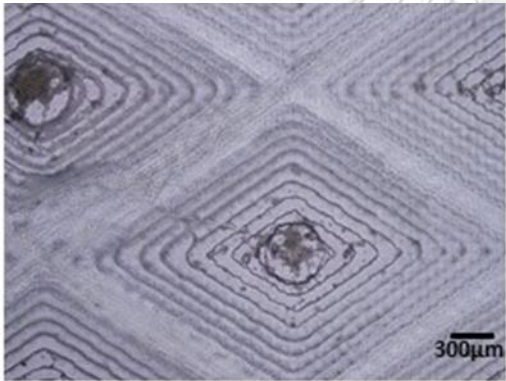
Shape of microwells	Second batch				
	Targeted number of cell (2000 cells/well)	Prepared cells from culture (1000 μ l)	volume (μ l)	Added medium	Total volume (μ l)
66	173,828	2,380,000	73.03	18.51	91.5
90	183,389	3,150,000	58.21	33.33	
106	198,769	2,750,000	72.27	19.27	

Shape of microwells	Third batch				
	Targeted number of cell (2000 cells/well)	Prepared cells from culture (1000 μ l)	volume (μ l)	Added medium	Total volume (μ l)
66	173,828	3,730,000	46.6	44.94	91.5
90	183,389	3,150,000	46.6	44.94	
106	198,769	2,710,000	73.34	18.2	

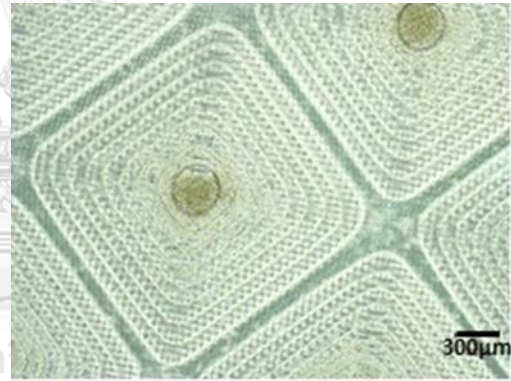
เมื่อเซลล์ตกลงไปยังหลุมจุลภาคแล้ว หลังจากนั้นป้อนอาหารเลี้ยงผ่าน Syringe pump ด้วยอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ตลอดระยะเวลาเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน พบว่าหลังจาก

เพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาค 1 วัน หลุมจุลภาคมุม 106 องศา เซลล์จะไหลมารวมกันที่ตำแหน่งทรงกระบอกน้อยสุด เนื่องจากของไหลที่ไหลผ่านหลุมจุลภาคมุม 106 องศา มีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางน้อยมากจึงทำให้เซลล์เคลื่อนที่มารวมกันบริเวณกึ่งกลางหลุมน้อย ดังรูป 4.15 ค) ในขณะที่หลุมจุลภาคมุม 66 องศา มีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางมาก ส่งผลให้ค่าความเค้นเฉือน และความเร็วบริเวณก้นหลุมสูงทำให้เซลล์ถูกรบกวนของของไหล เซลล์จึงเกิดการกระจายทั้งในทรงกระบอก และรอบ ๆ ทรงกระบอก ดังรูป 4.15 ก) สำหรับหลุมจุลภาคมุม 90 องศา ค่าความเค้นเฉือน และการเบี่ยงเบนทิศทางการไหลของของไหลอยู่ระหว่างหลุมจุลภาคมุม 66 และ 106 องศา เซลล์จึงมีการรวมตัวกันตำแหน่งทรงกระบอก (กึ่งกลางหลุม) ได้ดี และเซลล์บริเวณรอบ ๆ ทรงกระบอกมีน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 และ 106 องศา ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุที่เซลล์รอบ ๆ ทรงกระบอกน้อยเนื่องจากเซลล์ที่อยู่บริเวณนี้ถูกของไหลพาลงก้นทรงกระบอกสังเกตได้จากเซลล์ที่อยู่ในทรงกระบอกของหลุมจุลภาคมุม 90 องศา มีปริมาณที่มากที่สุด ดังรูปที่ 4.15 ข)

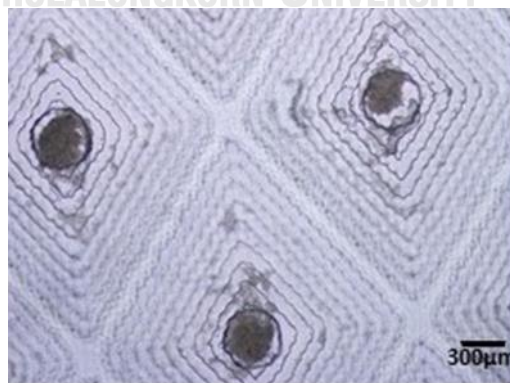
ก)



ข)



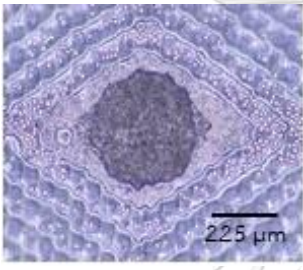
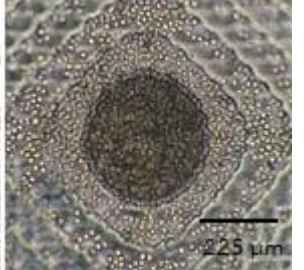
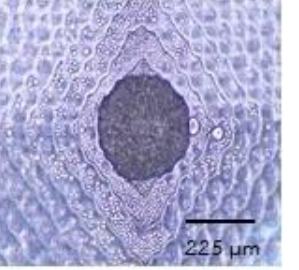
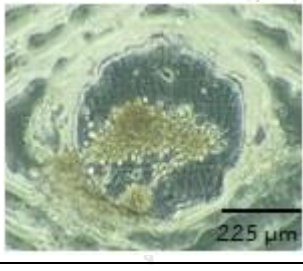
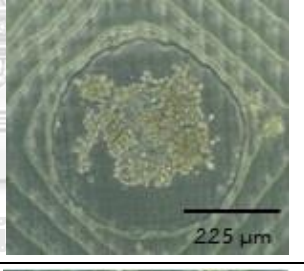

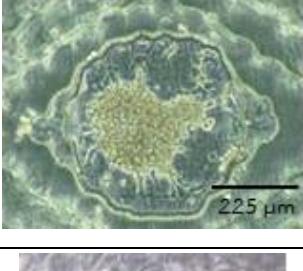
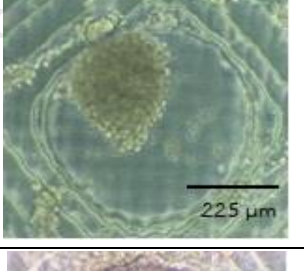
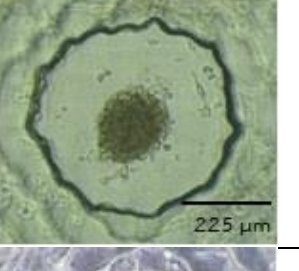
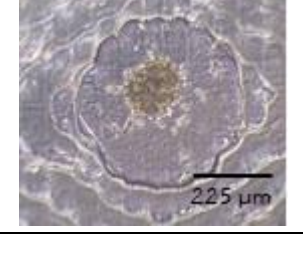


ค)



รูปที่ 4.15 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันแรกของหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา

สำหรับวันแรกเซลล์เริ่มยึดจับเป็นกลุ่มก้อนแต่ยังไม่มีลักษณะเป็นทรงกลม หลังจากเลี้ยงเซลล์ต่อในวันที่ 2 เซลล์มีการยึดจับกันมากขึ้น รูปร่างเริ่มคล้ายทรงกลมมากขึ้นดังตารางที่ 6 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์จนถึงวันที่ 3 ผลการทดลองพบว่า การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกิดขึ้นที่หลุมจุลภาคทั้ง 3 มุม โดยในวันที่ 3 ขนาด และรูปร่างของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อจะแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 6 ในหัวข้อถัดไปจะเป็นการวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อในแต่ละมุม

ตารางที่ 6 การนำเซลล์เข้าสู่ระบบของไหลจุลภาค และการเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 3 วัน

Number of day	66 Drgree	90 Drgree	106 Drgree
After seeding single cells			
First Day			
Second Day			
Third Day			

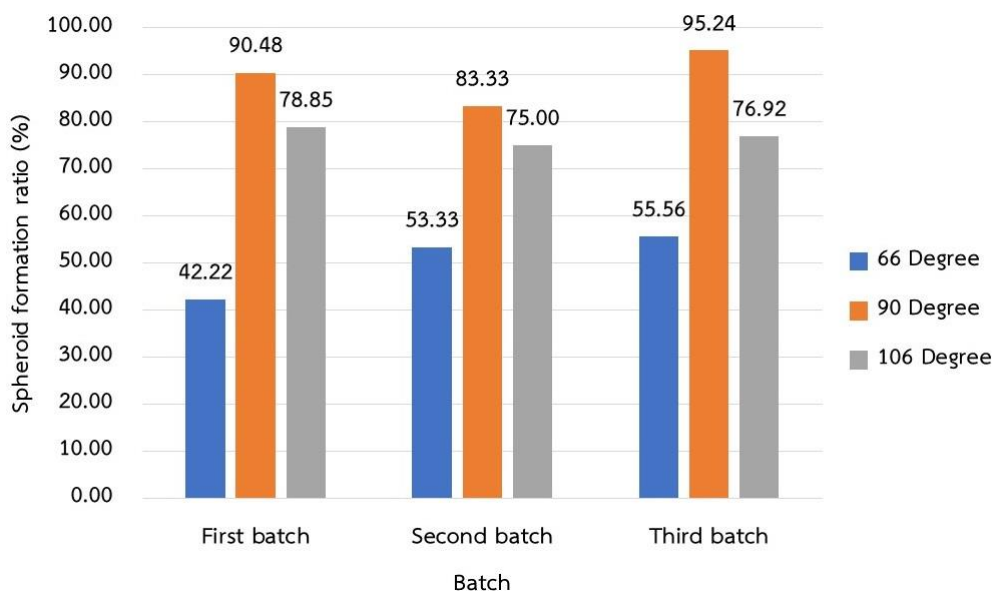
4.7 จำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน จึงทำการตรวจจำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ พบว่า หลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา มีอัตราการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อภายในหลุมจุลภาคเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ประมาณ $50.37 \pm 5.83\%$, $89.68 \pm 4.89\%$ และ $76.92 \pm 1.57\%$ ตามลำดับ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในหลุมจุลภาคหลังเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

Batch	Number of microwells to spheroids formation			Shape of microwells (%)		
	66 (45 Wells)	90 (42 Wells)	106 (52 Wells)	66	90	106
First batch	19	38	41	42.22	90.48	78.85
Second batch	24	35	39	53.33	83.33	75.00
Third batch	25	40	40	55.56	95.24	76.92
Mean	22.67	37.67	40.00	50.37	89.68	76.92
S.D.	2.62	2.05	0.82	5.83	4.89	1.57

และเพื่อให้ดูง่ายขึ้น ผู้วิจัยจะแสดงผลอัตราของจำนวนหลุมที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเป็นแผนภูมิแท่ง พบว่าจำนวนหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา ที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเฉลี่ยอยู่ $50.37 \pm 5.83\%$, $89.68 \pm 4.89\%$ และ $76.92 \pm 1.57\%$ ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.16 ซึ่งหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 องศา มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อภายในหลุมจุลภาคน้อยสุดเนื่องมาจากอัตราการใช้ของไหล และความเค้นเฉือนบริเวณก้นหลุมค่อนข้างสูง จึงทำให้เซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์มีการกระจายตัวเป็นอย่างมาส่งผลให้เซลล์แต่ละเซลล์ยึดจับกันได้ยาก



รูปที่ 4.16 แสดงจำนวนหลุมจุลภาคที่มีการการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเกิดขึ้น

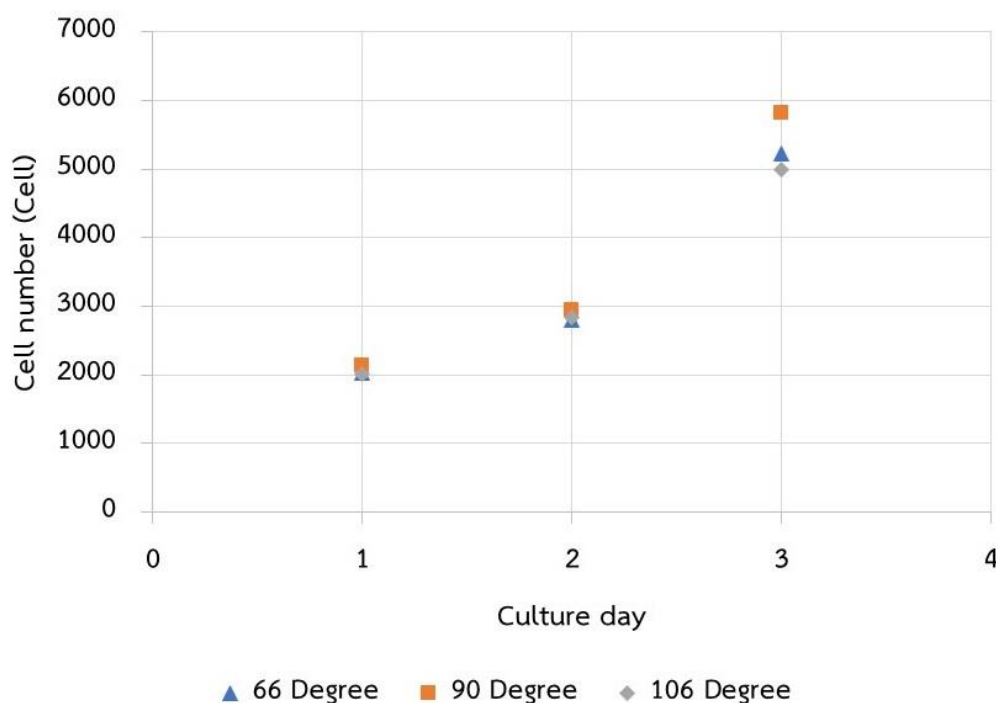
ผลการทดลองบ่งชี้ว่า อัตราการไหลของของไหล และแรงเฉือนบริเวณก้นหลุมต้องเหมาะสม จึงทำให้เซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์มีการกระจายตัว และยึดจับกันหลังจากนั้นเซลล์จะหลั่งสารโปรตีนออกมา และสร้างเป็นกลุ่มเซลล์ได้ดี

4.8 การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

หลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดที่มีมุม 66 90 และ 106 องศา ถูกเพาะเลี้ยงทั้งหมด 3 วัน (การตรวจสอบการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์จากการดูดกลืนแสง ดังภาคผนวก ก) โดยจะนำกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อที่สร้างตัวในหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่าง 10 ก้อน (2 แถวแรกของหลุมจุลภาค) มาวัดค่าความดูดกลืนแสง (Optical density or Absorbance) เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์

ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อพบว่า หลังจั่งเลี้ยงเซลล์วันแรกจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 2036 ± 229 , 2140 ± 257 และ 2020 ± 105 เซลล์ ตามลำดับ ต่อมาในวันที่สองจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 2800 ± 234 , 2940 ± 147 และ 2840 ± 193 เซลล์ ตามลำดับ และสำหรับวันที่สามจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุม 66 90 และ 106 องศา คือ 5220 ± 654 , 5820 ± 590 และ 5000 ± 391 เซลล์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.17 จากจำนวนเซลล์ของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้นในการเลี้ยงแต่ละวันแสดงให้เห็นว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ

เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคทั้ง 3 รูปร่าง พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 90 องศา มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (จำนวนเซลล์มากที่สุด) ในวันที่สาม ทั้งนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าหลุมจุลภาคมุม 90 องศา มีสภาวะแวดล้อม รวมไปถึงความเค้นเฉือนที่กระทำกับเซลล์เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์มากกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 และ 106 องศา



รูปที่ 4.17 แสดงผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเฉลี่ย

4.9 การรอดชีวิตของเซลล์

สำหรับการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ จะนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาคเป็นระยะเวลา 3 วัน มาทดสอบการมีชีวิตโดยการย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) หลังจากนั้นย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ คือ Calcein Acetoxymethyl (Calcein AM) โดยในเซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์จะเรืองแสงเป็นสีเขียวจากการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Acetoxymethyl ester ด้วยเอนไซม์ Intracellular esterases และ Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) สำหรับเซลล์ที่ตาย เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายทำให้สีสามารถเข้าไปจับกับ DNA และเรืองแสงเป็นสีแดง จึงนำสารทั้งหมดไปถ่ายรูปรูปผ่านกล้องฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence Microscope) หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์เพื่อประเมินจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต พบว่าการรอดชีวิตเฉลี่ยของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 66 90 และ 106 องศา คือ $83.05 \pm 1.27\%$, $88.5 \pm 1.57\%$ และ $83.56 \pm 1.82\%$ ดังตารางที่ 8

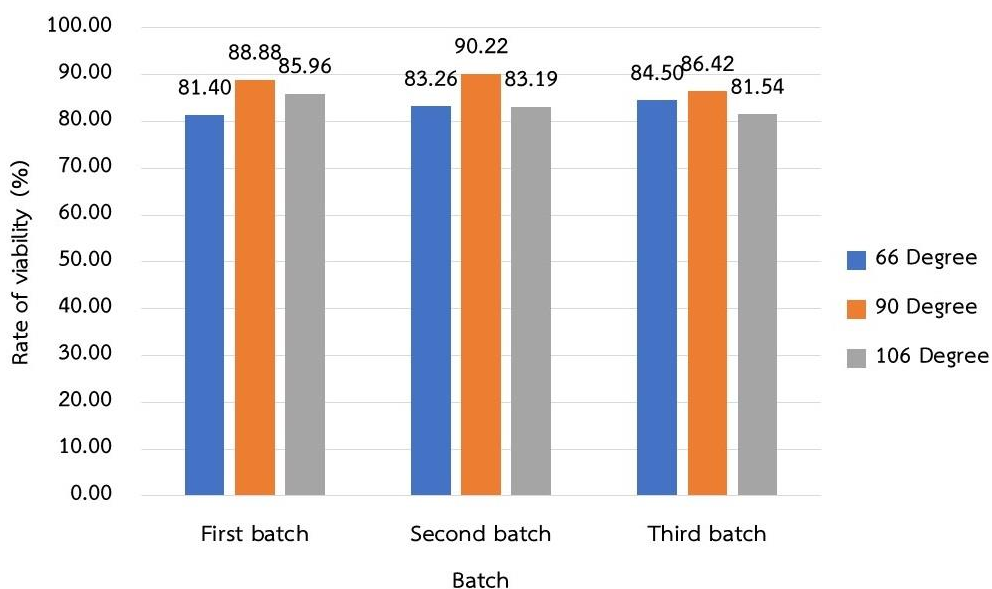
ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และตาย รวมไปถึงอัตราการรอดชีวิต

Shape of microwells	Number of cells (First batch)			
	Live	Dead	Total	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	27,071	6,186	33,257	81.40
90	65,112	8,147	73,259	88.88
106	68,644	11,212	79,856	85.96

Shape of microwells	Number of cells (Second batch)			
	Live	Dead	Total	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	37,448	7,530	44,978	83.26
90	62,070	6,729	68,799	90.22
106	64,401	13,014	77,415	83.19

Shape of microwells	Number of cells (Third batch)			
	Live	Dead	Total	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	40,267	7,387	47,654	84.50
90	669,38	10,519	77,457	86.42
106	62,553	14,162	76,715	81.54

ผลการทดลองบ่งชี้ว่า การเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาครูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุม 90 องศา มีการรอดชีวิตมากที่สุดซึ่งอาจเกิดจากการนำอาหารไปให้เซลล์ อัตราการไหล และค่าแรงเฉือนบริเวณก้นหลุมที่เหมาะสมที่สุด และเพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจผู้วิจัยจึงพร้อมอัตราการรอดชีวิตเป็นกราฟแท่ง ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.18 แสดงผลการรอดชีวิตของเซลล์

4.10 สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า หลุมจุลภาครูปรางสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุมเท่า (90 องศา) ให้ผลการสร้างกลุ่มเซลล์เป็นทรงกลม การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ จำนวนหลุมที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเซลล์ ดีกว่าหลุมจุลภาคมุมแหลม (66 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) เนื่องจากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุมเท่า (90 องศา) มีความเหมาะสมทั้งอัตราการไหลของของไหล และค่าความเค้นเฉือนของของไหลที่กระทำกับเซลล์บริเวณก้นหลุม ถึงแม้ว่ารูปรางของหลุมจุลภาคมุมแหลม (66 องศา) จะมีการพาสารอาหารกลูโคส และออกซิเจนไปให้กลุ่มเซลล์บริเวณก้นหลุมได้ดีเนื่องจากของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางหลุมค่อนข้างมาก แต่อาจเกิดความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ที่สูงมากเกินไป ส่งผลให้การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อของเซลล์ลำบาก เพราะถูกรบกวนจากของไหลค่อนข้างสูง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคมุมป้าน (106 องศา) ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมน้อยที่สุด ทำให้เซลล์บางส่วนไม่ถูกพัดพามารวมกันที่บริเวณก้นหลุมทรงกระบอก โดยเซลล์บางส่วนติดอยู่บนบริเวณผนังด้านข้าง ทำให้การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อลดต่ำลง รวมไปถึงการพาสารอาหาร และออกซิเจนไปให้เซลล์บริเวณก้นหลุมได้น้อยลงเช่นกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในบทนี้จะกล่าวสรุปรวบยอดหัวข้อต่าง ๆ ของงานวิจัยโดยเริ่มจากขั้นตอนการสืบค้นข้อมูล เกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ การหมักเวียนสารอาหารในหลุมจุลภาค การทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น กระบวนการสร้างอุปกรณ์ การจำลองการไหล และผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์

5.1 สรุปงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสองวัตถุประสงค์หลัก วัตถุประสงค์แรกเป็นการศึกษาผลกระทบของมุมของหลุมจุลภาครูปร่างทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ สำหรับการเลี้ยงด้วยการไหลแบบต่อเนื่อง และวัตถุประสงค์ที่สองคือการศึกษาการสร้างระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ต้นทุนต่ำ และรวดเร็ว งานวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Hanging drop, Forced-floating method, Matrices and scaffolds, Agitation-based approaches และ Microfluidic system พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system) ที่มีหลุมจุลภาคเป็นส่วนประกอบ จึงถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้เนื่องจากระบบของไหลจุลภาคเป็นระบบของไหลที่มีสภาวะแวดล้อมขนาดเล็ก (Microenvironment) และมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์จึงสามารถควบคุมเซลล์ในการเพาะเลี้ยงได้ง่าย ทำให้การสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อมีขนาดที่ใกล้เคียงกันทั้งหมดโดยหนึ่งในโครงสร้างที่สำคัญของระบบของไหลจุลภาคนี้คือ ช่องทางการไหลซึ่งเป็นช่องขนาดเล็กสำหรับของเหลวหรือสารละลายในระดับไมโครลิตร และในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้เริ่มได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก

เมื่อทราบถึงองค์ประกอบของปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ เช่น จำนวนเซลล์ อัตราการไหล และความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นกับเซลล์เบื้องต้นแล้ว จึงเริ่มต้นออกแบบหลุมจุลภาค ทั้ง 3 รูปร่าง คือหลุมจุลภาครูปร่างทรงพีระมิดฐานคว่ำที่มีฐานเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุมแหลม (66 องศา) มุมด้านเท่า (90 องศา) และมุมป้าน (106 องศา) โดยที่กันหลุมมีหลุมรูปร่างทรงกระบอกรัศมี 450 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เซลล์ตกลงไปรวมกัน และสร้างเป็นกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อขึ้น โดยความถี่รวมของหลุมทั้ง 3 รูปร่างคือ 550 ไมโครเมตร การออกแบบหลุมเพื่อลดการสูญเสียเซลล์ในขั้นตอนการใส่เซลล์เข้าไปในระบบการเพาะเลี้ยงนั้นให้นำหลุมมาวางเรียงชิดติดกันเพื่อลดพื้นที่ว่างไม่ให้เซลล์ไปเกาะหรือเกิดการสูญเสียเซลล์ไป ซึ่งจำนวนหลุมทั้งหมดของหลุม

จุลภาคมุมแหลม มุมด้านเท่า และมุมบ้าน คือ 45, 42 และ 52 หลุม และทำการจำลองการไหลด้วยโปรแกรม COMSOL Multiphysics 5.3a © โดยศึกษาโครงสร้างการไหล และการหมุนเวียนของสารอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนสร้างระบบของไหลจุลภาคจริง ซึ่งในการจำลองการไหลนี้ใช้น้ำเป็นตัวแทนในการจำลองการไหลเนื่องจากคุณสมบัติของน้ำใกล้เคียงกับสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น ความหนืด และความหนาแน่น เป็นต้น หลังจากศึกษากระบวนการสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคด้วยวิธี Soft lithography โดยชิ้นงานถูกสร้างด้วยลวดลายที่ออกแบบไว้ 2 ส่วน คือ ช่องการไหล และหลุมจุลภาคจากนั้นนำทั้งสองส่วนนี้มาประกบกันด้วยวิธีประสานผิวพลาสติกของออกซิเจน จากนั้นนำชิปที่สร้างได้ไปต่อท่อทางเข้า และออก แล้วนำมาใช้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้นโดยเริ่มทดลองติดตั้งอุปกรณ์ทั้งหมดเข้าด้วยกัน และการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ขนาด 15 ไมโครเมตร ด้วยอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อศึกษาว่าหลุมจุลภาครูปทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดทั้ง 3 รูปทรง นั้นหลุมจุลภาคมุมใดเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์แบบพลวัต

จากผลการจำลองการไหล และการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า หลุมจุลภาคที่มีมุมแหลม (66 องศา) ของไหลที่ไหลผ่านหลุมมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางหลุมมากกว่าหลุมจุลภาคมุมอื่น และความเร็วของของไหลภายในหลุมจะลดลงตามความลึก ทำให้ปริมาณอาหาร และออกซิเจนถูกแพร่ลงไปให้กลุ่มเซลล์บริเวณก้นหลุมได้มากกว่าหลุมจุลภาคมุมอื่น โดยของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางหลุมมากจะทำให้เกิดความเค้นเฉือนรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ที่มากเกินไป เซลล์เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อน้อย และมีขนาดเล็ก รวมไปถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ต่ำ เนื่องจากเซลล์ถูกรบกวนจากของไหลค่อนข้างสูงในระหว่างการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ สำหรับหลุมจุลภาคที่มีมุมด้านเท่า (90 องศา) ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าสู่กึ่งกลางน้อยกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 องศา ทำให้ความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ลดลงด้วย ทำให้มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ และการเจริญเติบโตของเซลล์ดีกว่าหลุมจุลภาคมุม 66 องศา เพราะเซลล์ถูกรบกวนการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อจากของไหลค่อนข้างน้อย สำหรับหลุมจุลภาคที่มีมุมบ้าน (106 องศา) ของไหลมีการเบี่ยงเบนทิศทางเข้าหาที่กึ่งกลางหลุมน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับหลุมจุลภาคมุม 66 และ 90 องศา ทำให้เซลล์บางส่วนไม่ถูกพัดพารวมกันที่บริเวณก้นหลุมทรงกระบอก โดยเซลล์บางส่วนติดอยู่บนบริเวณผนังด้านข้าง ส่งผลให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อน้อย และในหลุมจุลภาคทั้ง 3 รูปทรง ปริมาณสารอาหารกลูโคส และออกซิเจนมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันมากเนื่องจากใช้อัตราการไหลที่ต่ำมากและส่งผลให้การแพร่เป็นกลไกหลักในการขนส่งอาหารที่บริเวณรอบ ๆ เซลล์ด้วยการวางตัวแบบอเรียทำให้ปริมาณสารอาหารลดลงตั้งแต่หลุมแถวแรก ซึ่งหมายความว่ากลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อที่ถูกเพาะเลี้ยงในหลุมจุลภาคแถวถัดไปทางด้านหลังจะได้รับสารอาหารกลูโคส

และออกซิเจนน้อยลง และเมื่อเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าหลุมจุลภาคทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุมเท่า (90 องศา) มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ โดยการเจริญเติบโตของเซลล์และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มดีกว่าหลุมจุลภาครูปร่างอื่นเล็กน้อย สำหรับวัตถุประสงค์ที่สองคือการสร้างระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ต้นทุนต่ำ และรวดเร็ว ด้วยการสร้างแม่พิมพ์จากการพิมพ์สามมิติด้วยวัสดุเรซิน สำหรับการพิมพ์สามมิตินั้นทำให้สร้างแม่พิมพ์ที่มีรูปร่างที่ซับซ้อนสูงได้ แต่ยังคงจำกัดขนาดเล็ที่สุดที่สามารถสร้างได้ ทำให้ผนังด้านข้างของหลุมจุลภาคเป็นชั้นบันไดขนาดประมาณ 20-30 ไมโครเมตร นอกจากนี้วัสดุที่สร้างเป็นแม่พิมพ์ยังมีความแข็งแรงทางกล และทนต่อความร้อนได้ไม่ดี อย่างไรก็ตาม จากวิธีการพัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการหล่อสารพอลิไดเมทิลซิลิโคนได้ดี เพื่อสร้างเป็นระบบของไหลจุลภาค ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ในชิป

5.2 อภิปรายและข้อเสนอแนะ

การศึกษาพฤติกรรมกรไหล และการหมุนเวียนอาหารผ่านโปรแกรม COMSOL Multiphysics 5.3a © อาจจะได้ผลการจำลองการไหลแตกต่างจากความเป็นจริง ข้อมูลที่ใช้เป็นอินพุตป้อนเข้าไปเป็นเงื่อนไขต่าง ๆ นั้นมาจากการประมาณด้วยสมมติฐาน จากการค้นคว้าข้อมูลซึ่งบางครั้งอาจเป็นค่าที่ได้จากการวัดด้วยวิธีต่าง ๆ ซึ่งอาจมีคลาดเคลื่อนมาตั้งแต่เริ่ม เช่น ค่าการใช้สารอาหารของเซลล์ เซลล์ต่างชนิดกันมีค่าต่างกัน หรือแม้กระทั่งความเข้มข้นเองก็ยังมีผลต่อค่าการให้สารอาหารนั้น เป็นต้น แต่การคำนวณเกี่ยวกับสารอาหารนั้นหากใกล้เคียงกับความจริงมากขึ้นแล้ว โมเดลที่ใช้ในการพิจารณาการใช้สารโดยเซลล์จะซับซ้อนขึ้น นอกจากนี้ยังต้องหาข้อมูลเกี่ยวกับเซลล์ต่าง ๆ ให้สอดคล้องกับสิ่งที่นำมาศึกษามากที่สุด ที่ผ่านมามีผู้วิจัยได้ค้นคว้าข้อมูลที่สามารถหาได้ แต่ก็ยังไม่ครบถ้วนจึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลบางอย่างของเซลล์ประเภทอื่น

สำหรับปัญหาที่เกิดจากการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ก่อนจะนำเข้าสู่ระบบของไหลจุลภาค ซึ่งจำนวนเซลล์แต่ละครั้งจะไม่เท่ากันเพราะการนับเซลล์ด้วย hemocytometer เป็นการนับเซลล์แบบประมาณ แต่ความคลาดเคลื่อนของจำนวนเซลล์จะต่างกั น้อย จึงทำให้ผลการทดลองในแต่ละครั้งมีคลาดเคลื่อนไม่มากเกินไป

บรรณานุกรม

- [1] P. V. Guillot, W. Cui, N. M. Fisk, and D. J. Polak, "Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering," *J Cell Mol Med*, vol. 11, no. 5, pp. 935-44, Sep-Oct 2007.
- [2] R. Vadivelu, H. Kamble, M. Shiddiky, and N.-T. Nguyen, "Microfluidic Technology for the Generation of Cell Spheroids and Their Applications," *Micromachines*, vol. 8, no. 4, 2017.
- [3] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gomez-Sjoberg, and R. M. T. Fleming, "Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices," *Biosens Bioelectron*, vol. 63, pp. 218-231, Jan 15 2015.
- [4] K. Moshksayan *et al.*, "Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 263, pp. 151-176, 2018.
- [5] G. N. Bancroft *et al.*, "Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner," vol. 99, no. 20, pp. 12600-12605, 2002.
- [6] J. Y. Park *et al.*, "Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation," *Microfluid Nanofluidics*, vol. 8, no. 2, pp. 263-268, Feb 1 2010.
- [7] Y. Jun *et al.*, "In vivo-mimicking microfluidic perfusion culture of pancreatic islet spheroids," vol. 5, no. 11, p. eaax4520, 2019.
- [8] Y. Kato, M. H. Kim, and M. Kino-Oka, "Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells," *J Biosci Bioeng*, vol. 125, no. 6, pp. 736-740, Jun 2018.
- [9] T. Tongmanee *et al.*, "Effects of the cell and triangular microwell size on the cell-trapping efficacy and specificity," vol. 33, no. 11, pp. 5571-5580, 2019.
- [10] D. Ketpun *et al.*, "A Potential Application of Triangular Microwells to Entrap Single Cancer Cells: A Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Model," *Micromachines (Basel)*, vol. 10, no. 12, Dec 1 2019.

- [11] J. M. Cha *et al.*, "A novel cylindrical microwell featuring inverted-pyramidal opening for efficient cell spheroid formation without cell loss," *Biofabrication*, vol. 9, no. 3, p. 035006, Aug 14 2017.
- [12] N. Gupta, J. R. Liu, B. Patel, D. E. Solomon, B. Vaidya, and V. Gupta, "Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research," *Bioeng Transl Med*, vol. 1, no. 1, pp. 63-81, Mar 2016.
- [13] D. Miyamoto and K. Nakazawa, "Differentiation of mouse iPS cells is dependent on embryoid body size in microwell chip culture," *J Biosci Bioeng*, vol. 122, no. 4, pp. 507-12, Oct 2016.
- [14] Y. Wang *et al.*, "Spheroid Formation of Hepatocarcinoma Cells in Microwells: Experiments and Monte Carlo Simulations," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, p. e0161915, 2016.
- [15] B. Zhang *et al.*, "Fabrication of agarose concave petridish for 3D-culture microarray method for spheroids formation of hepatic cells," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 29, no. 5, p. 49, Apr 19 2018.
- [16] A. Seyfoori *et al.*, "Self-filling microwell arrays (SFMA) for tumor spheroid formation," *Lab Chip*, vol. 18, no. 22, pp. 3516-3528, Nov 6 2018.
- [17] S. A. Lee, Y. No da, E. Kang, J. Ju, D. S. Kim, and S. H. Lee, "Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte-hepatic stellate cell interactions and flow effects," *Lab Chip*, vol. 13, no. 18, pp. 3529-37, Sep 21 2013.
- [18] L. D. Ma *et al.*, "Design and fabrication of a liver-on-a-chip platform for convenient, highly efficient, and safe in situ perfusion culture of 3D hepatic spheroids," *Lab Chip*, vol. 18, no. 17, pp. 2547-2562, Aug 21 2018.
- [19] H. R. Lee and J. H. Sung, "Effect of culture condition on cell viability and gel contraction in a skin chip," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 87, pp. 60-67, 2020.
- [20] A. Super *et al.*, "Real-time monitoring of specific oxygen uptake rates of embryonic stem cells in a microfluidic cell culture device," *Biotechnol J*, vol. 11, no. 9, pp. 1179-89, Sep 2016.
- [21] M. Barisam, M. S. Saidi, N. Kashaninejad, R. Vadivelu, and N. T. Nguyen,

- "Numerical Simulation of the Behavior of Toroidal and Spheroidal Multicellular Aggregates in Microfluidic Devices with Microwell and U-Shaped Barrier," *Micromachines (Basel)*, vol. 8, no. 12, Dec 11 2017.
- [22] A. Taghibakhshi, M. Barisam, M. S. Saidi, N. Kashaninejad, and N. T. Nguyen, "Three-Dimensional Modeling of Avascular Tumor Growth in Both Static and Dynamic Culture Platforms," *Micromachines (Basel)*, vol. 10, no. 9, Aug 31 2019.
- [23] B. A. Wagner, S. Venkataraman, and G. R. Buettner, "The rate of oxygen utilization by cells," *Free Radic Biol Med*, vol. 51, no. 3, pp. 700-12, Aug 1 2011.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การคำนวณจำนวนเซลล์ต่อหลอด

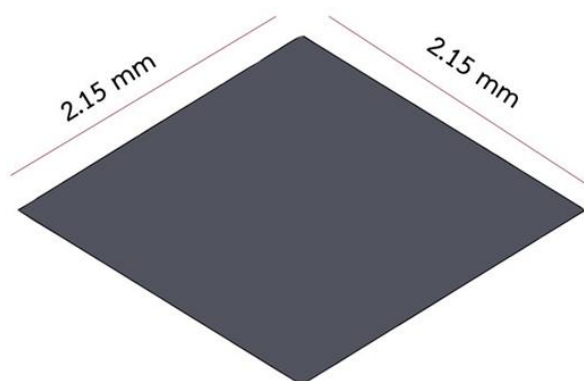
- คำนวณพื้นที่ของช่องทางการไหลโดยมีความสูงคือ 250 ไมโครเมตร



$$\begin{aligned}
 \text{พื้นที่รวม} &= \text{พื้นที่ 1} + \text{พื้นที่ 2} \\
 &= (22\text{mm})(12.5\text{mm}) + \left(\frac{12.5}{4} \times 4 \sqrt{(10.151)^2 - (12.5)^2}\right) \\
 &= 366.179 \text{ mm}^2 \\
 \\
 \text{ปริมาตรรวม} &= \text{ปริมาตร 1} + \text{ปริมาตร 2} \\
 &= (22)(12.5)(0.25) + \left(\frac{12.5}{4} \times 4 \sqrt{(10.151)^2 - (12.5)^2}\right)(0.25) \\
 &= 91.544 \text{ mm}^3 \\
 &= 91.544 \text{ } \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ใช้ปริมาตรของหลอดฉีดยาประมาณ 91.5 μl

- คำนวณจำนวนเซลล์ 2000 เซลล์ต่อหลอดจุลภาคของมุม 66 องศา



พื้นที่ของสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดคือ 4.22 mm^2 (คำนวณจากโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์)

เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า	พื้นที่	4.22	mm ²	เท่ากับ	2000	cell
แล้ว	พื้นที่	366.179	mm ²	เท่ากับ	$\frac{2000 \times 366.779}{4.22}$	cell
				เท่ากับ	173,828.9	cell

ดังนั้น พื้นที่ 366.179 ตารางมิลลิเมตร ใช้ 173,828.9 cell

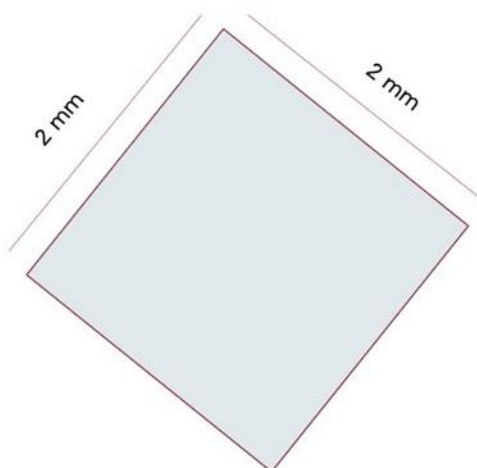
เตรียม เซลล์ $119 \times 20,000 = 2,380,000$ cell ที่ pipette 1000 ul หลังจากนั้น เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า	2,380,000	cell	ใช้ pipette ขนาด	1000	ul
แล้ว	173,828.9	cell	ใช้ pipette ขนาด	$\frac{1000 \times 173,828.9}{2,380,000}$	ul
			ใช้ pipette ขนาด	73.037	ul

ดังนั้น ใช้ pipette ขนาด 73.037 ul ดูดเซลล์

pipette ขนาด $91.544 - 73.037 = 18.507$ ul ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์

- คำนวณจำนวนเซลล์ 2000 เซลล์ต่อหลุมจุลภาคของมุม 90 องศา



พื้นที่ของสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดคือ 4 mm^2 (คำนวณจากโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์)

เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า	พื้นที่	4	mm ²	เท่ากับ	2000	cell
แล้ว	พื้นที่	366.179	mm ²	เท่ากับ	$\frac{2000 \times 366.779}{4}$	cell
				เท่ากับ	183,389.5	cell

ดังนั้น พื้นที่ 366.179 ตารางมิลลิเมตร ใช้ 183,389.5 cell

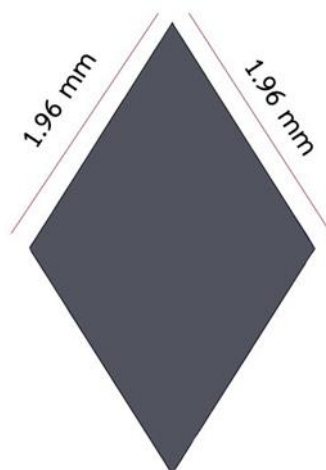
เตรียม เซลล์ $119 \times 20,000 = 2,380,000$ cell ที่ปิเปต 1000 ul หลังจากนั้น เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า	2,380,000	cell	ใช้ปิเปตขนาด	1000	ul
แล้ว	183,389.5	cell	ใช้ปิเปตขนาด	$\frac{1000 \times 183,389.5}{2,380,000}$	ul
			ใช้ปิเปตขนาด	77.05	ul

ดังนั้น ใช้ปิเปตขนาด 77.05 ul ตูดเซลล์

ปิเปตขนาด $91.544 - 77.05 = 14.49$ ul ตูดอาหารเลี้ยงเซลล์

- คำนวนจำนวนเซลล์ 2000 เซลล์ต่อหลุมจุลภาคของมุม 106 องศา



พื้นที่ของสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดคือ 3.69 mm² (คำนวนจากโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์)

เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า พื้นที่ 3.69 mm² เท่ากับ 2000 cell

แล้ว พื้นที่ 366.179 mm² เท่ากับ $\frac{2000 \times 366.779}{3.69}$ cell

เท่ากับ 198,796.2 cell

ดังนั้น พื้นที่ 366.179 ตารางมิลลิเมตร ใช้ 198,796.2 cell

เตรียม เซลล์ 119x20,000 = 2,380,000 cell ที่ปีเปิด 1000 ul หลังจากนั้น เทียบบัญญัติยาง จะได้

ถ้า 2,380,000 cell ใช้ปีเปิดขนาด 1000 ul

แล้ว 198,796.2 cell ใช้ปีเปิดขนาด $\frac{1000 \times 198,796.2}{2,380,000}$ ul

ใช้ปีเปิดขนาด 83.52 ul

ดังนั้น ใช้ปีเปิดขนาด 83.52 ul ดูดเซลล์

ปีเปิดขนาด 91.544 – 83.52 = 8.024 ul ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์

ภาคผนวก ข
 อุปกรณ์สำหรับการขึ้นรูประบบของไหลจุลภาค



Silicone elastomer (PDMS)

ถุงมือ



ตู้อบสุญญากาศ

เครื่อง Plasma cleaner PDC-37G



Hot plate

เครื่องชั่งน้ำหนัก



อุปกรณ์เจาะรู



แม่พิมพ์

ภาคผนวก ค
อุปกรณ์สำหรับการทดลอง



Syringe pump



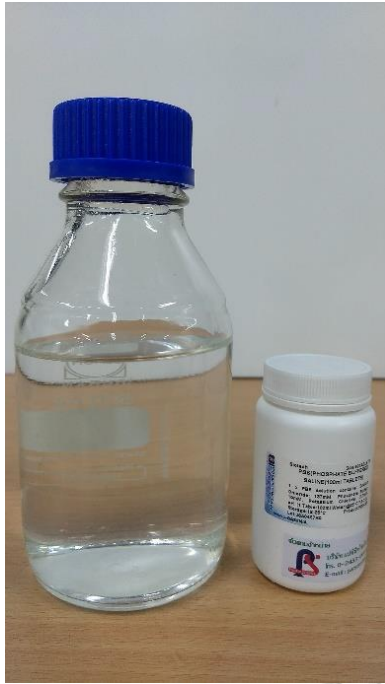
ปิเปต



Petri dish



กล้องกล้องจุลทรรศน์



สารละลาย PBS



หลอดทดลอง



หลอดฉีดยาเชื่อมต่อกับท่อซิลิโคนและคอนเนคเตอร์



อาหารเลี้ยงเซลล์ (Medium culture)



เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)



ตู้เพาะเชื้อ incubator



Cell counting



อุปกรณ์ของไหลจุลภาค

ภาคผนวก ง การคำนวณความเร็ว

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการจำลองการไหล

การไหลแบบราบเรียบ (laminar flow) หรือการไหลแบบสม่ำเสมอ คือ รูปแบบการไหลที่อนุภาคของของไหลเคลื่อนที่อย่างเป็นระเบียบ ไม่มีการผสมกันระหว่างชั้นของไหล ลักษณะการไหลแบบนี้ โดยทั่วไปเกิดขึ้นกับของไหลที่มีความหนืด (viscosity) สูงและไหลด้วยความเร็วต่ำ หรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อที่ของไหลไหลผ่านมีขนาดใหญ่ มาก ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของไหลที่ไหลภายในท่อ

การไหลแบบเฟสเดียว (single-phase fluid-flow) เป็นการไหลของของไหลที่มีสถานะเดียวที่ขึ้นกับสมการนาเวียร์-สโตกส์ และกำหนดให้ของไหลนั้นเป็นของนิวโตเนียน (Newtonian) ซึ่งมีรูปสมการทั่วไปคือ

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho u) = 0$$

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho (u \cdot \nabla) u = \nabla \cdot [-P I + \tau] + F$$

โดยที่ ρ คือ ความหนาแน่น (Kg/m^3), u คือ ความเร็ว (m/s), P คือ ความดัน (Pa), τ คือ viscous stress tensor (Pa) และ F คือ แรงที่กระทำเชิงปริมาตร (volume force vector, N/m^3) เมื่ออุณหภูมิของการไหลมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยสามารถสันนิษฐานว่าเป็นการไหลแบบอัดตัวไม่ได้ (Incompressible Flow) ซึ่งความหนาแน่นของของไหลคงที่ กรณีนี้เช่นนี้สำหรับการไหลของของไหลทั้งหมดภายใต้เงื่อนไขปกติ (normal conditions) และสำหรับแก๊สที่มีความเร็วต่ำในกรณีที่ความหนาแน่นคงที่ จะได้สมการ

$$\nabla \cdot (\rho u) = 0$$

ลักษณะการไหลของของไหลสามารถพิจารณาได้จากค่าตัวเลขเรย์โนลด์ (Reynolds number, Re) ซึ่งเป็นตัวเลขที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของของไหลที่เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ (temperature) และความดัน (pressure) ได้แก่ ความหนาแน่น (ρ) และความหนืด (μ)

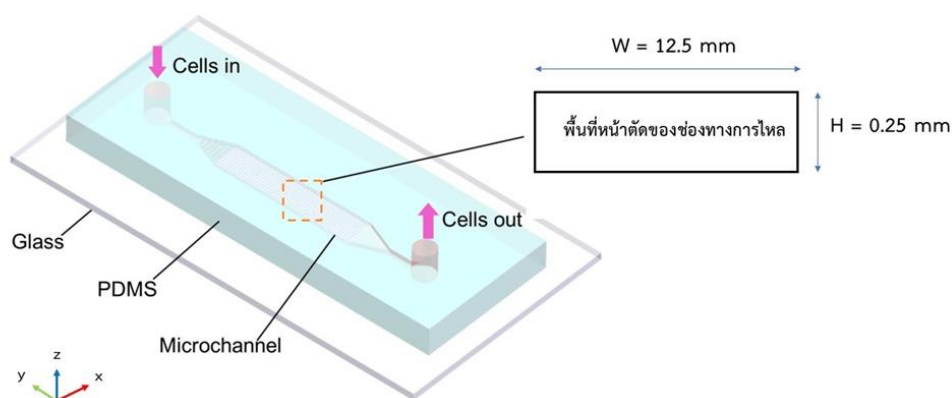
ความเร็วของของไหล (v) ที่ไหลภายในท่อ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ (D) ของไหลที่ไหลภายในท่อที่มีการไหลแบบราบเรียบจะมีตัวเลขเรย์โนลด์ต่ำ

$$Re = \frac{\rho V D}{\mu}$$

โดยมีค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์วิกฤตเป็นตัวบ่งบอกถึงการเปลี่ยนลักษณะการไหลของของไหลจากแบบราบเรียบ (laminar flow) ไปเป็นการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) สำหรับของไหลที่ไหลในท่อที่มีค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์วิกฤตเท่ากับ 2,300 ถ้า Re มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2,000 ($Re \leq 2,000$) ของไหลจะมีลักษณะการไหลแบบราบเรียบ (laminar flow) ถ้า Re มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 4,000 ($Re \geq 4,000$) ของไหลจะมีลักษณะการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow)

ตารางที่ 9 ตารางพารามิเตอร์สำหรับการคำนวณความเร็ว

parameter	value
Flow rate [$\mu\text{L/hr}$]	10
W [mm]	12.5
H [mm]	0.25
V [m/s]	1.777×10^{-6}
D_h [m]	4.90196×10^{-4}
Density [kg/m]	998
Dynamic viscosity [Pa s]	0.001
Reynold	8.6933×10^{-3}



คำนวณความเร็วของการไหล

จากสูตร อัตราการไหล (Q) = พื้นที่หน้าตัด (A) x ความเร็วของของไหล (V)

$$V = \frac{Q}{A}$$

$$V = \frac{\left[\frac{10 \times 10^{-6} \text{ (L)}}{3600 \text{ (S)}} \right] \times \left[\frac{1 \text{ (m}^3\text{)}}{1000 \text{ (L)}} \right]}{\left[12.5 \times 10^{-3} \text{ (m)} \right] \times \left[0.25 \times 10^{-3} \text{ (m)} \right]}$$

$$V = 0.888 \times 10^{-6} \text{ m/s}$$

คำนวณ Reynold

จากสูตร

$$Re = \frac{\rho V D_h}{\mu}$$

$$D_h = \frac{4A}{P}$$

- โดยที่ ρ คือ ความหนาแน่นของของไหล [kg/m]
 D_h คือ ขนาดความโตภายในท่อของไฮโดลิก [m]
 μ คือ ความหนืดของของเหลวแบบไดนามิกส์ [Pa s]
 A คือ พื้นที่หน้าตัดของของไหล [m²]
 P คือ ระยะทางของเส้นรอบรูปที่สัมผัสการไหลเท่านั้น (wetted perimeter)

แทนค่า

$$Re = \frac{4\rho VA}{\mu P}$$

$$Re = \frac{4 \times 998 \times 0.888 \times 10^{-6} \times 0.0125 \times 0.00025}{0.001 \times (2 \times (0.0125 + 0.00025))}$$

$$Re = 4.346 \times 10^{-3}$$

จากผลการคำนวณ Re พบว่ามีค่าน้อยกว่า 2300 ดังนั้นในระบบนี้จึงเป็นการไหลแบบราบเรียบ (Laminar flow)



ภาคผนวก จ

การคำนวณความเข้มข้นของสารอาหาร

ตารางที่ 10 ค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับการคำนวณการใช้กลูโคส และออกซิเจน

Parameter	Values	Descriptions
$D_{\text{Glucose-water}} [\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$	9.27×10^{-10}	Diffusion coefficient of glucose through H_2O [22]
$D_{\text{Oxygen-water}} [\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$	3.0×10^{-9}	Diffusion coefficient of oxygen through H_2O [18]
$K_{\text{H},\text{O}_2} [\text{mol m}^{-3} \text{mmHg}^{-1}]$	1.32×10^{-3}	Henry's constant for oxygen [18]
$P_{\text{Oxygen}} [\text{mmHg}]$	159.6	Oxygen partial pressure in atmosphere
$P_{\text{PDMS}} [\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{mmHg}^{-1}]$	3.786×10^{-11}	Oxygen permeability in PDMS [18]
$C_{\text{in, oxygen}} [\text{mol m}^{-3}]$	0.21	Oxygen concentration in medium entering the system [18]
$C_{\text{in, glucose}} [\text{mol m}^{-3}]$	25	15% FBS contain 4500 mg of glucose
$K_{\text{m, oxygen}} [\text{mol m}^{-3}]$	0.00463	Michaelis-Menten constant for oxygen consumption [22]
$K_{\text{m, glucose}} [\text{mol m}^{-3}]$	0.04	Michaelis-Menten constant for glucose consumption [18]
$s\text{OUR} [\text{mol cell}^{-1} \text{s}^{-1}]$	6×10^{-17}	Measured oxygen uptake rate of MEF [23]
$s\text{OUR} [\text{mol cell}^{-1} \text{s}^{-1}]$	4.42×10^{-16}	Measured Glucose uptake rate of MEF [18]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมการพื้นฐานสำหรับการกระจายตัวความเข้มข้น

$$\nabla \cdot (-D \nabla c) = R + J - u \cdot \nabla c \quad (1)$$

$$R = \left(\frac{V_{\text{max},\text{O}_2 c}}{K_{\text{m},\text{O}_2} + c} \right) \frac{1}{S_{\text{sphere}}} \quad (2)$$

$$J = \frac{P_{\text{PDMS}}}{L} \left(P_{\text{O}_2} - \frac{C_{\text{O}_2}}{K_{\text{H},\text{O}_2}} \right) \quad (3)$$

สมการ (1) เป็นสมการแสดงความเข้มข้นที่อยู่ในรูปพลาซมี มีหน่วยเป็น $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ โดยที่ D คือสัมประสิทธิ์การแพร่ของออกซิเจนในน้ำ (Diffusion coefficient of oxygen through H_2O , $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), R คือ อัตราการใช้ออกซิเจนสารอาหาร ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), J คือ พลาซมีของออกซิเจนจากอากาศ ด้านนอกที่แพร่ผ่าน PDMS เข้ามา ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

สมการ (2) เป็นสมการที่ใช้คำนวณหาค่า R โดยที่ $V_{\text{max},\text{O}_2}$ คือ อัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุดของเซลล์ (Measured oxygen uptake rate of MEF) โดยค่านี้มาจากการทดลองอาจแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์หรือวิธีการทดลอง, c คือ ความเข้มข้นของออกซิเจน (Oxygen concentration in medium entering the system), K_{m,O_2} คือ สัมประสิทธิ์ Michaelis-Menten ขึ้นอยู่กับสารและเซลล์ที่บริโภคนั้น, S_{sphere} คือ พื้นที่ผิวของก้อนเซลล์ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์

สมการ (3) เป็นสมการที่ใช้หาค่าออกซิเจนที่แพร่จากอากาศภายนอกผ่านวัสดุ PDMS เข้ามา โดยมีความแตกต่างของสัดส่วนความดันของออกซิเจนภายนอกและภายในเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการแพร่ดังกล่าว [23], L คือ ความหนาของ PDMS, P_{O_2} คือ สัดส่วนความดันของออกซิเจนในบรรยากาศ (Oxygen partial pressure in atmosphere) และ K_{H,O_2} คือค่าคงที่ Henry ของออกซิเจน (Henry's constant for oxygen)

1. คำนวณการใช้ออกซิเจนของเซลล์

จากสูตร

$$R = \left(\frac{V_{\text{max},\text{O}_2} c}{K_{\text{m},\text{O}_2} + c} \right) \frac{1}{S_{\text{sphere}}}$$

และค่าต่าง ๆ ที่นำมาแทนค่ามาจากรายข้างต้นดังนี้

$$V_{\text{max},\text{O}_2} = 6 \times 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{m}, \text{oxygen}} = 0.00463 \text{ mol m}^{-3}$$

คำนวณพื้นที่ผิวของก้อนเซลล์ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์ (S_{sphere}) จะได้

$$S_{\text{sphere}} = 4\pi r^2$$

$$S_{\text{sphere}} = 4\pi (0.1 \times 10^{-3})^2$$

$$S_{\text{sphere}} = 1.256664 \times 10^{-7} \text{ m}^2$$

นำค่าที่ได้ทั้งหมดมาแทนในสูตร

$$R = \left(\frac{V_{\max, O_2} C}{K_{m, O_2} + C} \right) \frac{1}{S_{\text{sphere}}}$$

เนื่องจากก้อน Spheroid มี 2000 cell ดังนั้น $V_{\max, O_2} = 2000 \times 6 \times 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$

จะได้

$$R(C) = \left(\frac{(2000 \times 6 \times 10^{-17})(C)}{0.00463 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}, \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

สำหรับ ปริมาณฟลักซ์ที่ออกจากระบบจะคำนวณโดยใช้สมการ

$$J_0 = k_c(C_b - C), \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

โดยที่ k_c คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวล (m/s) และ C_b คือ ปริมาณความเข้มข้นของสาร จากความสัทพันธ์ทั้ง 2 สมการข้างต้นจะได้

$$k_c(C_b - C) = \left(\frac{(2000 \times 6 \times 10^{-17})(C)}{0.00463 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}; C_b = 0 \text{ mol/m}^3$$

$$k(C) = \left(\frac{(2000 \times 6 \times 10^{-17})}{0.00463 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}, \text{ m/s}$$

ดังนั้น นำค่า $K(C)$ ไปกรอกลงในโปรแกรมเพื่อทำการคำนวณต่อไป (เนื่องจากทิศทางการเคลื่อนที่ของฟลักซ์ไปข้างหน้าจึงได้สมการเป็นบวก)

2. การคำนวณการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศภายนอกผ่าน PDMS เข้ามา

จากสูตร

$$J = \frac{P_{\text{PDMS}}}{L} \left(P_{\text{O}_2} - \frac{C_{\text{O}_2}}{K_{\text{H}_2\text{O}_2}} \right)$$

และค่าต่าง ๆ ที่นำมาแทนค่ามาจากตารางข้างต้นดังนี้

$$P_{\text{PDMS}} = 3.786 \times 10^{-11} \text{ mol m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$$

$$L = 0.00375 \text{ m}$$

$$P_{\text{O}_2} = 159.6 \text{ mmHg}$$

$$K_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1.32 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$$

นำค่าที่ได้ทั้งหมดมาแทนในสูตร

$$J = \frac{P_{\text{PDMS}}}{L} \left(P_{\text{O}_2} - \frac{C_{\text{O}_2}}{K_{\text{H}_2\text{O}_2}} \right)$$

จะได้

$$J = \frac{3.79 \times 10^{-11}}{0.00375} \left(159.6 - \frac{C}{0.00132} \right), \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

สำหรับ ปริมาณฟลักซ์ที่ออกจากระบบจะคำนวณโดยใช้สมการ

$$J_0 = k_c(C_b - C), \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

จะได้

$$k_c(C_b - C) = \frac{3.79 \times 10^{-11}}{0.00375} \left(159.6 - \frac{C}{0.00132} \right) : C_b = 0.21 \text{ mol/m}^3$$

$$k(C) = \frac{3.79 \times 10^{-11}}{0.00375} \times \left(\frac{1}{0.21 - C} \right) \left(159.6 - \frac{C}{0.00132} \right); \text{ m/s}$$

ดังนั้น นำค่า $k(C)$ ไปกรอกลงในโปรแกรมเพื่อทำการคำนวณต่อไป

3. คำนวณการใช้กลูโคสของเซลล์

จากสูตร

$$R = \left(\frac{V_{\max, \text{Glucose}} C}{K_{m, \text{Glucose}} + C} \right) \frac{1}{S_{\text{sphere}}}$$

และค่าต่าง ๆ ที่นำมาแทนค่ามาจากตารางข้างต้นดังนี้

$$V_{\max, \text{Glucose}} = 4.42 \times 10^{-16} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$C_{\text{in, glucose}} = 25 \text{ mol m}^{-3}$$

$$K_{m, \text{glucose}} = 0.004 \text{ mol m}^{-3}$$

คำนวณพื้นที่ผิวของก้อนเซลล์ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์ (S_{sphere}) จะได้

$$S_{\text{sphere}} = 4\pi r^2$$

$$S_{\text{sphere}} = 4\pi (0.1 \times 10^{-3})^2$$

$$S_{\text{sphere}} = 1.256664 \times 10^{-7} \text{ m}^2$$

นำค่าที่ได้ทั้งหมดมาแทนในสูตร

$$R = \left(\frac{V_{\max, O_2} C}{K_{m, O_2} + C} \right) \frac{1}{S_{\text{sphere}}}$$

เนื่องจากก้อน Spheroid มี 2000 cell ดังนั้น $V_{\max, O_2} = 2000 \times 6 \times 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$

จะได้

$$R(C) = \left(\frac{(2000 \times 4.42 \times 10^{-16})(C)}{0.004 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}} ; \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

สำหรับ ปริมาณฟลักซ์ที่ออกจากระบบจะคำนวณโดยใช้สมการ

$$J_0 = k_c(C_b - C), \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

โดยที่ k_c คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวล (m/s) และ C_b คือ ปริมาณความเข้มข้นของสาร จากความสัมพันธ์ทั้ง 2 สมการข้างต้นจะได้

$$k_c(C_b - C) = \left(\frac{(2000 \times 4.42 \times 10^{-16})(C)}{0.004 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}} ; C_b = 0 \text{ mol/m}^3$$

$$k(C) = \left(\frac{(2000 \times 4.42 \times 10^{-16})}{0.004 + C} \right) \times \frac{1}{1.25664 \times 10^{-7}}, \text{ m/s}$$

ดังนั้น นำค่า $k(C)$ ไปกรอกลงในโปรแกรมเพื่อทำการคำนวณต่อไป (เนื่องจากทิศทางการเคลื่อนที่ของฟลักซ์ไปข้างหน้าจึงได้สมการเป็นบวก)

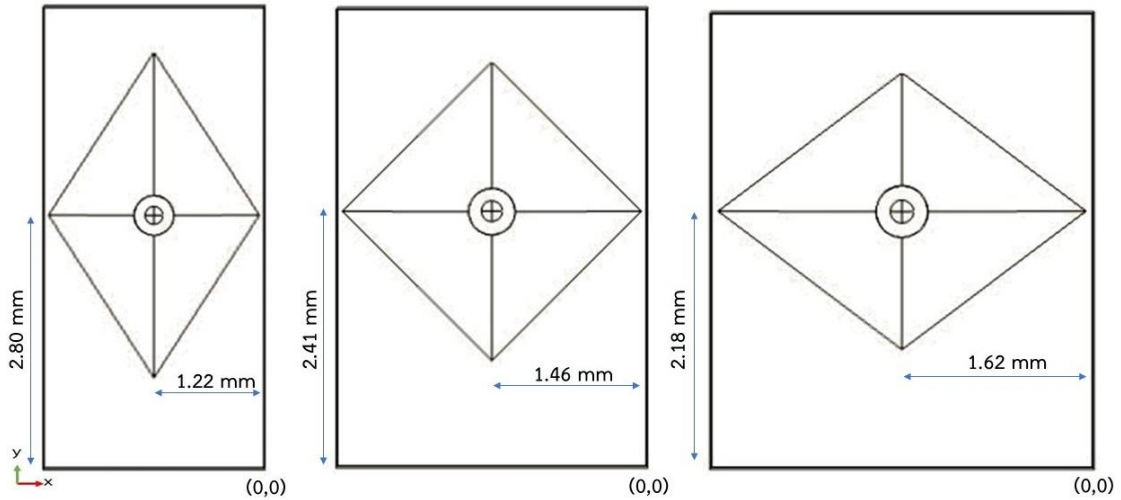
NOTE : เนื่องจากหน่วยของสมการทั้ง 3 สมการดังกล่าว โปรแกรมไม่สามารถคำนวณได้ ผู้วิจัยจึงสร้างหน่วยของสมการดังกล่าว (จะไม่ใช้หน่วยจริง) ขึ้นมาเพื่อนำไปโปรแกรมสามารถคำนวณได้โดยจะ

แทนค่าคงที่ (ไม่มีหน่วย) ในโปรแกรม ส่วนตัวแปรที่ไม่ได้แทนเป็นค่าคงที่จะใส่หน่วยจริง เพื่อให้สมการเป็นจริงและสามารถคำนวณได้

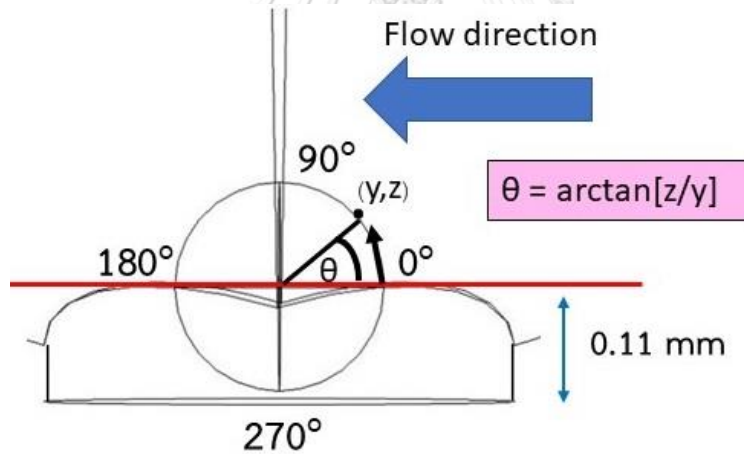


ภาคผนวก ฉ

การคำนวณตำแหน่งมุมรอบ ๆ กลุ่มเซลล์



พิจารณาเส้นรอบกลุ่มเซลล์ตามแกน ZY (ทิศทางทวนเข็มนาฬิกา)



มุม 0-90°

- หุ้ลุมจุลภาคมุม 66 องศาค $\theta = \arctan[(Z-0.11)/(2.8-Y)]$
- หุ้ลุมจุลภาคมุม 90 องศาค $\theta = \arctan[(Z-0.11)/(2.41-Y)]$
- หุ้ลุมจุลภาคมุม 106 องศาค $\theta = \arctan[(Z-0.11)/(2.18-Y)]$

มุม 90-180°

- หุ้ลุมจุลภาคมุม 66 องศาค $\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(2.8-Y)]$
- หุ้ลุมจุลภาคมุม 90 องศาค $\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(2.41-Y)]$
- หุ้ลุมจุลภาคมุม 106 องศาค $\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(2.18-Y)]$

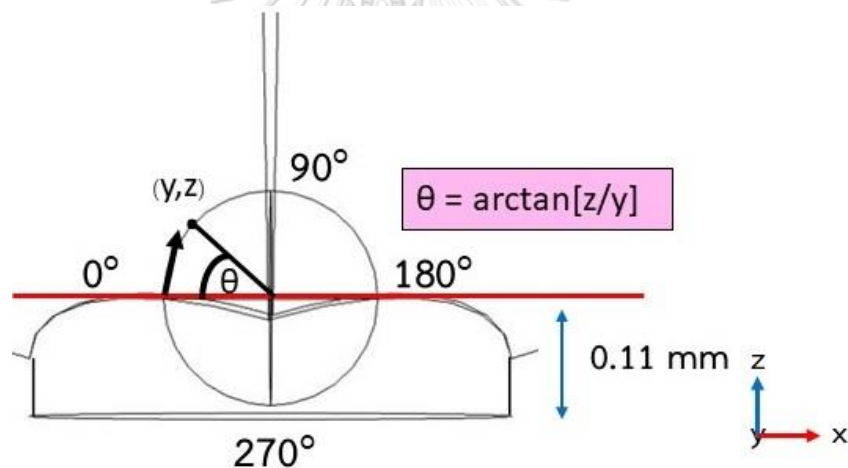
มุม 180-270°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา	$\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(Y-2.8)]$
หลุมจุลภาคมุม 90 องศา	$\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(Y-2.41)]$
หลุมจุลภาคมุม 106 องศา	$\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(Y-2.18)]$

มุม 270-360°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา	$\theta = 360 - \arctan[(Z-0.11)/(2.8-Y)]$
หลุมจุลภาคมุม 90 องศา	$\theta = 360 - \arctan[(Z-0.11)/(2.41-Y)]$
หลุมจุลภาคมุม 106 องศา	$\theta = 360 - \arctan[(Z-0.11)/(2.18-Y)]$

พิจารณาเส้นรอบกลุ่มเซลล์ตามแกน ZX (ทิศทางตามเข็มนาฬิกา)



มุม 0-90°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา	$\theta = \arctan[(Z-0.11)/(X-1.22)]$
หลุมจุลภาคมุม 90 องศา	$\theta = \arctan[(Z-0.11)/(X-1.46)]$
หลุมจุลภาคมุม 106 องศา	$\theta = \arctan[(Z-0.11)/(X-1.62)]$

มุม 90-180°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา	$\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(X-1.22)]$
หลุมจุลภาคมุม 90 องศา	$\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(X-1.46)]$
หลุมจุลภาคมุม 106 องศา	$\theta = 180 - \arctan[(Z-0.11)/(X-1.62)]$

มุม 180-270°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา $\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(1.22-X)]$

หลุมจุลภาคมุม 90 องศา $\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(1.46-X)]$

หลุมจุลภาคมุม 106 องศา $\theta = 180 + \arctan[(Z-0.11)/(1.62-X)]$

มุม 270-360°

หลุมจุลภาคมุม 66 องศา $\theta = 360 - \arctan[(0.11-Z)/(X-1.22)]$

หลุมจุลภาคมุม 90 องศา $\theta = 360 - \arctan[(0.11-Z)/(X-1.46)]$

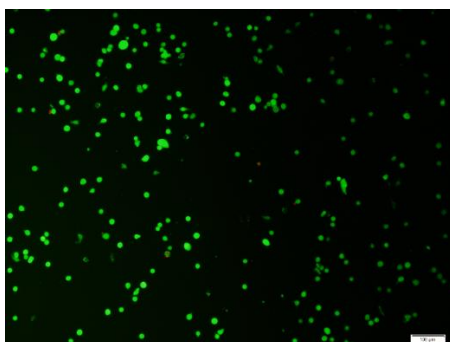
หลุมจุลภาคมุม 106 องศา $\theta = 360 - \arctan[(0.11-Z)/(X-1.62)]$



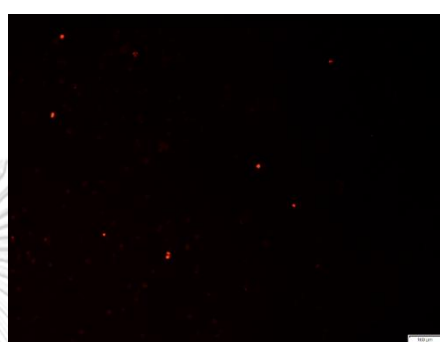
ภาคผนวก ณ
การตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์

สำหรับภาพตัวอย่างการรอดชีวิตของเซลล์ที่จะนำมาแสดงจะแบ่งเป็น 2 ภาพคือ ภาพเซลล์รอดชีวิต (สีเขียว) และภาพเซลล์ตาย (สีแดง) แสดงดังรูปด้านล่าง

ก)



ข)



ตารางที่ 11 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 1

รูปร่างหลุม จุดภาค (องศา)	เซลล์รอดชีวิต (เซลล์)	เซลล์ตาย (เซลล์)	เซลล์ทั้งหมด (เซลล์)	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	27071	6186	33257	81.4
90	65112	8147	73259	88.88
106	68644	11212	79856	85.96

ตารางที่ 12 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 2

รูปร่างหลุม จุดภาค (องศา)	เซลล์รอดชีวิต (เซลล์)	เซลล์ตาย (เซลล์)	เซลล์ทั้งหมด (เซลล์)	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	37448	7530	44978	83.26
90	62070	6729	68799	90.22
106	64401	13014	77415	83.19

ตารางที่ 13 การตรวจสอบการมีชีวิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 3

รูปร่างหลุม จุดภาค (องศา)	เซลล์รอดชีวิต (เซลล์)	เซลล์ตาย (เซลล์)	เซลล์ทั้งหมด (เซลล์)	อัตราการรอดชีวิต (%)
66	43087	7898	50958	84.51
90	66938	10519	77457	86.42
106	62553	14162	76715	81.54



ภาคผนวก ญ
จำนวนหลุมจุลภาคที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

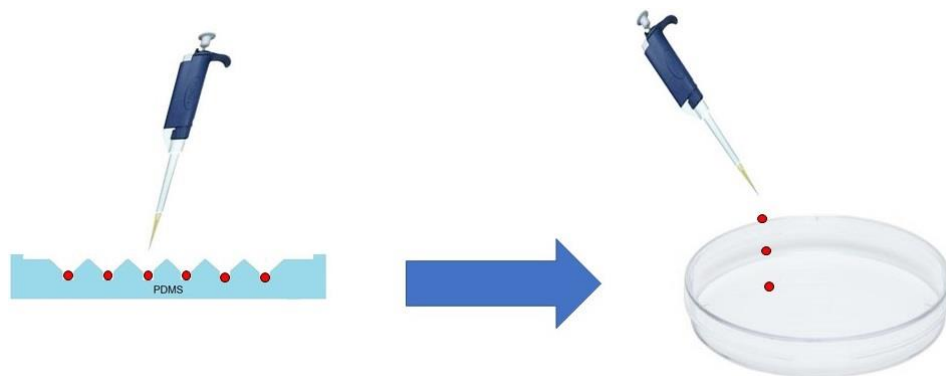
สำหรับจำนวนหลุมจุลภาคที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อถูกบันทึกผ่านกล้องจุลทรรศน์ และแสดงข้อมูลดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 14 จำนวนหลุมที่มีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อ

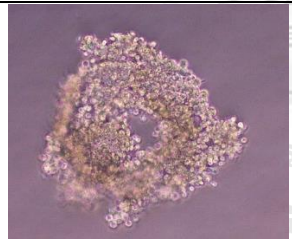
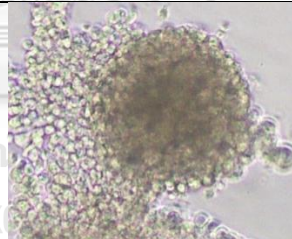
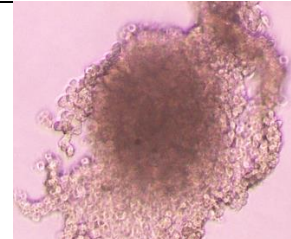
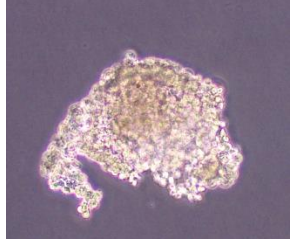
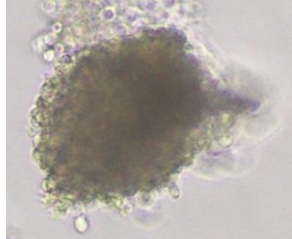
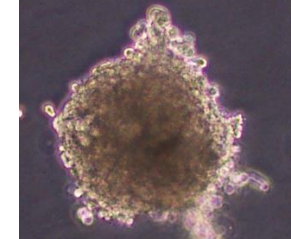
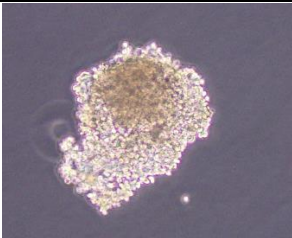
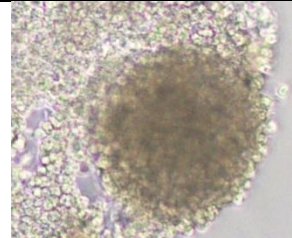
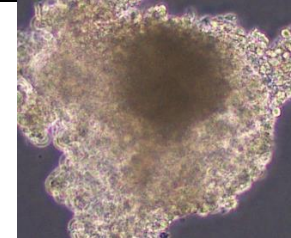
รูปร่าง หลุม จุลภาค (องศา)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3		
	จำนวน หลุมที่ สร้าง เป็น กลุ่ม เซลล์	จำนวน หลุม ทั้งหมด	อัตราส่วน การสร้าง กลุ่มเซลล์ (%)	จำนวน หลุมที่ สร้างเป็น กลุ่ม เซลล์	จำนวน หลุม ทั้งหมด	อัตราส่วน การสร้าง กลุ่มเซลล์ (%)	จำนวน หลุมที่ สร้างเป็น กลุ่ม เซลล์	จำนวน หลุม ทั้งหมด	อัตราส่วน การสร้าง กลุ่มเซลล์ (%)
66	19	45	42.22	24	45	53.33	25	45	55.56
90	38	42	90.48	35	42	83.33	40	42	95.24
106	41	52	78.85	39	52	75	40	52	76.92

ภาคผนวก ก
การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยค่าดูดกลืนแสง

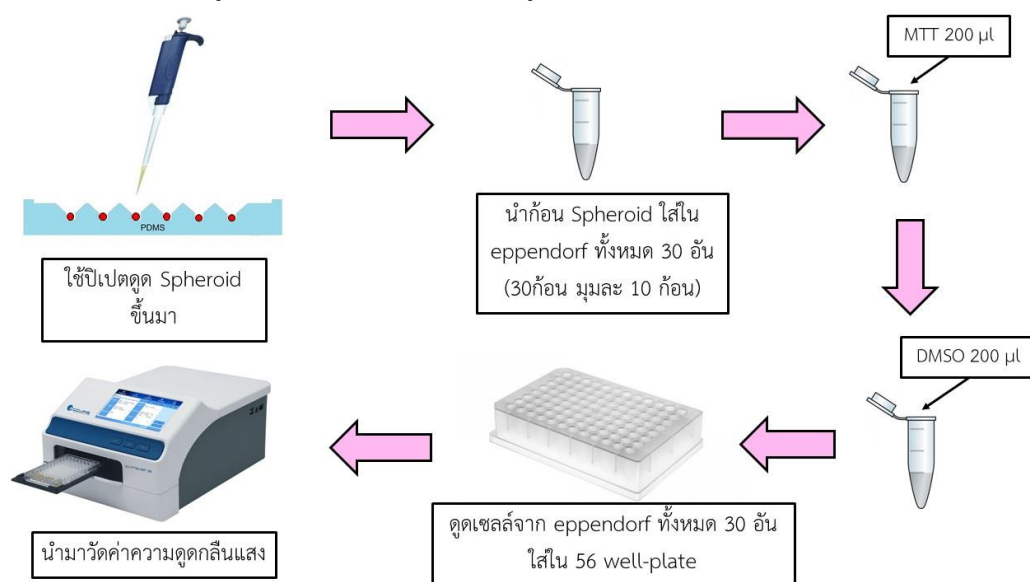
หลังจากเลี้ยงเซลล์ในหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่างเป็นเวลา 3 วันแล้ว หลังจากนั้นดูดก้อนกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อจำนวน 10 ก้อน ที่ถูกเลี้ยงในหลุมจุลภาคแต่ละรูปร่างมาใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ (Petri dish) ดังรูปข้างล่าง



เมื่อนำกลุ่มเซลล์ที่ถูกดูดจากหลุมจุลภาคมาใส่ในจานเพาะเลี้ยงแล้วส่องกล้องจุลทรรศน์จะได้ภาพดังตารางด้านล่าง

Number of day	66 Degree	90 Degree	106 Degree
First Day			
Second Day			
Third Day			

จากภาพที่ถ่ายกลุ่มเซลล์ในงานเพาะเลี้ยง กลุ่มเซลล์จะมีลักษณะแผ่ออกด้านข้างเป็นวงกว้าง ด้วยสาเหตุนี้จึงไม่สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อเพื่อเปรียบเทียบขนาดของกลุ่มเซลล์ได้ ผู้วิจัยจึงใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์เดี่ยวที่รวมตัวกันเป็นกลุ่มเซลล์ ถ้าจำนวนเซลล์มากขึ้นจะแสดงถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์ในขั้นแรกผู้วิจัยต้องวัดค่าดูดกลืนแสง (Optical density) ของกลุ่มเซลล์ที่ถูกเลี้ยงมาเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ชนิดเดียวกันเพื่อหาจำนวนเซลล์ วิธีวัดค่าดูดกลืนแสงจะแสดงดังนี้ (ดังรูปด้านล่าง)



1. นำกลุ่มเซลล์ที่ดูดมาจากหลุมจุลภาคทั้ง 3 รูปร่าง อย่างละ 10 ก้อน มาใส่ใน Micro Centrifuge 0.5 ml (กลุ่มเซลล์ + อาหารเลี้ยงเซลล์) จะได้ทั้งหมด 30 อัน และนำสาร Trypsin มาผสมใน Micro Centrifuge 0.5 ml ทั้ง 30 อัน แล้ว vortex หลังจากนั้นนำไปเข้าตู้เพาะเชื้อ (Inclubator) ที่อุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่จับตัวกันเป็นก้อนกลายเป็นเซลล์เดี่ยว

2. นำ Micro Centrifuge ที่เข้าตู้เพาะเชื้อแล้วนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3. หลังจาก Centrifuge แล้ว เซลล์จะมารวมตัวกันที่ก้น Micro Centrifuge จากนั้นดูดส่วนที่เป็นของเหลวออกจาก Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน

4. นำสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน แล้วนำไป Vortex หลังจากนั้นนำ Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน เข้าตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 30 นาที

5. เมื่อครบ 30 นาที แล้วย่นำ Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน ไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดสาร MTT ออกจาก Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน จากนั้นนำสาร DMSO (Dimethyl sulfoxide) 200 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง มาใส่ใน Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน นำไป Vortex

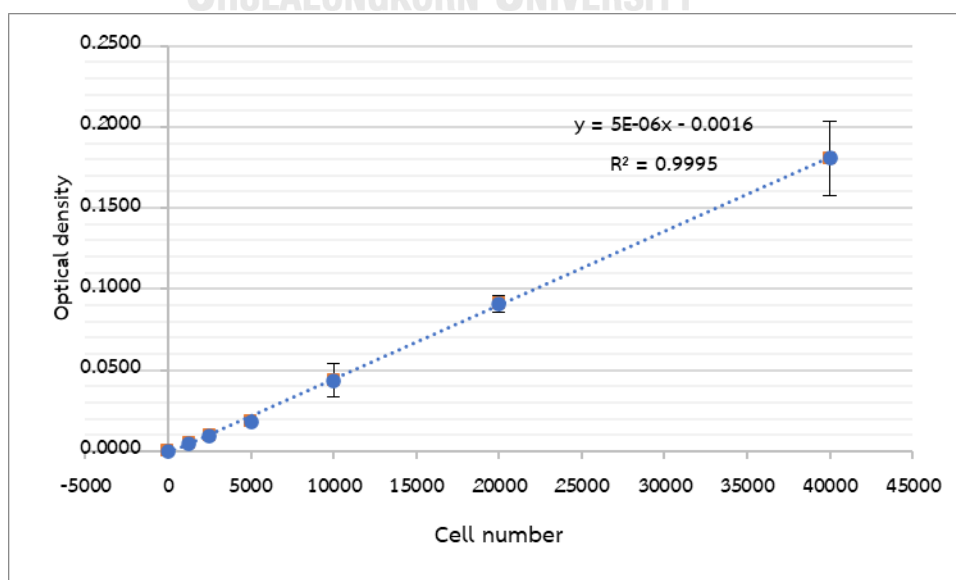
7. ดูดของเหลวทั้งหมดจาก Micro Centrifuge ทั้ง 30 อัน ไปใส่ใน 56 Well-plate หลังจากนั้น นำ 56 Well-plate เข้าเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อวัดค่า

8. สำหรับวิธีเทียบจำนวนเซลล์จะมีขั้นตอนดังนี้

8.1 สร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับ จำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรลาสน์โดยหาค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรลาสน์จำนวน 0, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 และ 40000 เซลล์ ด้วยวิธี 1-7 ดังกล่าว

Number of cell	Optical density of Absorbance								Mean	S.D.
	First well	second well	third well	Fourth well	Fifth well	Sixth well	Seventh well	Eighth well		
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.0000
1250	0.002	0.003	0.002	0.004	0.007	0.008	0.006	0.006	0.0048	0.0023
2500	0.011	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009	0.008	0.0096	0.0009
5000	0.018	0.019	0.018	0.018	0.018	0.019	0.018	0.020	0.0185	0.0008
10000	0.044	0.043	0.051	0.052	0.029	0.028	0.050	0.053	0.0438	0.0101
20000	0.084	0.091	0.100	0.093	0.085	0.092	0.091	0.092	0.0910	0.0050
40000	0.158	0.172	0.208	0.180	0.150	0.168	0.202	0.208	0.1808	0.0228

จากข้อมูลตารางสามารถนำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับ จำนวนเซลล์ดังรูปด้านล่าง



ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับ จำนวนเซลล์จะเป็นไปตามสมการ

$$Y = 5 \times 10^{-6} X - 0.0016$$

8.2 เมื่อได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับ จำนวนเซลล์แล้ว หาค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์คล้ายเนื้อเยื่อตั้งวิธี 1-7 ดังกล่าว แล้วนำมาแทนในสมการก่อนหน้านี จะได้

First day						
	Optical density			Number of cell		
	66	90	106	66	90	106
	0.0110	0.0110	0.0090	2520	2520	2120
	0.0090	0.0100	0.0080	2120	2320	1920
	0.0080	0.0090	0.0080	1920	2120	1920
	0.0070	0.0100	0.0090	1720	2320	2120
	0.0080	0.0090	0.0090	1920	2120	2120
	0.0080	0.0090	0.0080	1920	2120	1920
	0.0090	0.0090	0.0080	2120	2120	1920
	0.0080	0.0100	0.0080	1920	2320	1920
	0.0080	0.0070	0.0090	1920	1720	2120
	0.0098	0.0070	0.0090	2280	1720	2120
Mean	0.009	0.009	0.009	2036.000	2140.000	2020.000
S.D	0.00115	0.00129	0.00053	230	257	105

Second day						
	Optical density			Number of cell		
	66	90	106	66	90	106
	0.0130	0.0130	0.0110	2920	2920	2520
	0.0110	0.0140	0.0140	2520	3120	3120
	0.0140	0.0140	0.0130	3120	3120	2920
	0.0110	0.0140	0.0120	2520	3120	2720
	0.0130	0.0130	0.0120	2920	2920	2720
	0.0110	0.0130	0.0120	2520	2920	2720
	0.0130	0.0120	0.0120	2920	2720	2720
	0.0140	0.0130	0.0130	3120	2920	2920
	0.0120	0.0120	0.0130	2720	2720	2920
	0.0120	0.0130	0.0140	2720	2920	3120
Mean	0.012	0.013	0.013	2800.000	2940.000	2840.000
S.D	0.00117	0.00074	0.00097	235	148	193

Third day						
Optical density			Number of cell			
66	90	106	66	90	106	
0.0250	0.0290	0.0230	5320	6120	4920	
0.0250	0.0280	0.0220	5320	5920	4720	
0.0230	0.0200	0.0250	4920	4320	5320	
0.0210	0.0290	0.0240	4520	6120	5120	
0.0240	0.0290	0.0230	5120	6120	4920	
0.0310	0.0280	0.0220	6520	5920	4720	
0.0210	0.0250	0.0200	4520	5320	4320	
0.0290	0.0280	0.0230	6120	5920	4920	
0.0220	0.0290	0.0250	4720	6120	5320	
0.0240	0.0300	0.0270	5120	6320	5720	
Mean	0.025	0.028	0.023	5220.000	5820.000	5000.000
S.D	0.00327	0.00295	0.00196	655	591	391

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายธนภัทร ชุนฟัง
วัน เดือน ปี เกิด	27 เมษายน 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดกำแพงเพชร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปลายจากโรงเรียนเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ กำแพงเพชร ปีการศึกษา 2557 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2561 ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2561
ที่อยู่ปัจจุบัน	168/29 หมู่ 6 ต.สระแก้ว อ.เมือง จ.กำแพงเพชร 62000