



การพัฒนาชิปที่สร้างอย่างรวดเร็วและต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

The development of rapid and low-cost microfluidic chip for Cell Culture

ธีรภัทร รัตนจุล

Teerapat Rattanajul

ปริญญาานิพนธ์ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Senior Project of Electrical Engineering

Faculty of Engineering Prince of Songkla University

2564

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) เป็นการนำเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปรับให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ เกิดขึ้นมาจากความต้องการที่จะศึกษาเรียนรู้เกี่ยวกับเซลล์ ทั้งในเรื่องของพฤติกรรม และการทำงานต่างๆของเซลล์โดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเซลล์ จะเพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลอง ซึ่งจะไม่มีการจ่ายต่างๆเมื่อเซลล์อยู่ภายในสิ่งมีชีวิตมารบกวน การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองมีข้อดี คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการทดลองได้ ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ให้ผลการทดลองที่สม่ำเสมอ และช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองจะมีข้อดีมากมาย แต่ก็มีข้อจำกัดบางประการ คือ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญและประสบการณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติได้ ในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง และเซลล์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงได้ [1]

ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดที่จะเลี้ยงเซลล์บนชิป หรือเรียกว่า Cell-on-chip ใช้เทคโนโลยีห้องปฏิบัติการบนชิป หรือ Lab on a Chip ซึ่งเป็นการย่อส่วนห้องปฏิบัติการ ให้มาอยู่บนแผ่นชิป ในการสร้างห้องเลี้ยงเซลล์แบบย่อส่วน โดยการสร้างระบบขนส่งสารเคมีระดับไมโครลิตร และจำลองให้มีขั้นตอน กระบวนการเลี้ยงเซลล์ให้เหมือนกับการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงด้วยสารอาหารที่เหมือนสารอาหารในเลือด มีการควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิร่างกายปกติของมนุษย์ ควบคุมระดับออกซิเจน ระดับความเป็นกรด-ด่าง และปัจจัยอื่นๆ ให้เหมือนในเลือดมนุษย์ทุกประการ และการเลี้ยงเซลล์บนชิปก็มีข้อดีที่เห็นได้ชัด คือ สามารถควบคุมความสะอาดได้ง่ายกว่า ใช้ปริมาณสารอาหารน้อยกว่า และยังสามารถเลี้ยงเซลล์ให้เหมาะสมกับการทดลองได้อีกด้วย [2] โดยเทคโนโลยีห้องปฏิบัติการบนชิป หรือ Lab on a chip ส่วนมากจะประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) ซึ่งจะใช้ช่องทางไหลจุลภาค (microchannel) เป็นช่องทางไหลขนาดเล็กสำหรับของเหลวหรือสารละลายประเภทต่างๆ ในระดับไมโครลิตร โดยปกติแล้วการสร้างช่องทางไหลจุลภาคจะนิยมใช้วัสดุพอลิเมอร์ที่เรียกว่า PDMS (Polydimethylsiloxane) และการสร้างแม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปโครงสร้างช่องทางไหลจุลภาคด้วย PDMS นิยมทำอยู่ 2 วิธี ได้แก่ การสร้างแม่พิมพ์พอลิเมอร์สารไวแสง ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV lithography) และการสร้างแม่พิมพ์พอลิเมอร์สารไวแสง ด้วยรังสีเอกซ์จากเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอน (X-ray lithography) แต่แม่พิมพ์ที่ได้จากกระบวนการลิโธกราฟีนั้น จะมีความเปราะบางมาก และหากแม่พิมพ์เสียหาย จะต้องทำกระบวนการลิโธกราฟีอีกครั้ง ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากรและเวลาในการเตรียมชิ้นงานมาก [3]

คณะผู้จัดทำจึงมีความประสงค์ที่จะทำโครงการ การพัฒนาชิปที่สร้างอย่างรวดเร็วและต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยสร้างชิปด้วยวิธี xurography ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งในการสร้างสร้างชิปของไหลจุลภาค โดยจะใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ ที่มีความละเอียดสูง ตัดโครงสร้างจุลภาคโดยตรงบนแผ่นพอลิเมอร์บาง และนำโครงสร้างจุลภาคจำนวนหลายชิ้นมาประกบและเชื่อมกันด้วยความร้อน จนได้เป็นชิปของไหลจุลภาคที่สมบูรณ์ [4] เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว มีความยืดหยุ่นในการออกแบบ และใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ ดังนั้น วิธีการนี้จึงสามารถสร้างชิปของไหลจุลภาค เพื่อศึกษารูปแบบของช่องเลี้ยงเซลล์ได้เป็นอย่างดี โดยจะเริ่มจากการออกแบบช่องเลี้ยงเซลล์บนชิปของไหลจุลภาค และสร้างชิปด้วยวิธี xurography จากนั้นนำเซลล์ fibroblast มาเพาะเลี้ยงบนชิปที่สร้างขึ้น และตรวจวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบ เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของช่องเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์

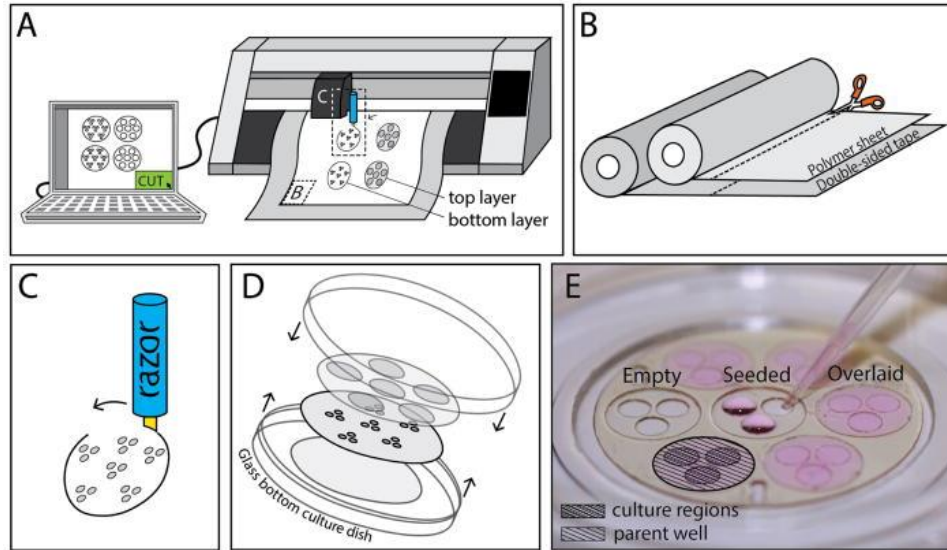
1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนา cell-on-chip โดยใช้วิธี Xurography สำหรับเลี้ยงเซลล์ fibroblast เป็นเซลล์ต้นแบบ
2. เพื่อศึกษาลักษณะช่องเลี้ยงเซลล์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast

1.3 ทบทวนวรรณกรรม

1. Razor-printed sticker microdevices for cell-based applications [5]

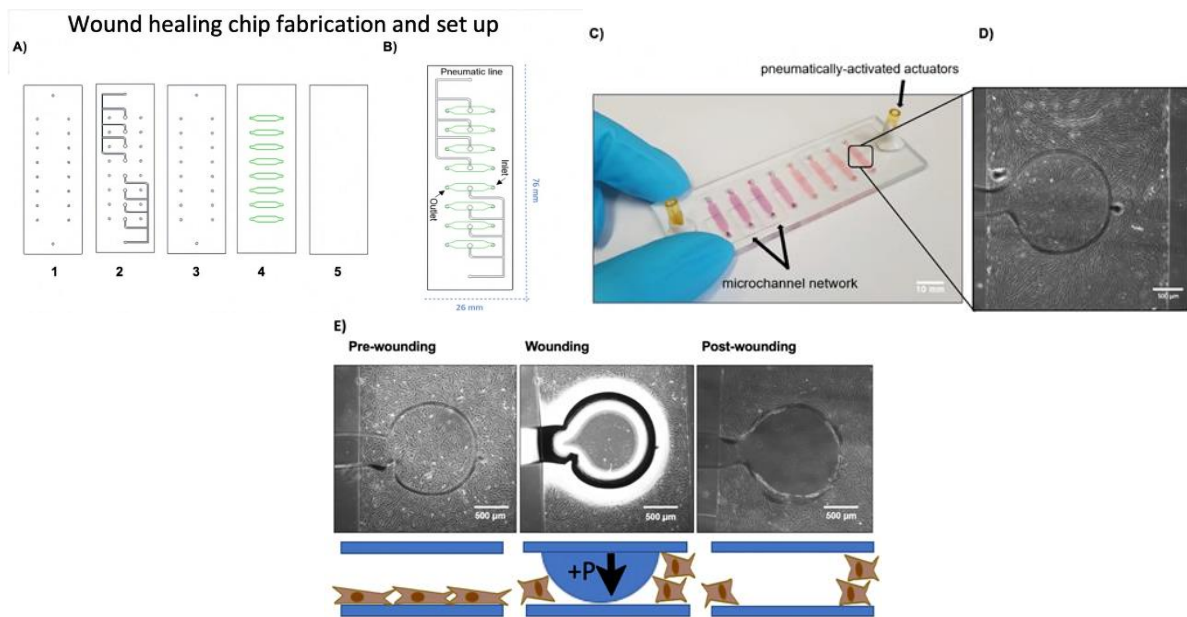
งานวิจัยนี้กล่าวถึงการศึกษาวัสดุในสร้างชิปสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจะใช้การตัดสติ๊กเกอร์เป็นวิธีในการสร้างชิป เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความยืดหยุ่น และราคาไม่แพงสำหรับการสร้างโครงสร้างจุลภาค แต่การใช้วิธีดังกล่าวในการสร้างต้นแบบเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากขาดวัสดุที่เป็นที่ยอมรับ หรือมีคุณสมบัติครบถ้วนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ หากไม่มีวัสดุดังกล่าวแล้ว การสร้างต้นแบบด้วยวิธีการตัดสติ๊กเกอร์เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาจจะยังไม่ถูกพิจารณา ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงได้ ตรวจสอบประสิทธิภาพของวัสดุที่ใช้ในการสร้างต้นแบบเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในด้านต่างๆ เช่น การอยู่รอดของเซลล์ การกักเก็บโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ ความสามารถในการชะล้างสารประกอบ การใช้ในกล้องจุลทรรศน์ และการซึมผ่านของก๊าซ ผลลัพธ์ที่ได้รับคือ วัสดุที่ได้ทำการศึกษา มีแนวโน้มที่จะสามารถใช้สำหรับการพัฒนาในการสร้างต้นแบบเพื่อเลี้ยงเซลล์ในอนาคตได้ ซึ่งข้อดีที่เห็นได้ชัดในวิธีการนี้ คือ สามารถสร้างต้นแบบได้อย่างรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ และยังสามารถให้ผู้ที่ยังไม่มีประสบการณ์นำไปใช้งานได้อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 1.1 การสร้างต้นแบบชิปเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการตัดสติ๊กเกอร์ [5]

2. An on-chip wound healing assay fabricated by xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure [6]

งานวิจัยนี้กล่าวถึง การใช้เทคโนโลยี lap-on-chip และการสร้างชิปของไหลจุลภาคด้วยวิธี xurography เพื่อเลี้ยงเซลล์ fibroblast และจำลองบาดแผล สำหรับศึกษาการรักษาบาดแผล โดยการเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast ถือเป็นกระบวนการสำคัญทางสรีรวิทยาในการรักษาบาดแผล ดังนั้นการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast จึงมีความสำคัญต่อการวิจัยการรักษาบาดแผล ในการศึกษาครั้งนี้ จะใช้เทคโนโลยี lap-on-chip เพื่อตรวจสอบผลกระทบของ สารเคมี ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast บนผิวหนังมนุษย์ ภายในในชิปของไหลจุลภาคจะประกอบไปด้วย ช่องทางไหลจุลภาค ช่องลม และ ตัวกระตุ้นช่องลม โดยใช้การสร้างชิปต้นแบบด้วยวิธี xurography ซึ่งจะแตกต่างกับการวิจัยการรักษาแบบทั่วไป ที่มีความแปรปรวนสูง และสามารถทำซ้ำได้ยาก จึงใช้เทคโนโลยี lap-on-chip เข้ามาช่วยในการจำลองบาดแผลให้มีความแม่นยำสูง และสามารถทำซ้ำได้ ซึ่งการจำลองบาดแผลบนชิปของเซลล์ fibroblast ทำได้โดยใช้แรงดันอากาศกระตุ้นเมมเบรนวงกลมที่ยึดหยุ่นได้ การปิดบาดแผลจะตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และใช้ image analysis ประเมินการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งเทคโนโลยี lap-on-chip และระบบควบคุมด้วยลมนี้จะสร้างบาดแผลที่ทำซ้ำได้สูง เมื่อเทียบกับการทดสอบการหายของบาดแผลแบบเดิม

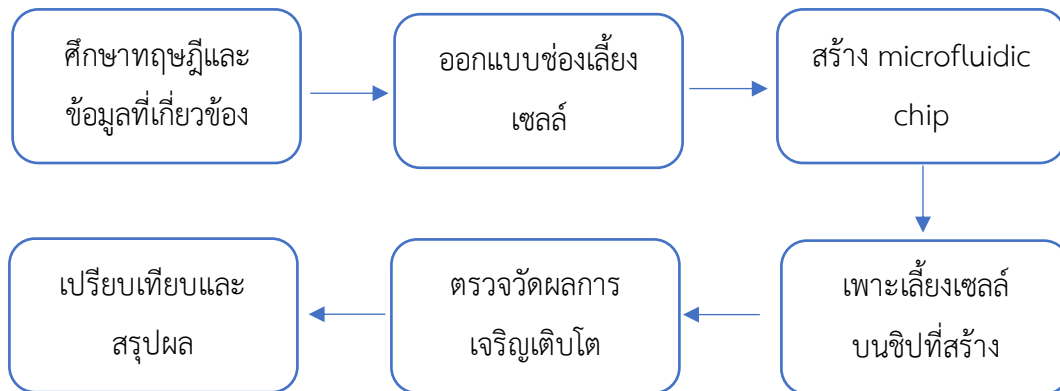


รูปที่ 1.2 แผนภาพของชิปเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการรักษาบาดแผล [6]

1.4 ขอบเขตของโครงการ

1. ใช้ Xurographic technique เป็นวิธีในการสร้าง cell-on-chip
2. เลี้ยงเซลล์ fibroblast เป็นเซลล์ต้นแบบใน cell-on-chip
3. เลี้ยงเซลล์แบบสถิตย์ (static system)
4. เลี้ยงเซลล์ในระนาบ แบบ 2D

1.5 แนวทางการดำเนินโครงการ



เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองมีข้อจำกัดมากมาย เช่น มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องอาศัยความชำนาญในการเพาะเลี้ยง จึงเกิดการเลี้ยงเซลล์บนชิปขึ้น ซึ่งมีกระบวนการในการสร้างชิปที่หลากหลาย ผู้จัดทำจึงได้เลือกใช้วิธี Xurography เป็นวิธีในการสร้างชิปเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว และต้นทุนต่ำ ซึ่งจะเริ่มดำเนินการจากการหาข้อมูลที่เกี่ยวข้อง กับ cell-on-chip และ ระบบ microfluidic ได้แก่ การสร้างชิปด้วยวิธี Xurography การทำ cell-on-chip ในระบบ microfluidic การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ รูปแบบของช่องเลี้ยงเซลล์ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์บนชิปที่สร้างด้วยวิธี Xurography จากนั้น นำข้อมูลที่ได้ศึกษามาใช้ในการออกแบบช่องเลี้ยงเซลล์ว่าจะเป็นไปในลักษณะใด รูปแบบไหน มีความหนาความลึกเท่าไร โดยจะเริ่มจากรูปแบบของช่องเลี้ยงเซลล์จากงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อน จากนั้นจะทำการผลิตชิปด้วยวิธี Xurography ซึ่งจะใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ ตัดโครงสร้างจุลภาคโดยตรงบนแผ่นพอลิเมอร์บาง จากนั้นนำมาประกบและเชื่อมกันด้วยความร้อน จนได้ชิปของไหลจุลภาค จากนั้นนำชิปที่สร้างมาเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast เนื่องจากเซลล์ fibroblast เป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่ายที่สุด เพื่อตัดปัจจัยที่ซับซ้อนออกไปในระหว่างการพัฒนาช่องเลี้ยงเซลล์ เพราะชนิดของเซลล์มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยเช่นกัน จากนั้นจะใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจะพิจารณาจาก ขนาดของเซลล์ จำนวนของเซลล์ พื้นที่ว่างของช่องเลี้ยงที่น้อยลง และรูปร่างของเซลล์ โดยจะใช้โปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นกระบวนการ Image processing มาช่วยวิเคราะห์รูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ ซึ่งอาจปรับปรุงพัฒนาช่องการเลี้ยงเพิ่มเติม เพื่อให้เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์มากที่สุด และสุดท้ายนำข้อมูลที่ได้ มาสรุปว่าช่องเลี้ยงเซลล์แบบไหนเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์มากที่สุด

1.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน

[illegible]

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและผู้ใช้ประโยชน์จากโครงการ

1. สามารถสร้างชิปต้นแบบด้วยวิธี xurography เพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้
2. สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast บนชิปเพื่อศึกษาลักษณะช่องเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้
3. สามารถเป็นต้นแบบชิปเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ผู้ที่ต้องการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น นักวิจัย เกษษกร หรือนักเทคนิคการแพทย์ นำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาหรือทดลองในด้านต่างๆได้
4. สามารถลดต้นทุนและระยะเวลาในการสร้างชิปสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้

บทที่ 2

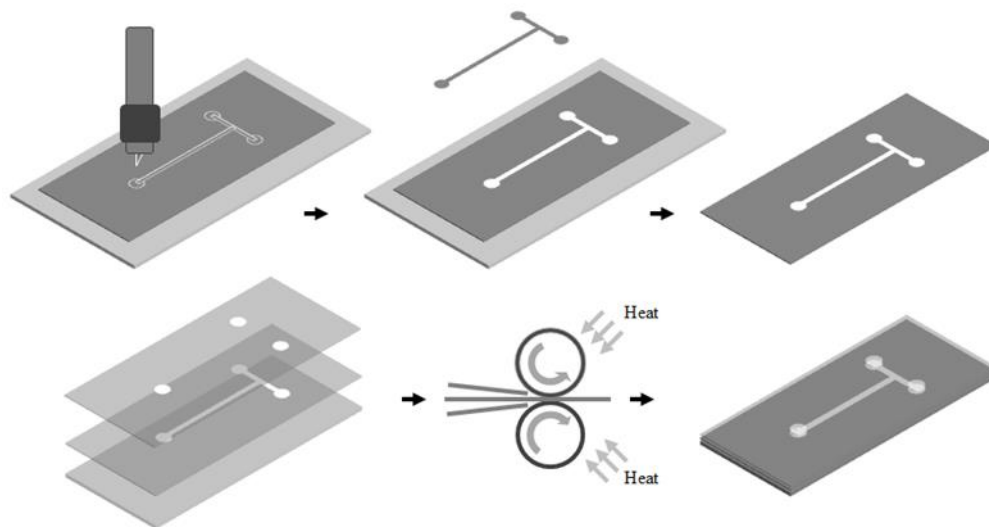
ทฤษฎีและหลักการ

ในเนื้อหาในบทนี้กล่าวถึงทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยเพื่อพัฒนา cell-on-chip โดยใช้วิธี Xurography สำหรับศึกษาลักษณะช่องเลี้ยงเซลล์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งในส่วนเนื้อหาจะกล่าวถึง การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ cell-on-chip ในระบบของไหลจุลภาค การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ [4]

วิธีการสร้างระบบจุลภาคในเบื้องต้นจะใช้การบูรณาการเทคโนโลยีผลิตวงจรร (IC) ในวัสดุเซมิคอนดักเตอร์ แต่เนื่องจากการผลิตที่ซับซ้อน ปัญหาการยึดเกาะ และความเปราะบาง ของวัสดุเซมิคอนดักเตอร์ ทำให้เกิดเทคนิคทางเลือกต่างๆในการสร้าง เช่น micromolding in polydimethylsiloxane (PDMS), laser ablation, stereo lithography, micropowder blasting, hot embossing และ micromilling และเนื่องจาก PDMS มีคุณสมบัติในการนำมาขึ้นรูปเป็นโครงสร้างจุลภาคได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ให้ความละเอียดสูง ยอมให้ก๊าซซึมผ่าน และมีความโปร่งแสง จึงเป็นวัสดุในการสร้างช่องทางไหลจุลภาคที่นิยม วิธีการสร้างช่องทางไหลจุลภาคที่นิยมคือ photolithography ซึ่งต้องใช้ photolithographic masks, สารเคมี และขั้นตอนการอบที่ยาวนาน แต่สามารถใช้ต้นแบบเพื่อขึ้นรูปซ้ำได้ และถ้าจะเปลี่ยนรูปแบบก็ต้องทำกระบวนการ photolithography อีกครั้ง มีวิธีการอื่น เช่น micropowder blasting และ laser ablation จะสร้างโครงสร้างจุลภาคโดยตรงโดยไม่ต้องใช้วิธี photolithography ช่องที่ทำโดยวิธีการเหล่านี้จะถูกปิดด้วยฟิล์มกาว, ขึ้น PDMS, หรือ anodic bonding ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ ต้องใช้อุปกรณ์การผลิตที่มีราคาแพง ทำให้ยากต่อการสร้างต้นแบบ และคุณสมบัติหลายอย่าง จึงมีเทคนิคการสร้างชิปของไหลจุลภาคที่รวดเร็ว และราคาไม่แพง โดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ สร้างโครงสร้างจุลภาคโดยตรงบนฟิล์มพอลิเมอร์ต่างๆ โดยไม่ต้องใช้กระบวนการลิโธกราฟี หรือสารเคมี เราเรียกวิธีนี้ว่า Xurography

การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ หรือวิธีซูโรกราฟ (Xurography) เป็นเทคนิคในการสร้างต้นแบบของโครงสร้างจุลภาคอย่างรวดเร็ว เทคนิคนี้จะใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ที่มีความละเอียดประมาณ 10 ไมโครเมตร ตัดโครงสร้างจุลภาคบนแผ่นพอลิเมอร์ที่มีความหนาตั้งแต่ 25-1000 ไมโครเมตร และนำโครงสร้างจุลภาคจำนวนหลายชิ้น มาเคลือบด้วยความร้อน จะใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาที โดยไม่ต้องใช้กระบวนการลิโธกราฟี หรือสารเคมี



รูปที่ 2.1 การสร้างชิปของไหลจุลภาคด้วยเครื่องตัดฟลोटเตอร์

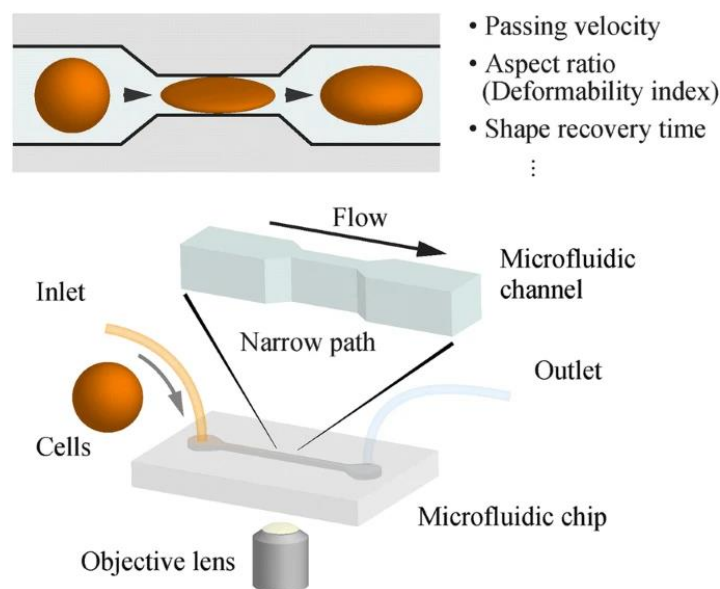
2.2 cell on chip ในระบบของไหลจุลภาค [7]

องค์ประกอบที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต คือเซลล์ และเซลล์สามารถแสดงหน้าที่ทั่วไป เช่น ถ่ายเทพลังงาน เคลื่อนที่ ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม และการจำลองตัวเอง เป็นต้น ซึ่งฟังก์ชันต่างๆของเซลล์ เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงหากเกิดการผิดรูปของเซลล์ ในทางกลเซลล์จะแสดงคุณสมบัติทั้งความยืดหยุ่นและความหนืด จึงจำแนกเป็น วัสดุที่อ่อนนุ่ม ได้ เนื่องจากลักษณะการเสียรูป และเมื่อเร็วๆนี้ได้มีการใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกเป็นเครื่องมือทดลองในการศึกษาเซลล์ ซึ่งการวัดคุณสมบัติทางกลของเซลล์สำหรับ microfluidic จะแบ่งเป็น Passive flow และ Active control

2.2.1 Passive flow in microfluidics

เทคนิคทางไมโครฟลูอิดิกถูกนำมาใช้เพื่อวัดคุณสมบัติทางกลของเซลล์มากขึ้น ในการการประเมินการเสียรูปร่าง ภายใต้แรงเฉือนของการไหลในไมโครแชนแนล เทคนิคนี้มีประโยชน์มาก เนื่องจาก ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย และกระบวนการอื่น เช่น การจัดเรียงของตัวของ RBCs เนื่องจากทางสรีรวิทยาของ RBC จะไหลในเส้นเลือดขนาดเล็ก ซึ่งไมโครฟลูอิดิกสามารถจำลองได้และสามารถใช้กับเซลล์อื่นที่ไม่เกาะติดกันได้ด้วย สำหรับการวัดคุณสมบัติทางกลศาสตร์จะวัดโดยใช้ RBC ที่ผิดรูปเมื่อผ่านช่องขนาดเล็ก และวัดความเร็วการเคลื่อนที่แต่ละความกว้าง แต่เนื่องจาก RBC แต่ละตัวก็แตกต่างกันออกไป จึงหาจำนวนเซลล์ที่เดินผ่านช่องภายใต้แรงดันคงที่ระหว่างขาเข้าและขาออก โดยความกว้างของช่องนี้จะมีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับขนาดของเซลล์ เพื่อจำกัดอิสระในการเคลื่อนที่ของเซลล์ให้เป็นมิติเดียว ซึ่งจะประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพและทางกลต่างๆ เช่น การปล่อย ATP ภายใต้ความดัน

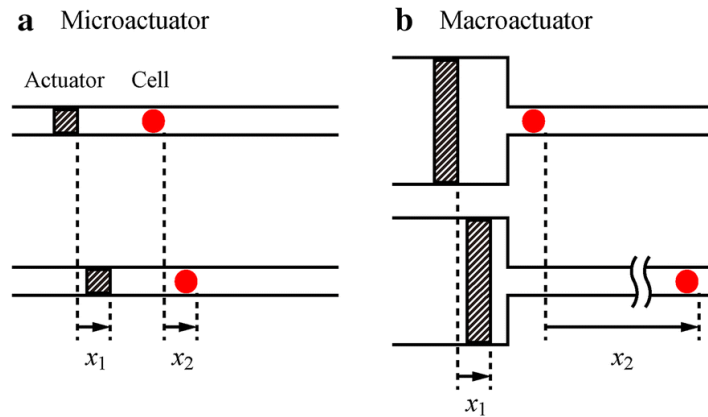
เฉือนที่ผนัง ความเร็วการผ่านช่องแคบและความกว้างของช่อง อัตราส่วน ความต่อเนื่อง ค่าคงตัวการยืดหยุ่น และเวลาคืนสภาพ ในการศึกษาดังกล่าว พบว่า RCBs แสดงความฝืด (โมดูลัสเฉือน) ที่ $10\text{--}6\text{ N/m}$ เวลาของการคืนรูปประมาณ 0.1 วินาที และการตอบสนองไม่เป็นเชิงเส้น ความฝืดจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราความเครียดที่สูงขึ้น หรือเวลาการผ่านช่องที่นานขึ้น และเวลาการคืนรูปจะลดลงภายใต้การลดลงของ ATP แม้ว่าไมโครฟลูอิดิกแบบพาสซีฟจะประสบความสำเร็จ แต่ก็มีงานวิจัยที่รองรับน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการทั่วไป และมีข้อเสียคือ ความแม่นยำในการวัดที่ต่ำ นอกจากนี้ช่องขนาดเล็กยังจำกัดวิธีประเมิน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเป็นการจับภาพด้วยกล้องความเร็วสูงเท่านั้น และสำหรับการประเมินคุณสมบัติทางกลโดยละเอียด จำเป็นต้องมีการควบคุมพารามิเตอร์อย่างแม่นยำ



รูปที่ 2.2 การทดสอบการเสียรูปของเซลล์โดยทั่วไปในช่องไมโครฟลูอิดิก

2.2.2 Active control in microfluidics

ในการทดสอบนี้เราเรียกว่า การจัดการเซลล์บนชิป ซึ่งจะติดตั้งแอกทูเอเตอร์ เพื่อขับเคลื่อนการเคลื่อนที่ของเซลล์ และเซ็นเซอร์สำหรับติดตามตำแหน่งของเซลล์ แอกทูเอเตอร์นั้นมีทั้งแบบไมโครและแมโคร ทั้งคู่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ไมโครแอกทูเอเตอร์นั้น จะมีความแม่นยำกว่า แต่มีต้นทุนการผลิตสูง และควรทิ้งหากเกิดการอุดตัน ส่วนแมโครแอกทูเอเตอร์ จะมีราคาไม่แพง แต่ความละเอียดในการเคลื่อนที่ต่ำมาก เนื่องจากอัตราส่วนหน้าตัดที่ใหญ่ของแอกทูเอเตอร์ต่อไมโครแชนเนล ส่งผลให้ควบคุมได้ไม่ดี แต่สามารถแก้ปัญหาได้โดยใช้ เกียร์ทดรอบจำลอง

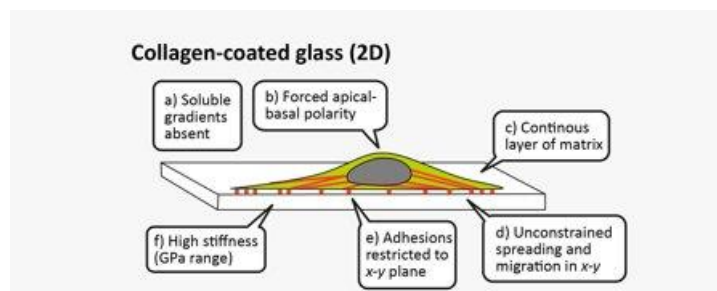


รูปที่ 2.3 แอคทูเอเตอร์สองประเภทสำหรับขับเคลื่อนการไหลของไมโครฟลูอิดิก

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ [8,9]

การเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 มิติ ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปี 1900 และเมื่อเร็ว ๆ นี้ก็มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากใช้จำลองเนื้อเยื่อได้แม่นยำยิ่งขึ้น เพราะในร่างกายของเราไม่ได้เติบโตในแบบ 2 มิติ และมีความต้องการสร้างแบบจำลองร่างกายมนุษย์ เพื่อพัฒนาวิธีบำบัด รักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น

ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 มิติ จะเติบโตบนจานแบน เซลล์จะถูกวางบนพื้นผิวเคลือบที่เหมาะสมกับการยึดติดและแพร่กระจาย แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 มิติ มีข้อบกพร่องบางประการ เช่น การเติบโตบนผิวเรียบไม่เป็นสภาพแวดล้อมที่แท้จริงของเซลล์ การเพาะเลี้ยงไม่ได้ประสบความสำเร็จเสมอ และปัญหาที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อเซลล์เติบโตในการเพาะเลี้ยง 2 มิติ ก็จะกินอาหารและขับถ่ายของเสีย ซึ่งอาจเป็นพิษ มีเซลล์ที่ตายแล้ว สารอาหารที่ไม่เพียงพอ จึงเกิดความเสียหายของสภาพแวดล้อมที่เซลล์อยู่ แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 มิติ ยังคงใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่ เนื่องจากมีข้อดีบางประการ เช่น ราคาไม่แพง เป็นที่ยอมรับ มีงานวิจัยรับรองมากมาย เป็นสิ่งที่นักวิจัยส่วนใหญ่เข้าใจ การสังเกตและการวัดผลที่ง่าย เป็นต้น [8]

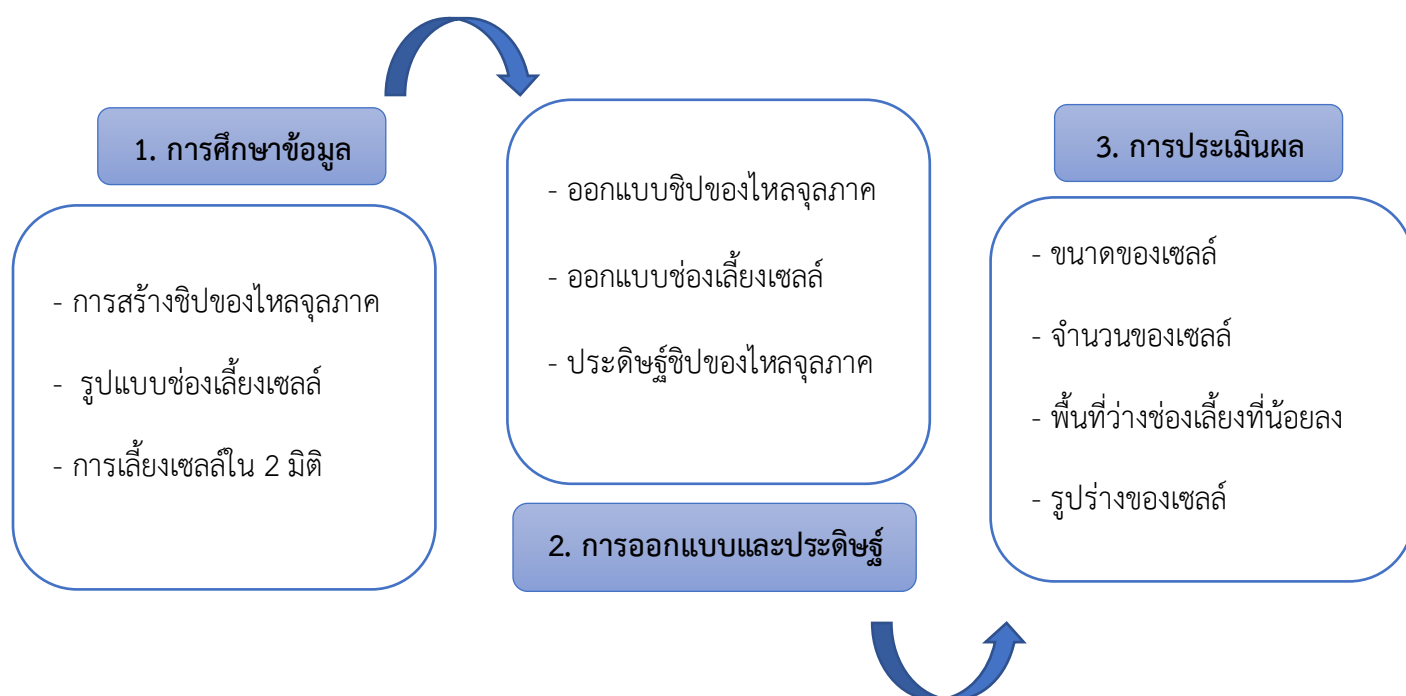


รูปที่ 2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ

บทที่ 3

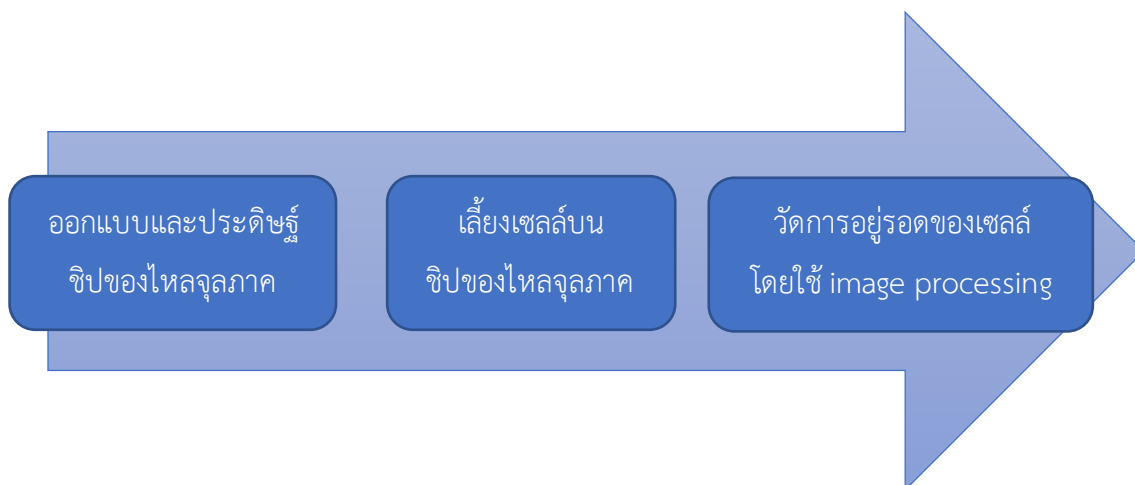
วิธีดำเนินงาน

การพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast บนชิปของไหลจุลภาค (microfluidic chip) จะออกแบบชิปด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และส่งออกไฟล์ไปยังโปรแกรมควบคุมการตัดชิปของไหลจุลภาค ซึ่งชิปของไหลจุลภาคจะถูกประดิษฐ์ด้วยวิธีซูโรกราฟี (Xurography) โดยจะเลือกใช้เครื่องพล็อตเตอร์เป็นเครื่องมือหลักในการสร้างชิ้นงาน เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีความยืดหยุ่นในการออกแบบ สามารถรองรับวัสดุได้หลากหลาย สร้างชิ้นงานได้รวดเร็ว และต้นทุนการผลิตไม่สูงเกินไป การดำเนินโครงการได้จัดแบ่งแผนงานออกเป็น 3 ส่วนดังรูปที่ 3.1 งานแรกจะเป็นการศึกษาข้อมูล โดยจะศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับการสร้างชิปของไหลจุลภาค รูปแบบช่องเลี้ยงเซลล์ การเลี้ยงเซลล์ใน 2 มิติ ส่วนที่สองจะเป็นงานออกแบบและประดิษฐ์ชิปของไหลจุลภาค และส่วนที่สามเป็นงานทดสอบ ไม่ว่าจะเป็น ขนาดของเซลล์ จำนวนของเซลล์ พื้นที่ว่างช่องเลี้ยงที่น้อยลง และรูปร่างของเซลล์



รูปที่ 3.1 แผนการดำเนินงาน

จากการวางแผนการดำเนินงานข้างต้นจึงนำมาสู่วิธีการดำเนินงานดังรูปที่ 3.2



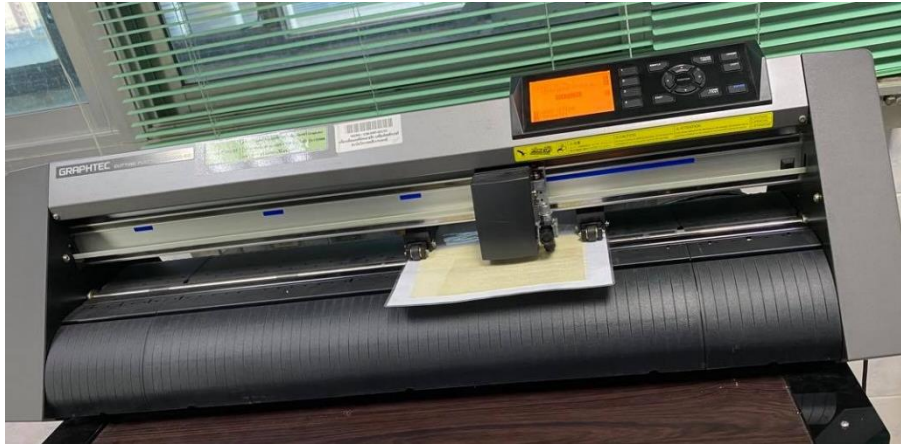
รูปที่ 3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.1 การออกแบบและประดิษฐ์ชิปของไหลจุลภาค

การสร้างชิ้นงานชิปของไหลจุลภาคนั้นมีหลากหลายวิธี การใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์สร้างชิ้นงานต้นแบบ เป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำและมีความยืดหยุ่นในการออกแบบ โดยจะเริ่มจากการออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ แล้วส่งตัดลงบนวัสดุด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ จากนั้นลอกส่วนที่ไม่ต้องการออก และนำชิ้นงานมาซ้อนเรียงให้ตรงกันตามลำดับการออกแบบ แล้วนำชิ้นงานไปประกบให้ยึดติดกันด้วยวิธีการรีดความร้อน จากกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาสามารถสร้างต้นแบบระบบไมโครฟลูอิดิกให้เสร็จสมบูรณ์ได้ภายใน 10 นาที ดังนั้นการสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์จึงสะดวกรวดเร็ว มีอิสระในการออกแบบชิ้นงาน และต้นทุนการผลิตด้านเครื่องมือและวัสดุไม่สูงเกินไป

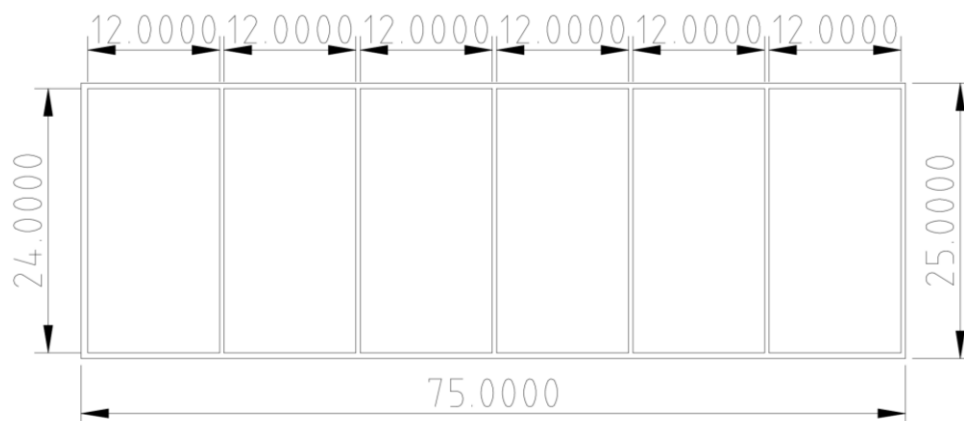
3.1.1 การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ในโครงการนี้จะใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์รุ่น Graphtec CE6000-60 ซึ่งมีซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัดโดยเฉพาะ คือ Graphtec Studio การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สามารถเลือกใช้ซอฟต์แวร์สำหรับเขียนแบบ ที่รองรับการบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .dxf เพื่อให้สามารถเปิดไฟล์ในซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัดได้ การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกในโครงการนี้เลือกใช้งานโปรแกรม LibreCAD ช่วยในการเขียนแบบ เนื่องจากผู้พัฒนาอนุญาตให้ใช้งานได้ฟรี และใช้งานง่าย

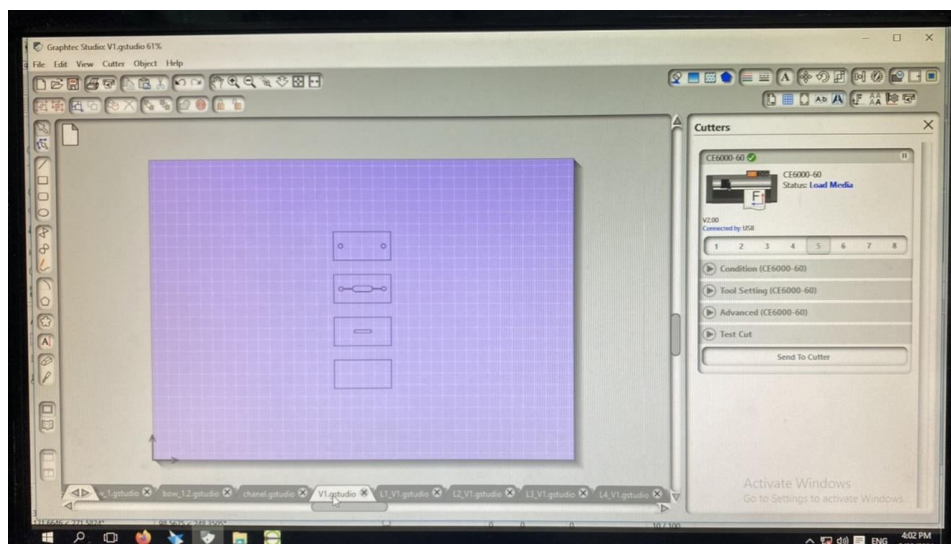


รูปที่ 3.4 เครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 สำหรับตัดชิ้นงาน

รูปแบบของช่องไมโครฟลูอิดิกจะถูกออกแบบในพื้นที่ขนาด 24×12 ตารางมิลลิเมตร เพื่อให้สามารถวางบนแผ่นสไลด์ขนาด 75×25 ตารางมิลลิเมตร ได้จำนวน 6 ชิปพอดี ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แสดงขอบเขตของไมโครฟลูอิดิกชิปและแผ่นสไลด์

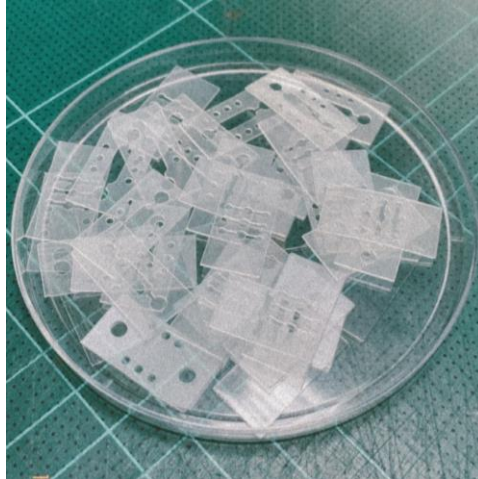


รูปที่ 3.5 การออกแบบชิป และใช้ซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัด

3.1.2 การเตรียมวัสดุในการตัดชิ้นงาน

วัสดุที่ใช้ในการสร้างชิ้นงานในโครงการครั้งนี้เลือกใช้ Laminating film หรือพลาสติกเคลือบบัตร เป็นหลัก ซึ่งจะมีโครงสร้าง 3 ชั้นติดประกบกันเป็นชั้นๆ ดังนี้ ชั้นที่ 1 อยู่ชั้นนอกสุด เป็นโพลีเอสเตอร์ฟิล์ม มีคุณสมบัติโปร่งใส มีความแข็งแรง ทนสารเคมีและความร้อนได้ดี ชั้นที่ 2 ติดกับชั้นโพลีเอสเตอร์ฟิล์ม เป็นโพลีเอทิลีน (PE) มีลักษณะขุ่น เมื่อหลอมเหลวจะเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพเป็นสีใส ชั้นที่ 3 อยู่ชั้นในสุด เป็น EVA (Ethylene Vinyl Acetate) มีคุณสมบัติป้องกันความชื้นได้ดี มีจุดหลอมเหลวที่ต่ำกว่า PE เป็นสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบเพื่อทำให้เกิดการเกาะยึดของพลาสติกเคลือบบัตร [10] โดยแผ่นล่างสุดนั้น จะเลือกใช้เป็นแผ่นพลาสติกใสที่มีความหนาประมาณ 100 ไมโครเมตร ชั้นต่อมาจะใช้ Laminating film ที่ความหนา 250 ไมโครเมตร และชั้นบนสุดจะใช้ Laminating film ที่ความหนา 125 ไมโครเมตร เนื่องจากวัสดุเหล่านี้สามารถหาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก

เมื่อต้องการตัดชิ้นงาน จำเป็นต้องใช้แผ่นรองตัดเพื่อยึดจับชิ้นงานไว้ให้อยู่ในตำแหน่งตัด และป้องกันการเสียรูปของวัสดุระหว่างตัด แผ่นรองควรเป็นวัสดุทึบแสง เนื่องจากจะช่วยให้เครื่องตัดพลิ้อเตอร์สามารถตรวจสอบพื้นที่การตัดได้ และต้องมีความแข็งแรงมากกว่าวัสดุที่ตัด เนื่องจากจะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการโค้งงอของชิ้นงาน และช่วยรองรับใบมีดไม่ให้สัมผัสกับแท่นรองของเครื่องโดยตรง ในโครงการนี้เลือกใช้เทปกาวยางสองหน้าติดกับแผ่นรอง และใช้เทปกาวยางติดทับเทปกาวยางสองหน้าอีกที เพื่อทำหน้าที่ยึดวัสดุ เนื่องจากเทปกาวยางสองหน้าไม่ยึดติดชิ้นงานแน่นเกินไป ทำให้สามารถลอกวัสดุออกได้โดยไม่ทิ้งคราบกาวยาง และสามารถกำจัดวัสดุส่วนที่ไม่ต้องการได้ง่าย



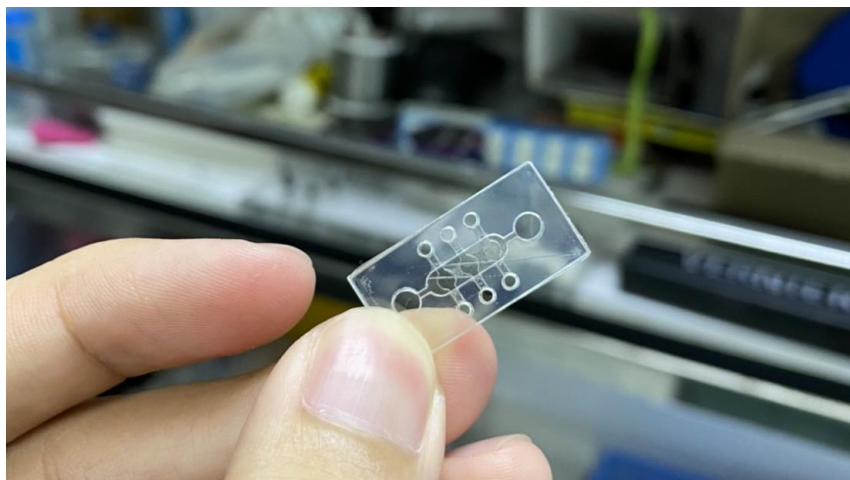
รูปที่ 3.6 ชิ้นงานช่องทางการไหลจุลภาค ที่ถูกตัดเรียบร้อยแล้ว

3.1.3 การประกบชิ้นงานเข้าด้วยกัน

เมื่อตัดชิ้นงานเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำแผ่นชิ้นงานในชั้นต่างๆ มาจัดวางให้ชิ้นงานในแต่ละชั้นให้มีตำแหน่งตรงกัน จากนั้นจึงนำชิ้นงานที่จัดเรียงเรียบร้อยแล้ว มารีดด้วยเครื่องรีดความร้อนดังแสดงในรูปที่ 3.7 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ก่อนรีดด้วยความร้อนควรใช้กระดาษห่อหุ้มชิ้นงานไว้ เพื่อช่วยให้ชิ้นงานมีความโปร่งใสที่ดีขึ้น เนื่องจากกระดาษช่วยป้องกันไม่ให้ชิ้นงานโดนความร้อนโดยตรง ด้วยขั้นตอนที่กล่าวมาทำให้การประกบชิปของไหลจุลภาคทำได้ง่าย และสะดวกรวดเร็ว



รูปที่ 3.7 เครื่องเคลือบบัตร สำหรับการประกบชิ้นงานด้วยความร้อน



รูปที่ 3.8 ชิปของไหลจุลภาคที่เสร็จสมบูรณ์

3.2 การเลี้ยงเซลล์บนชิปของไหลจุลภาค

เมื่อได้ต้นแบบไมโครฟลูอิดิกชิป และทำการทดสอบเบื้องต้นเรียบร้อยแล้ว เราก็สามารถนำเซลล์มาเลี้ยงบนชิปได้ โดยในโครงการนี้จะใช้เซลล์ fibroblast ในการเลี้ยงบนชิป เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่าย มีอัตราการรอดชีวิตสูง จึงเลือกใช้ในการเลี้ยงบนชิปที่ได้ทำการออกแบบ ซึ่งเซลล์จะนำมาจากห้องแลปสถาบันชีวการแพทย์ โดยขออนุญาตผ่านทางอาจารย์ที่ปรึกษา

3.3 วัดการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้ image processing

เมื่อได้ภาพจากการเลี้ยงเซลล์บนชิป ก็สามารถนำภาพเหล่านั้นมาวิเคราะห์โดยใช้ image processing ด้วยโปรแกรม imagej เพื่อวัดการอยู่รอดของเซลล์ โดยจะวัดจาก จำนวนเซลล์ ขนาดของเซลล์ รูปร่างของเซลล์ และพื้นที่ช่องเลี้ยงเซลล์ที่ลดลง จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบ เพื่อหาช่องเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์

3.4 สรุป

การดำเนินโครงการวิจัยในครั้งนี้ได้จัดแบ่งแผนการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้ ส่วนแรกจะเป็นการออกแบบและประดิษฐ์ชิปของไหลจุลภาค ส่วนที่สองเป็นการเลี้ยงเซลล์บนชิปของไหลจุลภาค และในส่วนที่สามเป็นการวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้ image processing ในแต่ละแผนการทดลองก็จะมีวิธีการตามรายละเอียดที่ได้ระบุไว้ข้างต้นเพื่อการรายงานผลและให้ได้ผลการทดสอบในบทที่ 4 ต่อไป

บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน (เบื้องต้น)

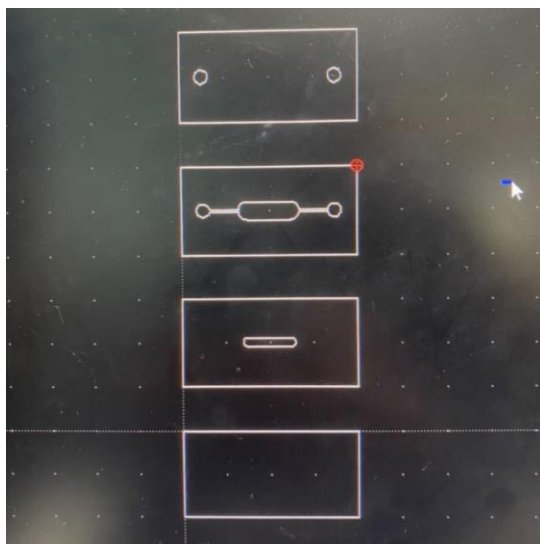
เนื้อหาในบทนี้ได้รวบรวมข้อมูลผลการทดลองต่างๆ ตามแผนการทดลองในบทที่ 3 แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อประกอบการอภิปรายผล งานในส่วนแรกจะเป็นการทดสอบการไหลของชิปของไหลจุลภาคที่ได้ทำการออกแบบ ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้จะเป็นการอธิบายถึงความสามารถของชิปของไหลจุลภาคที่ได้ออกแบบไว้ในแต่ละแบบ

4.1 การทดสอบ

เมื่อทำการประดิษฐ์ชิปของไหลจุลภาคเรียบร้อยแล้ว สิ่งแรกที่ต้องทดสอบคือการไหลของของไหลในช่องทางการไหลจุลภาค เพื่อดูว่าการทำงานเป็นไปตามที่เราได้ออกแบบไว้หรือไม่ มีการรั่วซึม หรือมีฟองอากาศภายในหรือไม่ วิธีการคือหยดสารละลายที่มีสีต่างกัน โดยในการทดสอบนี้จะใช้สารละลายสีเขียวแทนเซลล์ และสารละลายสีแดงแทนสารอาหารเลี้ยงเซลล์ และชิปที่จะทำการทดสอบมีดังนี้

ชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 1

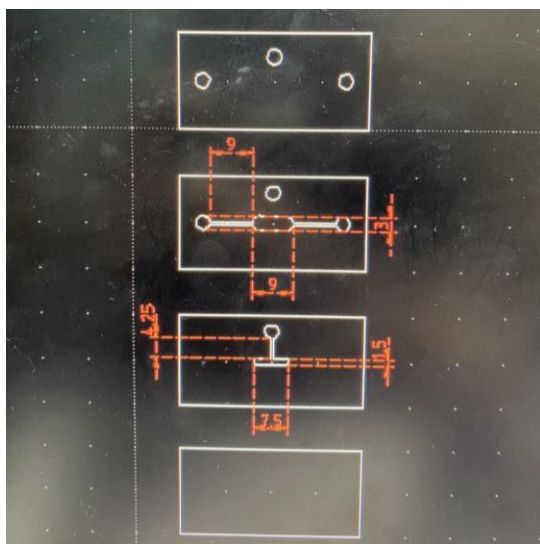
ออกแบบโดยคำนึงถึงการเลี้ยงเซลล์บนชิป ซึ่งจำเป็นต้องมีช่องสำหรับเลี้ยงเซลล์ และทางเข้าและออกของสารอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ จึงได้จัดทำเป็น 4 ชั้น ชั้นล่างสุดเป็นแผ่นรอง ชั้นถัดมาจะเป็นช่องสำหรับเลี้ยงเซลล์ ชั้นถัดมาเป็นช่องทางการไหลของสารอาหารเลี้ยงเซลล์ และชั้นบนสุดเจาะรูเพื่อเป็นช่องการให้สารอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4.1 การออกแบบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 1

ชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 2

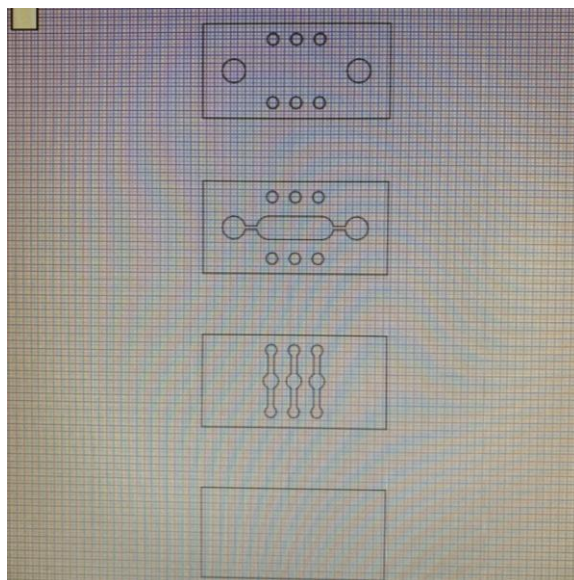
ออกแบบโดยพัฒนาต่อจากแบบที่ 1 โดยเพิ่มช่องสำหรับการดรอปเซลล์ลงไปบริเวณช่องเลี้ยงโดยตรง จึงได้จัดทำเป็น 4 ชั้น ชั้นล่างสุดเป็นแผ่นรอง ชั้นถัดมาเจาะเป็นช่องสำหรับเลี้ยงเซลล์และช่องทางการไหลของเซลล์ลงไปบริเวณช่องเลี้ยงเซลล์ ชั้นถัดมาเป็นช่องทางการไหลของสารอาหารเลี้ยงเซลล์และเจาะรูเพื่อเชื่อมกับช่องเลี้ยงเซลล์ชั้นล่าง ชั้นบนสุดเจาะรูเพื่อเป็นช่องการให้สารอาหารเลี้ยงเซลล์ และช่องสำหรับการดรอปเซลล์



รูปที่ 4.2 การออกแบบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 2

ชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3

ออกแบบโดยพัฒนาต่อจากแบบที่ 2 โดยเพิ่มช่องเลี้ยงเซลล์ให้มากขึ้น และทำช่องทางการไหลของเซลล์ทั้งสองข้าง และเพิ่มความสูงของชั้น จึงได้จัดทำเป็น 5 ชั้น ชั้นล่างสุดเป็นแผ่นรอง ชั้นถัดมาเจาะเป็นช่องสำหรับเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 ช่อง และช่องทางการไหลของเซลล์ลงไปบริเวณช่องเลี้ยงเซลล์ทั้งสองฝั่ง ในการทดลองจะเปลี่ยนแปลงความหนาของชั้นนี้ ชั้นถัดมาเป็นช่องทางการไหลของสารอาหารเลี้ยงเซลล์และเจาะรูเพื่อเชื่อมกับช่องเลี้ยงเซลล์ชั้นล่างชั้นนี้จะมี 2 ชั้น ซ้อนทับกัน และชั้นบนสุดเจาะรูเพื่อเป็นช่องการให้สารอาหารเลี้ยงเซลล์ และช่องสำหรับการดรออปเซลล์



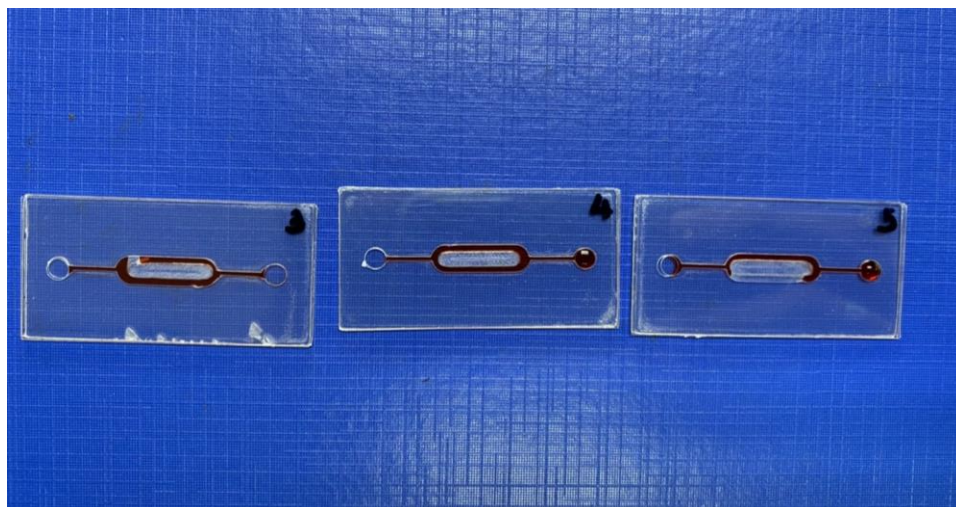
รูปที่ 4.3 การออกแบบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3

4.2 ผลการทดสอบ

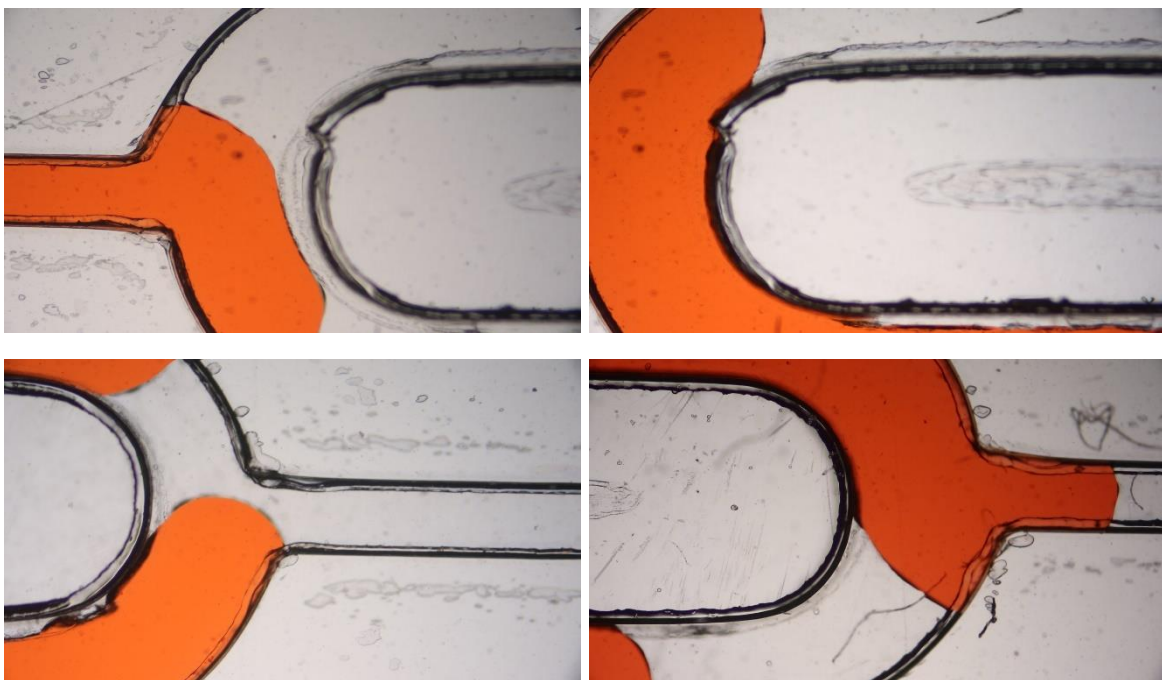
4.2.1 ผลการทดสอบการไหล

ชิปของไหลจุภาคแบบที่ 1

No.	การรั่วซึม	ฟองอากาศ	การทำงาน	หมายเหตุ
1	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	นำไปทดลองเจาะระบายอากาศ
2	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	ฉีดพลาตจากการประกบชิป
3	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
4	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
5	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
6	-	-	-	ฉีดพลาตจากการรีดความร้อน



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบชิปของไหลจุภาคแบบที่ 1

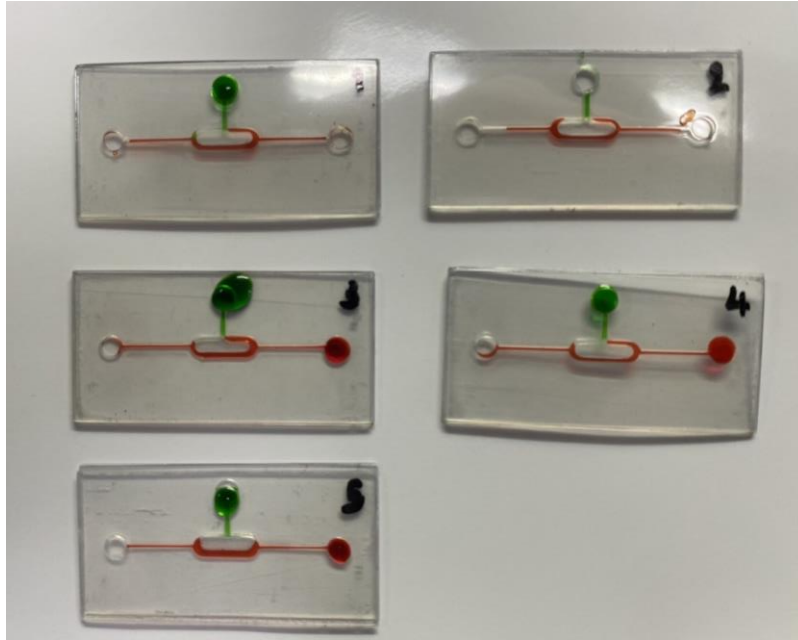


รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 1 ผ่านกล้องจุลทรรศน์

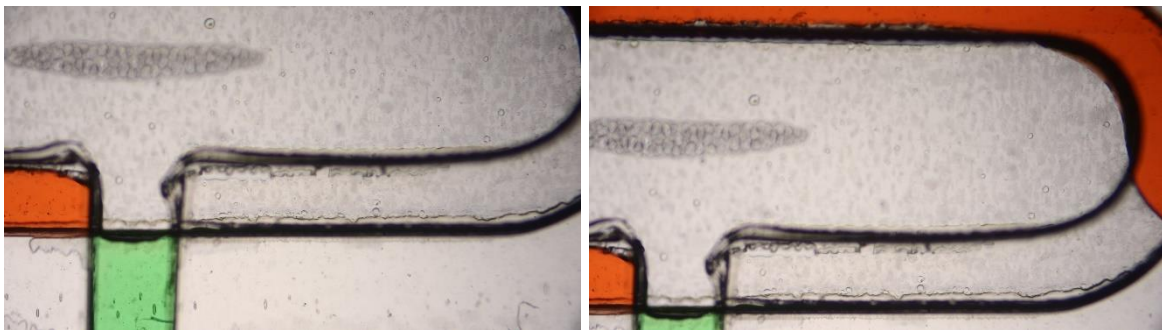
จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไม่ได้ฟังก์ชันตามที่ได้ออกแบบไว้ เมื่อให้สารละลายสีแดงลงไป พบว่าสารละลายไม่ลงไปสู่ช่องเลี้ยงเซลล์และอ้อมไปสองข้างของช่องเลี้ยง บางกรณีอาจจะถึงพร้อมกันทั้งสองข้างพอดี หรือในบางกรณีอาจถึงไม่พร้อมกันและเกิดเป็นฟองอากาศ

ชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 2

No.	การรั่วซึม	ฟองอากาศ	การทำงาน	หมายเหตุ
1	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
2	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
3	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
4	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
5	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	-
6	-	-	-	ผิดพลาดจากการรีดความร้อน



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบชิปของโหลจุลภาคแบบที่ 2

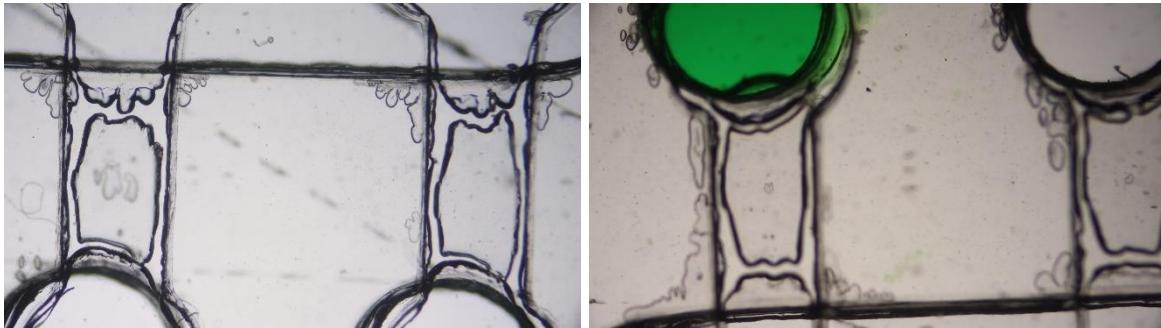


รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบชิปของโหลจุลภาคแบบที่ 2 ผ่านกล้องจุลทรรศน์

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไม่ได้ฟังก์ชันตามที่ได้ออกแบบไว้ เมื่อหยดสารละลายสีเขียวลงไป สารละลายไหลเข้าไม่ถึงช่องเลี้ยงเซลล์ และเมื่อหยดสารละลายสีแดงลงไป สารละลายไม่ลงไปยังช่องเลี้ยงเซลล์ และอ้อมไปทางซ้ายและขวาของช่องเลี้ยงเซลล์ ผังที่ติดกับช่องทางการไหลของเซลล์ก็จะหยุดและอีกฝั่งจะไหลต่อไปจนถึงทางออก จึงมีอากาศค้างภายใน และบางกรณีผังที่ติดกับช่องทางการไหลของเซลล์ก็ไหลไปไม่ถึงตรงกลาง เพราะช่องอีกฝั่งมีขนาดใหญ่เนื่องจากการประกอบชิปที่ไม่ดี สารละลายสีแดงจึงไหลไปยังทางออกได้เร็วกว่า

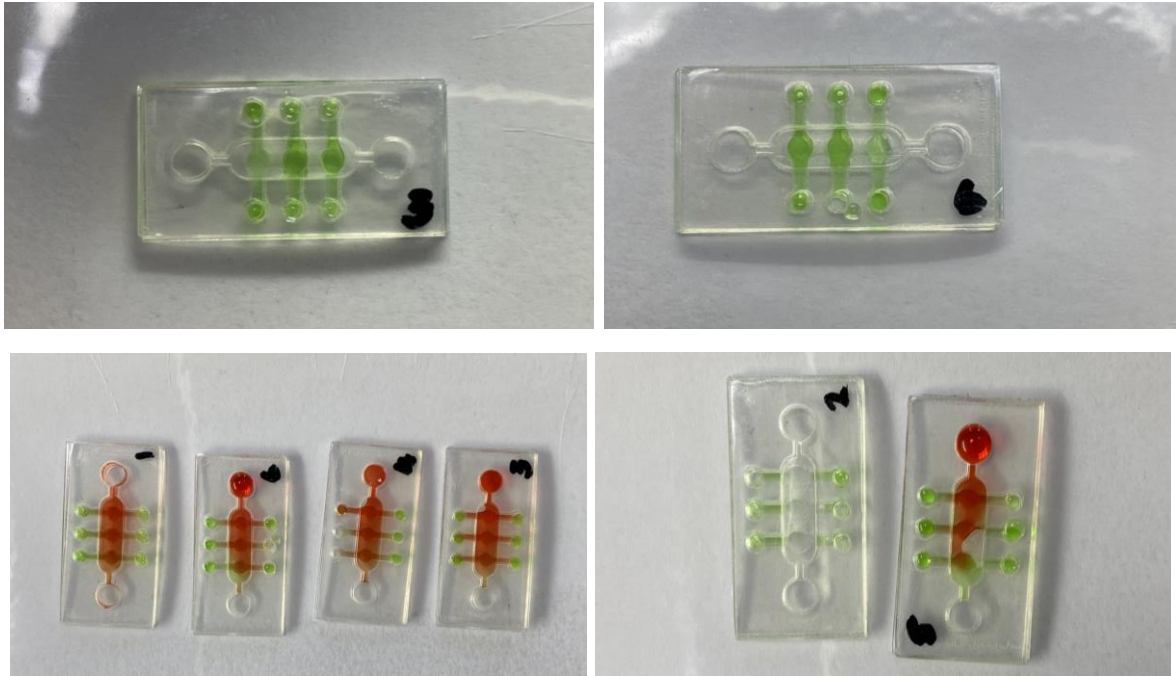
ชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3

เมื่อลองทำการทดลองที่ช่องเลี้ยงเซลล์สูง 125 μm 500 μm และ 625 μm พบว่าชิปที่ช่องเลี้ยงเซลล์สูง 125 μm ขณะนำชิปไปรีดด้วยความร้อน กาวจากชั้นบนจะลงมาปิดช่องทางการไหลของเซลล์ ช่องทางการไหลถูกปิด สารละลายจึงไม่สามารถผ่านไปได้ และเมื่อเพิ่มความสูงของช่องเลี้ยงเซลล์เป็น 625 μm พบว่าสามารถทำให้สารละลายทั้งสองสืผสมกันได้ เช่นเดียวกับชิปที่ช่องเลี้ยงเซลล์สูง 500 μm จึงเลือกทำการประดิษฐ์ชิปที่ช่องเลี้ยงเซลล์มีความสูง 500 μm ขึ้นมา

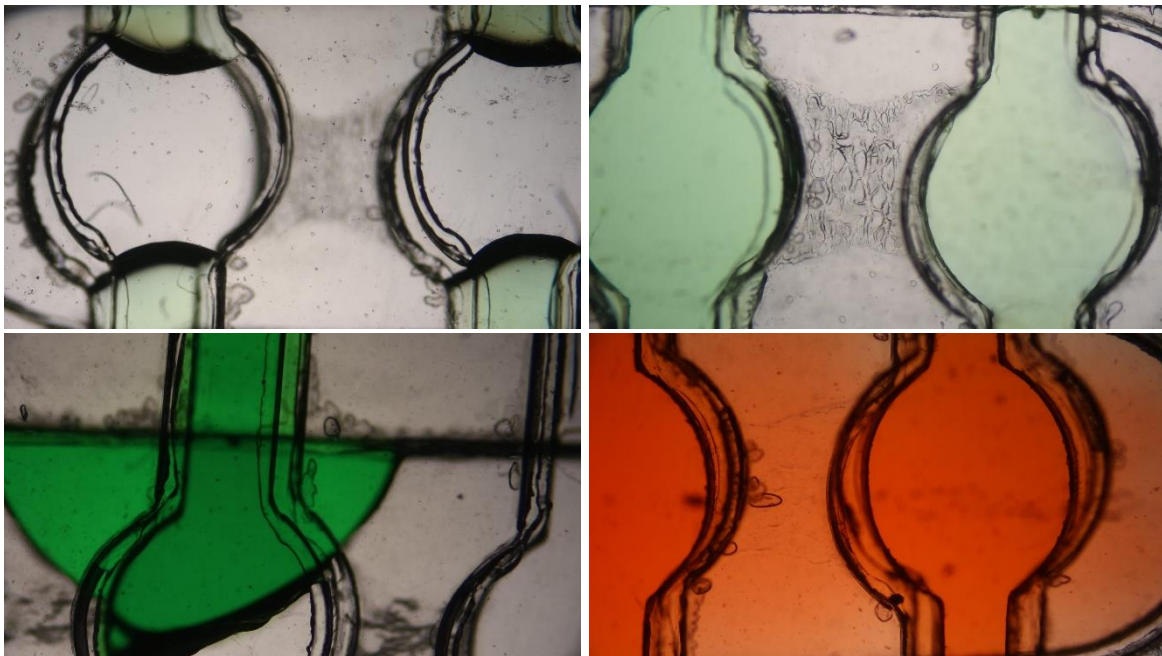


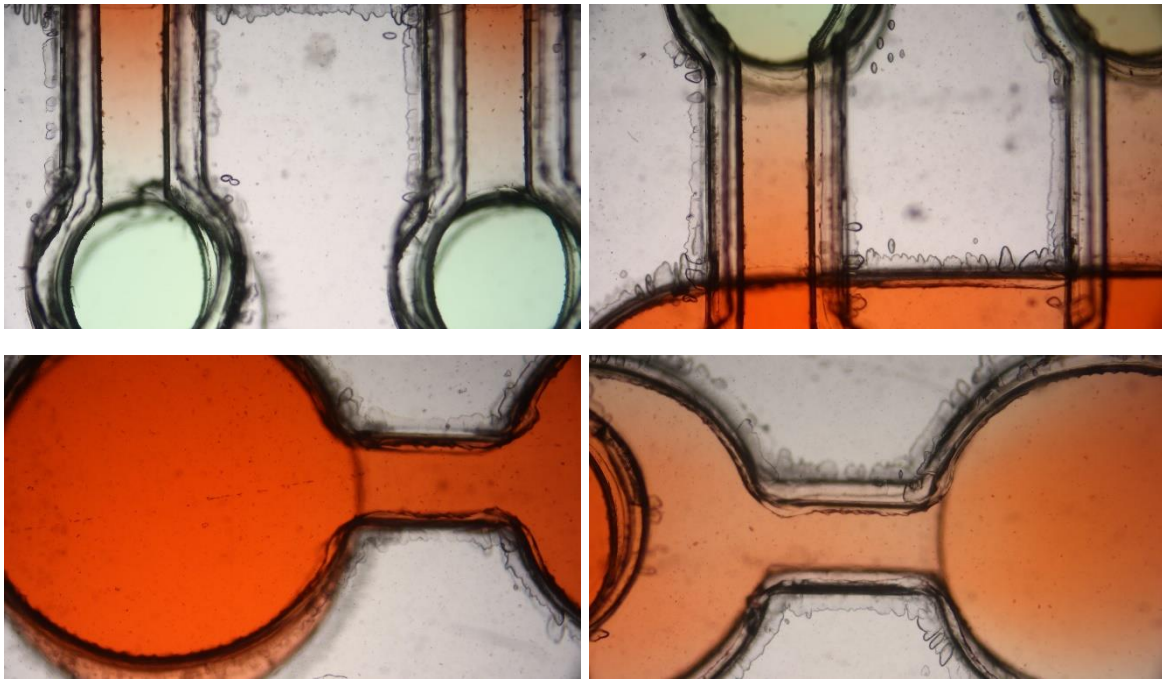
รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3 ความสูงของช่องเลี้ยงเซลล์ 125 μm ผ่านกล้องจุลทรรศน์

No.	การรั่วซึม	ฟองอากาศ	การทำงาน	หมายเหตุ
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ได้ตามกำหนด	-
2	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	สารละลายสีเขียวเข้าไม่ถึงช่องเลี้ยงเซลล์
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ได้ตามกำหนด	-
4	ไม่พบ	ไม่พบ	ได้ตามกำหนด	-
5	ไม่พบ	พบ	ไม่ได้ตามกำหนด	สารละลายสีเขียวปิดทางออกสารละลาย
6	ไม่พบ	ไม่พบ	ได้ตามกำหนด	-



รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3





รูปที่ 4.10 ผลการทดสอบชิปของไหลจุลภาคแบบที่ 3 ผ่านกล้องจุลทรรศน์

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าสารละลายสีเขียวและแดงสามารถผสมกันได้แล้ว แต่การใส่เซลล์ลงไปในห้องเลี้ยงเซลล์ต้องใช้ปลายไมโครไปเปิดใส่เข้าไปในห้องในลักษณะฉีดยา และเมื่อใส่ลงไป บางกรณีก็ไม่เต็มห้องเลี้ยงเซลล์ บางกรณีใส่ไปแล้วสารละลายสีเขียวก็จะขึ้นไปบนช่องของสารอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือไปปิดช่องทางไหลของสารละลายเลี้ยงเซลล์ ทำให้เกิดปัญหาได้

บรรณานุกรม

- [1] S. Boonhai, U. Tingtoy, “Animal cell culture: History, basic and application in blood bank service,” in *Chula Med Bull*, vol. 1, no. 5, p. 544-545, 2019.
- [2] อติสร เตื่อนตรานนท์, “ตรวจโรคด้วยชิป,” *วารสาร Techno & InnoMag*, ปีที่ 41, ฉบับที่ 236, หน้า 32-33, สิงหาคม-กันยายน, 2557.
- [3] สาทิติย์ ศรีมุงคุณ, นิमित ชมนาวัง, “ระบบของไหลจุลภาค (*Micro-fluidics*),” [Online]. Available: <https://www.slri.or.th/th/beamline/bl13w.html?view=article&id=377:2011-03-05-16-11-29&catid=58>. [Accessed: 7 สิงหาคม 2564].
- [4] Daniel A. Bartholomeusz, Ronald W. Boutté, and Joseph D. Andrade, “Xurography: Rapid Prototyping of Microstructures Using a Cutting Plotter,” in *journal of microelectromechanical systems*, vol. 14, no. 6, p. 1364-1374, 2015.
- [5] Loren E. Stallcop, Yasmín R. Álvarez-García, Ana M. Reyes-Ramos, Karla P. Ramos-Cruz, Molly M. Morgan, Yatao Shi, Lingjun Li, David J. Beebe, Maribella Domenech and Jay W. Warrick, Razor-printed sticker microdevices for cell-based applications. *Lab Chip*. 2018 Jan 30; 18(3): 451–462.
- [6] Shabestani Monfared, G., Ertl, P. & Rothbauer, M. An on-chip wound healing assay fabricated by xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure. *Sci Rep* 10, 16192 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73055-7>
- [7] Ito, H., Kaneko, M. On-chip cell manipulation and applications to deformability measurements. *Robomech J* 7, 3 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40648-020-0154-x>
- [8] mimetas. “2D Versus 3D Cell Cultures: Advantages and Disadvantages.” [Online]. Available: <https://www.mimetas.com/en/blogs/315/2d-versus-3d-cell-cultures-advantages-and-disadvantages.html>. [Accessed: Aug. 21, 2021].
- [9] mimetas. “3D Cell Culture vs. Traditional 2D Cell Culture Explained.” [Online]. Available: <https://www.mimetas.com/en/blogs/345/3d-cell-culture-vs.-traditional-2d-cell-culture-explained.html>. [Accessed: Aug. 21, 2021].

- [10] OST overseas co., ltd. “วิธีใช้เครื่องใช้สำนักงาน,” [Online]. Available: <http://www.ost.co.th/Tips.html>. [Accessed: 17 ตุลาคม 2564].