

รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคสำหรับคัดแยก
และจับเก็บเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขให้อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยว

Development of microfluidics-based device for single cell
isolation and trapping in canine round cell tumors

โครงการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

โครงการวิจัยประยุกต์ ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย

เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2558

หน่วยงานดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยประกอบด้วย 3 หน่วยงาน

- หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และ หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ประเภทของการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน โดยมีการประยุกต์ความรู้ทางวิศวกรรมศาสตร์ขั้นสูง ได้แก่ ไมโครอิเล็กทรอนิกส์ และระบบการไหลระดับจุลภาค บูรณาการกับความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อสร้างองค์ความรู้เชิงบูรณาการทางชีววิทยาระดับเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยใช้เซลล์สุนัขเป็นต้นแบบ องค์ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ทั้งในมนุษย์และสัตว์ในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย

โครงการวิจัยในสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.สพ.ญ.ดร. อัจฉริยา ไสละสูต หน่วยพยาบาลวิทยา ภาควิชาพยาบาลวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองหัวหน้าโครงการ

อ.น.สพ.ดร. ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นักวิจัย

น.สพ. เดชชัย เกตุพันธุ์ หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.ดร. อลงกรณ์ พิมพ์พิณ ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.ดร.วีระยุทธ ศรีธรรวานิช ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศิริ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นาย วิศรุต ศรีพุ่มไช่ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นาย วิน บรรจงปรุ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นาย จักรพงษ์ ศุภเดช ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นาย จิรวัดน์ จันดีวงค์ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นาย ชาญเดช หรูนันต์ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	7
บทนำ	9
ขอบเขตของโครงการวิจัย	12
สมมุติฐานการวิจัย	12
ทบทวนวรรณกรรม	13
โครงการย่อยที่ 1	18
สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 1	32
โครงการย่อยที่ 2	34
สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 2	52
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	54
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี	54
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	

สารบัญรูปและตาราง

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของอนุภาคในของไหล	19
รูปที่ 2	แสดงให้เห็น Dean cortices ที่เกิดขึ้นเมื่อของไหลไหลผ่านโค้ง	19
รูปที่ 3	แสดงสนามการไหลหมุนวนของแรงดัน	20
รูปที่ 4	แสดงถึงลักษณะของท่อที่ทำการคำนวณและออกแบบ	22
รูปที่ 5	แสดงขั้นตอนของการทำ soft lithography สำหรับสร้างอุปกรณ์ต้นแบบจาก PDMS	23
รูปที่ 6	แสดงแบบพิมพ์เขียวที่นำไปใช้สร้างแม่พิมพ์สำหรับสร้างอุปกรณ์	25
รูปที่ 7	แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้น	26
รูปที่ 8	แสดงการติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับปั๊มอัดโนมัติเพื่อทดสอบการทำงาน	27
รูปที่ 9	แสดงวิธีการติดตั้งกล่องดิจิตอลเพื่อบันทึกผลการทดลองในขณะทำงานจริง	27
รูปที่ 10	แสดงการติดตั้งอุปกรณ์	28
รูปที่ 11	แสดงการเกิดการรวมตัวกันของอนุภาค	28
รูปที่ 12	แสดงผลการวัดขนาดเม็ดโพลีเมอร์	29
รูปที่ 13	แสดงให้เห็นระยะห่างระหว่างกระแสการไหล	30
รูปที่ 14	เซลล์วิทยาของเซลล์มะเร็งชนิดกลมที่ผิวผนังสุญญากาศมาสต์เซลล์	31
รูปที่ 15	แสดงปัจจัยทางพลศาสตร์ของของไหล	35
รูปที่ 16	แสดงผลการศึกษาการจำลองการไหลของของไหล	36
รูปที่ 17	แสดงผลการศึกษาของ Park และคณะ (2010)	37
รูปที่ 18	แสดงอิทธิพลของรูปทรงเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยง	38
รูปที่ 19	แสดงขั้นตอนการสร้างและประกอบอุปกรณ์ในการดักจับเซลล์	39
รูปที่ 20	ภาพจำลองการติดตั้งอุปกรณ์ในการดักจับเซลล์มะเร็ง	40

รูปที่ 21	แสดงลักษณะของชุดตารางที่ใช้กำหนดขอบเขตในการนับจำนวน	42
รูปที่ 22	แสดงขอบเขตของช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสในการนับเซลล์	42
รูปที่ 23	แสดงความเป็นไปได้และลักษณะของการไหลวน	43
รูปที่ 24	แสดงภาพพิมพ์เขียวในการออกแบบอุปกรณ์	44
รูปที่ 25	แสดงการเรียงตัวของชุดหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม	44
รูปที่ 26	แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้น	45
รูปที่ 27	แสดงความสามารถของอุปกรณ์ในการดักจับเม็ดโพลีเมอร์	46
รูปที่ 28	แสดงลักษณะการดักจับเซลล์มะเร็งในหลุมเพาะเลี้ยงด้านหน้า	48
รูปที่ 29	แสดงลักษณะการดักจับเซลล์มะเร็งในหลุมเพาะเลี้ยงตรงกลาง	49
รูปที่ 30	แสดงลักษณะการดักจับเซลล์มะเร็งในหลุมเพาะเลี้ยงด้านท้าย	50
รูปที่ 31	แสดงลักษณะการดักจับเซลล์มะเร็งในหลุมเพาะเลี้ยงด้านท้ายใกล้ทางออก	51
ตารางที่ 1	แสดงร้อยละของเซลล์มะเร็งในแต่ละช่วงของอุปกรณ์	52

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคเพื่อคัดแยกและจัดเก็บเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขให้อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยว มีวัตถุประสงค์ดังนี้ เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาค ทำให้เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่เป็นสายกระแสการไหลตามขนาดและแยกออกจากกันตามขนาด โดยองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบอุปกรณ์ในระบบการไหลจุลภาคที่ใช้ในการคัดแยกเซลล์มะเร็ง ให้ถูกจัดเรียงออกมาในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆ และพัฒนาอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถใช้ดักจับเซลล์ที่อยู่ในสารแขวนลอยของเซลล์ (cell suspension) โดยให้เซลล์เหล่านั้นอยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆและมีชีวิตอยู่ได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ (Mast cell tumor) เป็นรูปแบบการศึกษา

โครงการนี้ประกอบด้วย 2 โครงการย่อย ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 การสร้างอุปกรณ์ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

โดยพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่ประยุกต์ความรู้เชิงฟิสิกส์ ของระบบของไหลจุลภาคควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของเม็ดโพลีเมอร์ชนิดโพลีสไตรีน (polystyrene polymer) เป็นรูปแบบการศึกษา และทำให้เม็ดโพลีเมอร์มีการเคลื่อนที่เป็นสายกระแสการไหลตามขนาดและแยกออกจากกันตามขนาดได้อย่างถูกต้อง โดยอุปกรณ์ที่ได้จะประกอบไปด้วยท่อสำหรับของไหลที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของท่ออยู่ที่ 130 ไมโครเมตร มีความกว้างเท่ากับ 500 μm ท่อทั้งหมดจะขดเป็นรูปวงกลมจำนวน 5 วง และมีระยะห่างระหว่างวงรอบ (interspace) ที่อยู่ติดกันอยู่ที่ 500 μm โดยมีรัศมีรวมของความโค้งของท่อทั้งหมดอยู่ที่ 10 มิลลิเมตร และมีอัตราส่วนของขนาดของอนุภาคที่ใช้ศึกษาแต่ละขนาดต่อความสูงของท่อ (a_p/H) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.07 โดยอุปกรณ์นี้จะต่อกับท่อทางเข้าจำนวน 2 ท่อ ซึ่งท่อแรกจะต่อสารแขวนลอยของอนุภาค และอีกด้านหนึ่งจะต่อกับน้ำกลั่น โดยสารแขวนลอยและน้ำกลั่นจะถูกฉีดเข้าสู่อุปกรณ์โดยปั๊มอัดโนมัต ที่ปลายของท่อรอบสุดท้ายจะมีลักษณะขยายออกโดยมีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่ 2 mm และต่อเข้ากับช่องออกย่อยจำนวน 10 ช่อง โดยในการศึกษารั้งนี้จะใช้อัตราการไหลอยู่ที่ 1 ml/min พบว่า อุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพที่จะสามารถทำให้เกิดการการแยกเม็ดโพลีเมอร์ ที่มีขนาดแตกต่างกันและปนกันอยู่ด้วยกันออกจากกันได้ โดยเกิดเป็นกระแสการไหลของเม็ดโพลีเมอร์แยกกันจำนวน 2 เส้นตามขนาด โดยเส้นแรกเกิดจากเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 15 μm ในขณะที่เส้นที่สองเกิดจากเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm การศึกษารั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รายงานไว้โดย Kuntaegowdanahalli และคณะ (2009)

ส่วนการศึกษาในเซลล์มะเร็งชนิดกลมในสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ พบว่าขนาดของมาสต์เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 μm และมากกว่า พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะออกมาในท่อ ตามที่ได้ทำจำลองการไหลและแยกเซลล์ด้วยเม็ดโพลีเมอร์ อาจเนื่องจากแรงที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามพบว่าการเกาะของเซลล์ตามท่อเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปฏิกิริยาของเยื่อหุ้มเซลล์กับวัสดุท่อ มีการเกาะติดรวมทั้งเป็นเซลล์มีชีวิตและมีคุณสมบัติการจับกันเป็นกลุ่ม (aggregation) และการพบเศษเซลล์ (debris) ในสารแขวนลอยสอดคล้องกับผลของเซลล์มะเร็งที่ออกมาจากท่อที่มีจำนวนลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง รวมทั้งร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต

อยู่หลังจากผ่านอุปกรณ์แยกเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 30 เนื่องจากแรงเหวี่ยงในท่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสมดุล ซึ่งควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการทำงาน และผลกระทบของเซลล์ในท่อต่อไป

โครงการย่อยที่ 2 การสร้างอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

โดยออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคที่มีหลุมเพาะเลี้ยงอยู่ที่พื้นของอุปกรณ์ เพื่อใช้ดักจับเม็ดโพลีไมธรีน และเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ลงหลุมเพาะเลี้ยง และอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ภายในของของไหล (internally physical property) ในการพาเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ที่สามารถนำมาใช้ดักจับอนุภาคที่แขวนลอยในของไหลตัวกลางได้แก่ เม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm และเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ ที่มีขนาดในช่วง 10-20 μm ได้ ตามหลักทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) โดย Park และคณะ (2010) เป็นปัจจัยในการพิจารณา โดยหลักการการทำงานของอุปกรณ์จะเป็นการทำงานโดยที่ไม่ต้องใส่สนามของแรงจากภายนอก (external force field) เป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่ของอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลตัวกลางจะมีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนการไหลของของไหลตัวกลางด้วยแรงเฉื่อย (inertial force) การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ อนุภาคแต่ละตัวจะถูกดึงให้ตกลงสู่พื้นล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force) ที่กระทำต่ออนุภาค เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยง อนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation force) ของของไหลตัวกลางเกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยง นอกจากนี้พบว่ารูปร่างทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่มีความแรงที่สุด และดักจับดีที่สุด อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ถูกประกอบด้วยวิธี soft-lithography โดยใช้ PDMS ทำหน้าที่เป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมาจะประกอบไปด้วยสองส่วนหลักได้แก่ ช่องการไหลหลัก (main flow channel) สำหรับให้ของไหลตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของช่อง 70 μm และมีความกว้าง 500 μm โดยที่ปลายของอุปกรณ์ด้านหนึ่งจะต่อกับช่องทางเข้า inlet จำนวน 1 ช่องและช่องทางออก (outlet) จะอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของอุปกรณ์ ภายหลังจากที่ติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับระบบควบคุมแล้ว โดยในขั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.1 ml/hr อย่างต่อเนื่องเพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมา มีความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้

ประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 30 ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากผลการทดลองทั้งหมด โดยพบว่าอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษานี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ค่อนข้างดี (กำหนดไว้ที่ ร้อยละ 45) และพบว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ อย่างไรก็ตามในอนาคตยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการจัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ที่สูงขึ้นต่อไป ก่อนที่จะนำอุปกรณ์นี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยระดับเซลล์เดี่ยวต่อไป

บทนำและที่มาของโครงการ

โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการเจริญและงอกขยายที่ผิดปกติ (abnormal proliferation and overgrowth) ของเซลล์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โรคเนื้องอกและมะเร็งเป็นโรคที่มีความสำคัญในลำดับต้นๆ ทั้งในมนุษย์และในสัตว์เลี้ยง และมีอุบัติการณ์ (incidence) ในการเกิดโรคที่มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และยังไม่มียาหรือวิธีการใดๆ ที่ใช้ในการรักษาโรสดังกล่าวให้หายขาดได้ในปัจจุบัน

พยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของโรคเนื้องอกและมะเร็งนั้น ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานยืนยันแสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ มักมีการเกิดการกลายพันธุ์ (mutant gene) เกิดขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอันหนึ่งที่ส่งผลให้เซลล์ที่มียีนที่ผิดปกติเหล่านี้สามารถเกิดการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นนั้นมักจะไม่ได้เกิดขึ้นมาจากเซลล์หลายๆ เซลล์พร้อมๆ กันในเนื้อเยื่อที่เกิดโรค แต่จะเกิดขึ้นในเซลล์เพียงเซลล์เดียว (single cell) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อที่มีการสะสมความผิดปกติทางพันธุกรรมไว้ภายในเซลล์ทำให้มีการแบ่งเซลล์และงอกขยายที่ผิดปกติจนไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะต้องพิจารณาว่าเซลล์ใดที่เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลง (transformed cell) และให้กำเนิดก้อนเนื้องอกและมะเร็ง รวมทั้งเซลล์เหล่านี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพเป็นอย่างไร ซึ่งความเข้าใจในขบวนการสำหรับการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงจะนำมาซึ่งการค้นหาแนวทาง และวิธีการในการรักษาโรคเนื้องอกและมะเร็ง ให้สามารถหายขาดได้ต่อไปในอนาคตข้างหน้า

อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญที่สุด ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งในปัจจุบันและยังคงเป็นปัญหาที่ต่อเนื่องที่สำคัญต่อไปในอนาคต คือเรื่องของความแตกต่างอย่างหลากหลายทางชีวภาพของเซลล์ (cellular heterogeneity) ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง รวมทั้งความแตกต่างทางด้านพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) ของเซลล์เหล่านี้ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นทั้งภายในก้อนเนื้องอกและมะเร็งเดียวกัน (intratumour heterogeneity) หรือเกิดความแตกต่างอย่างหลากหลายระหว่างเนื้องอกและมะเร็งที่ต่างชนิดกัน (intertumour heterogeneity) ตัวอย่างของความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจน เช่น ลักษณะของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งที่มาจากก้อนเดียวกันแต่ต่างบริเวณกัน หรือที่มาจากเนื้องอกชนิดเดียวกันแต่มาจากผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่ต่างกันนั้น ก็ยังมีลักษณะทางสัณฐาน (morphologic appearance) หรือมีการเปลี่ยนแปลงเช่น การกลายพันธุ์ หรือมีการทำงานทางชีวเคมี (biochemical function) ที่แตกต่างกัน เป็นต้น (Heppner, 1984; Marusyk and Polyak, 2010; Michor and Polyak, 2010; Marusyk et al., 2012) ซึ่งปัญหาเหล่านี้มีอิทธิพลอย่างมากและเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง รวมถึงการกำหนดแผนในการรักษาโรคอีกด้วย เพราะคุณสมบัติที่ผิดปกติเหล่านี้อาจจะนำมาซึ่งการแปรผลที่ผิดพลาด เมื่อนำมาใช้ศึกษาเนื้องอกและมะเร็งที่เป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันแต่มีกลไกที่ผิดปกติภายในเซลล์ที่ต่างชนิดกัน ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดที่สุดในปัจจุบันได้แก่ การให้สารเคมีบำบัดโดยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานของเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่อยู่ในก้อนเป็นปัจจัยในการตัดสินใจ โดยไม่คำนึงถึงเซลล์ที่เป็นประชากรส่วนน้อยแต่มีความสำคัญในการที่เป็นเซลล์ที่อาจจะเกิดกำเนิดของเซลล์ในก้อนมะเร็ง อาจจะทำให้สารเคมีบำบัดที่ใช้

สามารถทำลายได้เฉพาะเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งที่เป็นจุดกำเนิดได้ ทำให้การรักษาไม่ได้ผลและมักจะมีการงอกของก้อนมะเร็งใหม่ที่จุดเดิม (recurrence) ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญที่พบในปัจจุบัน

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางมากขึ้นว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่ให้กำเนิดเนื้องอกและมะเร็งนั้นมีคุณสมบัติที่มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดปกติ (normal stem cell) ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของร่างกายโดยทั่วไปหรือคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดของคัพพะ (embryonic stem cell) ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญเช่น มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (self-renewal) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตยืนยาว (long-lived) มีความต้านทานต่อสารเคมีบำบัดและรังสีรักษาสูง (highly radio-chemotherapeutic resistance) หรือหยุดเจริญชั่วคราว (dormancy) จึงมีการสร้างสมมุติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง (cancer stem cell hypothesis) ที่เป็นหัวข้อหลักในงานวิจัยทางด้านเนื้องอกและมะเร็งเรื่องหนึ่งที่มีอัตราการแข่งขันที่สูงมากทั่วโลกในปัจจุบัน นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งยังเป็นต้นเหตุ ทำให้เกิดสภาพความแตกต่างอย่างหลากหลายของเซลล์เนื้องอกและมะเร็งดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (Ailles and Wiessman, 2007; Lobo et al., 2007; Dick, 2008; O'Brien et al. 2009; Clevers, 2011; Valent et al., 2012)

ดังนั้นเมื่อรวมหลักการและปัญหาดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกัน จะเห็นได้ว่าความแตกต่างอย่างหลากหลายที่เกิดขึ้นในเซลล์เนื้องอกและมะเร็งนั้น น่าจะเป็นผลมาจากการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกและมะเร็ง โดยเริ่มจากการเป็นเซลล์เริ่มต้นที่ทำหน้าที่สะสมความผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ใช้ควบคุมขบวนการแบ่งเซลล์และงอกขยาย ดังนั้นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการพิสูจน์สมมุติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งก็คือ การที่ต้องศึกษาเซลล์เหล่านี้ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวๆที่มีขนาดในระดับจุลภาค เพื่อชี้ให้ชัดเจนไปว่าเซลล์ใดที่ทำหน้าที่ในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

แต่ด้วยเทคนิคและวิธีการใช้กันในงานวิจัยอย่างทั่วไปในปัจจุบัน เช่น เทคนิคโฟว์ไซโตเมทรี (flow cytometry หรือ FACS) หรือเทคนิคทางอิมมูโนไซโตเคมีสตรี้ (immunocytochemistry) สำหรับใช้คัดแยกเซลล์นั้นถึงแม้จะสามารถคัดแยกเซลล์ที่ต้องการได้ (Tirino et al., 2013) แต่เซลล์ที่ได้อาจจะไม่มีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติบอดี (antibody) กับโปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (surface-protein marker) ที่อยู่บนผิวเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีกำหนดโปรตีนเครื่องหมายที่จำเพาะสำหรับเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง หรือโปรตีนเครื่องหมายในเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็ง ก็อาจจะมีการแสดงออกที่ไม่เหมือนกันแม้จะมาจากเนื้องอกชนิดเดียวกันซึ่งพบว่าขึ้นกับสถานะ (stage) ของเซลล์ รวมทั้งการศึกษาตัวชี้วัดอื่นๆ เช่น การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อตรวจสอบยีนที่การกลายพันธุ์ ผลที่ได้นั้นอาจจะไม่สามารถบอกจำเพาะลงไปได้ว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเกิดที่เซลล์ใด รวมทั้งค่าที่ได้เสมือนว่าเป็นผลลัพธ์โดยเฉลี่ยที่เกิดจากเซลล์ทั้งหมดในเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บมา ซึ่งมีความแตกต่างอย่างหลากหลายแฝงอยู่ทำให้ไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าเป็นผลที่เกิดขึ้นในเซลล์ต้นกำเนิด หรือจากเซลล์อื่น เป็นต้น

ดังนั้นจึงมีเหตุจำเป็นที่จะต้องสร้างระบบการศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยว โดยการพัฒนาวีธีที่ใช้ในการทำให้เซลล์ที่เก็บมาได้ในตัวอย่างกระจายตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเตรียมเซลล์ที่นานและมากเกินไปจนทำให้เซลล์ตาย ส่งผลให้ผลในการศึกษาและวิเคราะห์ผลมีความผิดพลาดได้ รวมทั้งความสามารถที่จะจัดเรียงเซลล์เหล่านี้ให้อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวในภาชนะที่ใช้ศึกษา ซึ่งเทคนิคในระดับมหภาครวมทั้งที่กล่าวมาข้างต้นแล้วไม่สามารถทำได้อย่างแม่นยำ (Kalisky et al., 2011; Fritzch et al., 2012) เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบลักษณะที่แท้จริงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งอย่างชัดเจนเช่น รูปร่างและขนาด เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่ามีเซลล์ที่มีหน้าที่เหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดปกติดังที่ได้กล่าวมาแล้วแฝงตัวอยู่ในก้อนเนื้องอกและมะเร็ง และสามารถตรวจสอบคุณสมบัติในการทำหน้าที่ในเชิงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ด้วยเทคนิคต่างเช่น PCR RT-PCR และอื่นๆ แต่เพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนการวิเคราะห์ผลในการศึกษาเซลล์อันเกิดจากความแตกต่างอย่างหลากหลายดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงมีเหตุจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวีธีการใหม่ๆ โดยใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ในทุกแขนงเข้ามาช่วยแก้ปัญหา ซึ่งวิธีการหนึ่งซึ่งงานวิจัยทั่วโลกให้การยอมรับและนำมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในปัจจุบันคือ เทคนิคระบบของไหลจุลภาค (microfluidics)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า การที่มีความแตกต่างอย่างหลากหลายของเซลล์ในก้อนเนื้องอกและมะเร็งนั้น ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการที่จะศึกษาให้เข้าใจถึงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกและมะเร็งโดยเฉพาะเรื่องของการระบุตัวของเซลล์เหล่านี้ อีกทั้งเทคนิคและวิธีการทางระดับมหภาคที่มีอยู่ในปัจจุบันเช่น FACS และ PCR ยังไม่สามารถตอบสนองต่องานวิจัยเพื่อให้ได้รับผลลัพธ์ที่ถูกต้อง ดังนั้นเพื่อที่จะทำให้สามารถเข้าถึงความเข้าใจอันถูกต้องและเป็นการลดปัจจัยที่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่จะมาศึกษา รวมทั้งเทคนิคของไหลในระดับจุลภาคเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการที่จะประยุกต์มาใช้สำหรับศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวได้ (Nilsson et al., 2009)

ดังนั้นการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ที่ใช้หลักการทางระบบของไหลจุลภาคที่สามารถใช้แยก และทำให้เซลล์ที่จะศึกษาให้กระจายตัวอยู่ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถจัดเก็บเซลล์เหล่านี้ให้อยู่ในภาชนะหรือช่องจัดเก็บในลักษณะ 1 เซลล์ต่อ 1 ช่อง ตามช่วงขนาดของเซลล์โดยมีเงื่อนไขว่าเซลล์ที่จัดเก็บได้จะต้องมีชีวิตอยู่ และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับเซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ต่อไปได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วย 2 โครงการย่อย ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 การสร้างอุปกรณ์ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้

- 1.1. การออกแบบอุปกรณ์
- 1.2. การจำลองการทำงานของอุปกรณ์
- 1.3. การสร้างอุปกรณ์
- 1.4. การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์แบบ ณ เวลาจริง
- 1.5. การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่จับเก็บได้จากอุปกรณ์

โครงการย่อยที่ 2 การสร้างอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้

- 2.1 การออกแบบอุปกรณ์
- 2.2. การจำลองการทำงานของอุปกรณ์
- 2.4 การสร้างอุปกรณ์
- 2.4 การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์แบบ ณ เวลาจริง
- 2.5 การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่จับเก็บได้จากอุปกรณ์

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมติฐานของงานวิจัยในครั้งนี้คือ ระบบของไหลจุลภาคสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคนิค และสร้างอุปกรณ์ ที่สามารถควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของเซลล์ (cell suspension) เนื่องจากชนิดกลมของสัณฐานที่เก็บมาได้โดยวิธีการดูดเจาะด้วยเข็ม (fine-needle aspiration) จากก้อนเนื้ออกของสุนัขได้ และสามารถทำให้เซลล์เกิดการกระจายตัวของเซลล์ให้อยู่ในลักษณะของเซลล์เดี่ยวๆ รวมทั้งสามารถบังคับให้เซลล์ที่กระจายตัวอยู่ถูกจับเก็บเซลล์ในช่องจับเก็บโดยมีเซลล์ 1 ตัวต่อ 1 ช่อง ตามขนาดของเซลล์โดยที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ และสามารถนำมาใช้ศึกษาถึงคุณลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์เหล่านี้ในขั้นต่อไปได้

การทบทวนวรรณกรรม

เซลล์ที่ยังมีชีวิต (living cells) นั้น โดยปกติจะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological properties) ของตัวเองอยู่ตลอดเวลาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มากกระตุ้นทั้งจากภายนอกและภายใน เซลล์ (extracellular and intracellular stimuli) ทำให้เซลล์เกิดการปรับตัว (adaptation) เพื่อรักษาสมดุลภาพ (homeostasis) ของเซลล์ไว้ได้ส่งผลให้เซลล์ยังคงสามารถมีชีวิตอยู่รอด (survival) ต่อไปได้

โดยปกติแล้วเซลล์แต่ละเซลล์ถึงแม้จะอยู่ในเนื้อเยื่อเดียวกันก็ตาม ก็จะสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งเร้าในระดับที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในแต่ละเซลล์ต่อการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจึงมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละเซลล์ไม่มากนักด้วยเช่นกัน ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ที่เกิดขึ้นจึงเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในการกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ (biological characteristics) ของแต่ละเซลล์ ให้มีความแตกต่างจากกันทั้งในด้านสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีรวิทยา (physiology) ดังนั้นเซลล์แต่ละเซลล์จึงไม่มีความเท่ากันโดยสมบูรณ์ และทำให้เกิดความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ (cellular heterogeneity) ในแต่ละเซลล์เกิดขึ้น (Batchelor et al., 2013)

ความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ จัดได้ว่าปัญหาสำคัญที่สุดสำหรับการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ (cell biology) เพราะความแตกต่างที่เกิดขึ้นย่อมทำให้นักวิจัยไม่สามารถใช้กฎเกณฑ์ที่แน่นอนที่ใช้สำหรับศึกษาเซลล์ชนิดหนึ่งๆ มาใช้ศึกษาเซลล์ที่เหลือได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพียงพอในช่วงเวลาหนึ่ง ดังนั้นส่งผลให้การแปลผลการศึกษา (study interpretation) ย่อมมีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นด้วย สิ่งเหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีผลต่อความเข้าใจอย่างละเอียด (comprehension) ในชีววิทยาของเซลล์มีความคลาดเคลื่อนและผิดพลาดไปด้วย (Wu and Singh, 2011; Yin and Marshall, 2012) เช่น ในการศึกษาเซลล์โดยใช้โปรตีนเครื่องหมายที่ผิวเซลล์ (surface protein marker) เพื่อกำหนดชนิดของเซลล์ต่าง ๆ นั้น จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าถึงแม้ว่าจะเป็นเซลล์ที่เป็นชนิดเดียวกันและมีความเท่าเทียมกันทั้งทางพันธุกรรม (genetic identity) ทางรูปร่าง (morphology identity) หรือการทำงานที่ (functional identity) ก็ยังมีความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายที่ศึกษา ซึ่งในบางเซลล์อาจจะมีการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ ในขณะที่บางเซลล์อาจจะไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายในขณะที่ทำการศึกษาก็เป็นได้ นอกจากนี้เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนเครื่องหมายก็อาจจะมี ความเข้ม (intensity) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันทั้งที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันเป็นต้น สิ่งเหล่านี้จัดเป็นตัวอย่างอันดีอันหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ที่เกิดขึ้น

กลไกอันหนึ่งที่เป็นไปได้ในการทำให้เกิดความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์นั้น อาจจะเป็นผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากการที่เซลล์แต่ละเซลล์มีการตอบสนองต่อสัญญาณกระตุ้นต่างๆในระดับที่ไม่เท่ากัน ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่ถูกกระตุ้น (activated) ก็จะมีการตอบสนองเกิดขึ้น ในขณะที่เซลล์อื่นๆถึงแม้จะเป็นชนิดเดียวกันและในเนื้อเยื่อเดียวกันอาจจะอยู่ในสภาพคือต่อการกระตุ้น (refractory) ทำให้เซลล์อยู่ในสถานะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (inactivated) และทำให้ไม่มีการตอบสนอง (irresponsive) เกิดขึ้น หรือเซลล์อาจเกิดการกระตุ้น แต่มีการตอบสนองของเซลล์ที่มีความแตกต่างจากเซลล์อื่นๆ ทั้งที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและได้รับสิ่งเร้าชนิดเดียวกันก็

เป็นไปได้ สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์หนึ่งที่ถูกระตุ้น อาจจะมีขบวนการตอบสนองทางชีวภาพที่แตกต่างออกไปจากเซลล์อื่นๆที่ทั้งที่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน รวมทั้งรูปแบบการตอบสนองก็มีความหลากหลายมากกว่าจำนวนปัจจัยที่มากระตุ้นเซลล์ (Mogilner et al., 2006) ดังจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของการศึกษาเซลล์มะเร็งและเนื้องอก (Kim and Orkin, 2011)

ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงผลกระทบในเรื่องของความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา (dynamic process) และหลากหลาย ในปัจจุบันจึงได้มีคำแนะนำที่สำคัญที่ใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ศึกษาชีววิทยาของเซลล์เพื่อให้ได้ผลที่แน่ชัด คือให้ทำการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่างๆในระดับเซลล์เดี่ยวๆ (single-cell analysis) โดยเริ่มตั้งแต่การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงการกำหนดคุณลักษณะทางชีวภาพ และต้องใช้อุปกรณ์ที่สามารถที่จะแยกให้เซลล์แต่ละเซลล์นั้นถูกแยกออกจากกันโดยสมบูรณ์ และต้องไม่มีการสัมผัสกันเพื่อลดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ที่จะเกิดขึ้น (cell-to-cell interaction) เมื่อเซลล์มีการสัมผัสกัน นอกจากนี้วิธีการต่างๆที่จะนำมาใช้คัดแยกและจัดเรียงเซลล์ที่จะศึกษาในระดับเซลล์เดี่ยวนั้น ไม่ควรที่จะต้องใช้วิธีการในการเตรียมเซลล์ที่ยุ่ยากหรือต้องใช้สารที่มีผลกระทบต่ออายุรอดของเซลล์ (cell viability) และจะต้องมีความแม่นยำในการที่จะแยกเซลล์ที่มีอยู่ในตัวอย่างซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่ต้องการอยู่อย่างจำกัด และให้ผลในการศึกษาที่มีความไวสูง (high throughput and sensitivity) รวมทั้งสามารถอำนวยความสะดวกให้แก่ผู้ที่ศึกษาสามารถทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง และมีขั้นตอนในการใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก

อย่างไรก็ตามวิธีการคัดแยกเซลล์ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถทำให้ผู้วิจัยเข้าถึงการศึกษาเซลล์เป้าหมายในระดับเซลล์เดี่ยวได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งวิธีการต่างๆที่ใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (conventional methods) มักจะเป็นการวัดผลที่เกิดจากค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพตามธรรมชาติของประชากรของเซลล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่สามารถบอกลงไปได้ชัดเจนว่าเซลล์ใดที่เป็นเซลล์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านั้นขึ้นมา (Yin and Marshall, 2012) ถึงแม้ว่าจะมีเครื่องมือและวิธีการบางอย่างที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ที่ระดับเซลล์เดี่ยวได้บ้างก็ตามเช่น การใช้โฟลไซโตเมตรี (Flow cytometry) สำหรับคัดแยกเซลล์ หรือการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) การตรวจสอบคุณสมบัติทางพันธุกรรมของเซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (fine-needle aspirated cell) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เมื่อต้องนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์เดี่ยวๆจำนวนมากเช่น การใช้ Flow cytometry จำเป็นต้องใช้แอนติบอดี (antibody) ที่แสดงออกจำเพาะต่อเซลล์นั้นๆ ซึ่งการใช้แอนติบอดีอาจจะมีผลทำให้วิถีสัญญาณ (signal pathway) ที่ควบคุมกลไกทางชีวภาพที่สำคัญเช่น การกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตมีความผิดปกติได้เมื่อนำเซลล์ที่เก็บรวบรวมได้ด้วยวิธีเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่อไป อาจส่งผลให้เกิดการแปรผลที่คลาดเคลื่อนขึ้นได้ นอกจากนี้ที่สำคัญคือ วิธีการศึกษาเหล่านี้จะสามารถใช้ศึกษาชีวภาพของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งเท่านั้น (single time-point) จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาของเซลล์ที่ต้องการความต่อเนื่องได้ โดยเฉพาะการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาเฉพาะชั่วขณะหนึ่ง (spatio-

temporal dynamic change) แต่มีผลสำคัญต่อการตัดสินใจต่อเซลล์ในการตอบสนองและกำหนดชะตาชีวิตของเซลล์ (Yin and Marshall, 2012; Sackmann et al., 2014) ดังนั้นข้อจำกัดต่างๆเหล่านี้ที่มีอยู่จึงมีผลกระทบทำให้ผลการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในปัจจุบันนี้ ส่งผลให้มีความแปรผันต่อผลการศึกษาอย่างมาก เมื่อต้องนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวและเนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ถูกออกแบบมาเพื่อดำเนินการบนเซลล์ที่อยู่ในลักษณะที่เป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ (bulk of cells) และโดยปกติจะมีประชากรของเซลล์ประมาณ 10^3 ถึง 10^6 เซลล์ต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง (Chao and Ros, 2008) ดังนั้นเทคนิคเหล่านี้จึงต้องการจำนวนตัวอย่างขนาดใหญ่

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวในปัจจุบัน มีความสำคัญเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากโดยเฉพาะสำหรับงานวิจัยระดับเซลล์ที่ต้องการความถูกต้องแม่นยำสูง รวมทั้งความเข้าใจในเรื่องความแตกต่างทางชีวภาพของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยว จะนำมาซึ่งให้ความเข้าใจอย่างละเอียดในเรื่องการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่มีความซับซ้อน โดยเฉพาะการตัดสินใจของเซลล์ในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากกลไกทางชีวเคมีต่างๆ ที่ส่งผลให้เซลล์แต่ละเซลล์มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงตัวเองอยู่ตลอดเวลาเพื่อความอยู่รอดและมีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการที่สามารถนำมาใช้แยกเซลล์และนำมาใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์แต่ละเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ โดยที่ไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมเซลล์ก่อนศึกษาที่ซับซ้อน และเป็นอุปกรณ์ที่สามารถให้สภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสมใกล้เคียงกับธรรมชาติที่ล้อมรอบเซลล์ที่จะศึกษาให้มากที่สุด อีกทั้งสามารถทำให้ผู้ศึกษาเฝ้าติดตามเซลล์ได้ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์จึงเป็นหลักการที่สำคัญ ซึ่งวิธีที่มีความสอดคล้องต่อเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วมากที่สุดในปัจจุบันก็คือ การใช้เทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) มาช่วยในการศึกษาเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวนั่นเอง ซึ่งเทคโนโลยีนี้เป็นการเทคนิคเชิงวิศวกรรมชีวภาพที่ใช้หลักการทางฟิสิกส์ ในการควบคุมการไหลและพฤติกรรมต่างๆที่เกิดจากคุณสมบัติภายในของของไหล (fluid) ในระดับจุลภาค (microscale) ลงไป (Sackmann et al., 2014)

โดยปกติในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์นั้นจะมีขบวนการหลักที่สำคัญอยู่ 4 ขั้นตอน ที่ผู้วิจัยต้องดำเนินการได้แก่ การเก็บตัวอย่างเซลล์ (cell sampling) การคัดแยกและจัดเรียงเซลล์ (cell sorting) ด้วยคุณสมบัติต่างๆของเซลล์ การดักจับและคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ (cell trapping) และการเตรียมเซลล์ก่อนศึกษา (cell treatment) ซึ่งในปัจจุบันพบว่าได้มีการใช้เทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาคมาประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมขั้นตอนต่างๆเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น Kasukurti และคณะ (2011) สามารถทำการแยกเซลล์ที่มีขนาดต่างกัน โดยการบังคับให้เซลล์จัดเรียงเซลล์และเคลื่อนที่ต่อเนื่องมาที่ละเซลล์ โดยใช้ระบบของไหลจุลภาคเป็นตัวควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ มีรายงานแสดงให้เห็นถึงการนำเทคนิคระบบของไหลจุลภาคมาใช้แยกเซลล์ออกจากกันและเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ รวมทั้งสามารถนำเซลล์ชนิดที่สองมาเข้าสู่ (conjugation) กับเซลล์ที่แยกไว้ ซึ่งเป็นวิธีการที่สำคัญที่ใช้ศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในเรื่องของปฏิกริยาและการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-to-cell interaction and communication) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์ที่มาสัมผัสกัน (Lecault et al., 2012) เป็นต้น

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าการพัฒนาระบบของไหลจุลภาคมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์นั้นมีข้อดีหลายประการ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเทคนิคนี้ยังเป็นเทคนิคที่ยังอยู่ในระหว่างการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและยังเป็นเทคนิคที่ยังใหม่มากสำหรับประเทศไทย ทำให้องค์ความรู้สำหรับเทคนิคด้านนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่พอสมควร ดังนั้นการเริ่มต้นศึกษาเทคนิคของไหลจุลภาคจึงถือเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีและสำคัญสำหรับงานวิจัยทางชีวภาพในประเทศไทย โดยความรู้ความเข้าใจในเทคนิคนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยาของเซลล์ได้อย่างกว้างขวางต่อไปได้เป็นอย่างดีในอนาคต อย่างไรก็ตามพฤติกรรมของของไหลในระบบของไหลจุลภาคในอุปกรณ์ของไหลจุลภาคหนึ่ง อาจจะมี ความแตกต่างกันกับที่เกิดขึ้นในอุปกรณ์อีกอันหนึ่งถึงแม้ว่าจะนำมาใช้ในวัตถุประสงค์เดียวกัน ดังนั้นการนำต้นแบบของอุปกรณ์ของไหลจุลภาคที่มีรายงานอยู่แล้วจากการศึกษาของผู้วิจัยคนอื่นๆ อาจจะทำให้ได้รับผลการศึกษาที่ไม่เหมาะสมกับงานที่ศึกษาอยู่ได้ ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้จึงจำเป็นต้องมีการปรับแต่งตัวแปรที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสมกับงานแต่ละงาน โดยสามารถออกแบบต้นแบบของอุปกรณ์ชิ้นใหม่หรือปรับแต่งจากต้นแบบเดิมที่เคยถูกศึกษามาก่อนก็ได้ เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับงานที่กำลังศึกษาอยู่

จากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดสิ่งที่สำคัญที่สุดในขั้นแรกก็คือการพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่สามารถควบคุมการไหลของเซลล์ด้วยระบบของไหลจุลภาค ที่สามารถทำให้เซลล์เกิดจัดเรียงตัวเป็นสายกระแสการไหลของเซลล์ (cellular stream line) ตามขนาดและสามารถทำให้แต่ละสายการไหลแยกออกมาจากกันได้อย่างถูกต้องจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในลำดับแรกๆของการศึกษาเซลล์ ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการควบคุมการไหลของเซลล์ในระบบของไหลจุลภาคและทำให้เซลล์เกิดการเรียงตัวเป็นสายกระแสการไหลนั้น จำเป็นต้องอาศัยการประยุกต์ความรู้ทางฟิสิกส์ของของไหลที่ไหลอยู่ในท่อรูปแบบต่างๆเข้ากับความรู้ทางชีววิทยาของเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การไหลของของไหลในท่อโค้งระดับจุลภาค (curvilinear microchannel) นั้นจะให้ผลดีในการทำให้เซลล์จัดเรียงตัวและไหลเป็นสายตามขนาดของเซลล์ ซึ่งหลักการขั้นพื้นฐานเกิดจากของไหลในท่อเหล่านั้นจะต้องมีรูปแบบการไหลเป็นแบบราบเรียบและเป็นชั้นๆ (laminar flow) และจะต้องไม่มีแรงภายนอก (external force) ใดๆ มากระทำกับของไหลนั้นๆนอกจากแรงเนื่องจากความดันที่ใส่เข้าไปในระบบเท่านั้น ซึ่งความดันที่ใส่เข้าสู่ระบบจะทำให้เกิดการไหลของทั้งของไหลที่เป็นตัวกลางและส่งผลให้เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลเคลื่อนที่ด้วยแรงเฉือน (shear force) และเมื่อของไหลไหลผ่านบริเวณโค้งจะส่งผลให้เกิดสนามหมุนวนของแรงตามแนวหน้าตัดของท่อ ดังนั้นเมื่ออนุภาคในของไหลเดินทางมาถึงสนามหมุนวนนี้ แรงในสนามหมุนวนจะผลักให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าหาผนังของท่อระดับจุลภาค และเมื่อเซลล์เข้าใกล้ผนังท่อแล้วผนังของท่อจุลภาคก็จะส่งแรงผลักมากระทำต่อเซลล์เพื่อให้เซลล์ออกจากผนัง ซึ่งความสมดุลของแรงทั้งสองจะส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ตำแหน่งที่เกิดความสมดุลของแรงทั้งสองที่จุดใดจุดหนึ่งขึ้นกับขนาดของเซลล์หรืออนุภาค และทำให้เซลล์หรืออนุภาคที่มีขนาดเดียวกันจะมาอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน และเคลื่อนตัวตามกันเป็นสายกระแสการไหลได้ (Di Carlo et al., 2007; Kuntaegowdanahalli et al., 2009; Lee et al., 2010)

ด้วยเทคโนโลยีในปัจจุบันของระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) นั้นสามารถทำให้นักวิจัยสามารถสร้างอุปกรณ์ที่ใช้ดักจับเซลล์ (cell trapping) ให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงระดับจุลภาค (microwell) ซึ่งจากนี้ไปใน

รายงานนี้จะเรียกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีขนาดเพียง 20-60 μm ได้ ซึ่งอุปกรณ์ต้นแบบเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์อย่างทันทีต่อสารสื่อ (mediator) ที่กระตุ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (phenotype) ที่มีความแตกต่างกันของเซลล์ซึ่งอยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกันได้อย่างชัดเจน ภายใต้สภาวะเงื่อนไขทางชีววิทยาที่สามารถควบคุมได้ตามต้องการทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ระบบ microfluidics-microwell ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้บ่อยครั้งในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต่างๆในปัจจุบันเช่น การสร้าง embryoid body หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ microfluidics-microwell คือความสามารถของอุปกรณ์ในการดักจับเซลล์ให้ได้ครวละมากๆ (high throughput cell trapping) และทำให้หลุมเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ 1 ช่องสามารถบรรจุเซลล์ได้เพียง 1 เซลล์และยังมีพื้นที่เพียงพอที่จะให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวได้ (Park et al., 2010) รวมทั้งมีความง่ายในการบันทึกภาพผลการทดลอง (imaging capacity) ซึ่งปัญหาเหล่านี้จึงยังเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ระบบ microfluidics-microwell สำหรับศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ ที่จำเป็นต้องได้รับการพัฒนาต่อไป

โครงการย่อยที่ 1

การสร้างอุปกรณ์ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบที่ประยุกต์ความรู้เชิงฟิสิกส์ของระบบของไหลจุลภาคมาควบคุมการไหลของสารแขวนลอยของโพลีเมอร์ชนิดโพลีสไตรีน (polystyrene polymer) และทำให้เม็ดโพลีเมอร์มีการเคลื่อนที่เป็นสายกระแสการไหลตามขนาดของโพลีเมอร์ และแยกออกจากกันตามขนาดได้อย่างถูกต้อง โดยองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบอุปกรณ์ในระบบการไหลจุลภาคที่ใช้ในการคัดแยกเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัข ให้ถูกจัดเรียงออกมาในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆต่อไปได้

ขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วย

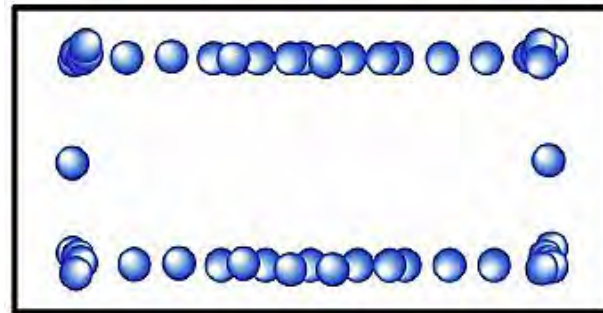
- 1.1. การออกแบบอุปกรณ์
- 1.2. การจำลองการทำงานของอุปกรณ์
- 1.3. การสร้างอุปกรณ์
- 1.4. การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์แบบ ณ เวลาจริง
- 1.5. การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่จัดเก็บได้จากอุปกรณ์

1.1.การออกแบบลักษณะทางเรขาคณิตของท่อโค้งระดับจุลภาค (geometrical design of curved microchannel)

วัสดุและวิธีดำเนินการ

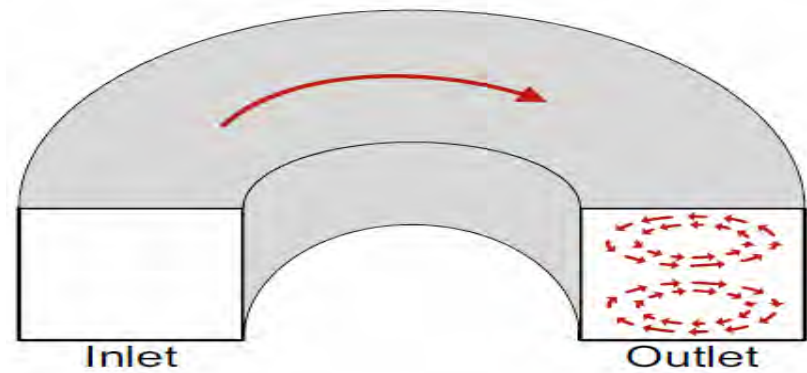
เป็นการคำนวณเพื่อหาขนาดความกว้าง ความสูง รวมทั้งจำนวนโค้งที่เหมาะสมสำหรับของตัวอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค ที่สามารถเหนี่ยวนำให้อนุภาคโพลีเมอร์แต่ละขนาดสามารถจัดเรียงตัวเป็นสายกระแสได้ ซึ่งค่าปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการจัดเรียงตัวจะถูกนำมาใช้ในการคำนวณ โดยถูกดัดแปลงจากการศึกษาโดย Di Carlo และคณะ ในปี 2007 และ Kuntaegowdanahalli และคณะในปี 2009 (Di Carlo et al., 2007; Kuntaegowdanahalli et al., 2009) มาประยุกต์ใช้ ซึ่งในการออกแบบอาศัยหลักการคือ เมื่ออนุภาคที่มีการเคลื่อนที่ ด้วยแรงเฉือนจากการไหลของของไหลในช่องระดับจุลภาค ที่มีการรูปแบบความเร็วในการไหล (velocity profile) ของของไหลมีลักษณะเป็นแบบพาราโบลา (parabolic flow) และมีการไหลแบบราบเรียบเป็นชั้นๆ (laminar flow) โดยชั้นตรงกลางจะมีความเร็วการไหลของของไหลสูงสุด (U_{max}) จะส่งผลให้เกิดแรงชนิดหนึ่งจากผนังท่อกระทำต่ออนุภาคขึ้นมา เรียกว่าแรงยก (Lift force) โดยในท่อตรงที่มีภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (rectangular channel) และมีอัตราส่วนของความกว้างต่อความสูงมากๆ (low-aspect-ratio (Width >>

Height) rectangular micro-channel) นั้นพบว่าแรงดังก้าวจะกระทำกับอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในของไหลถูกผลัก และทำให้อนุภาคถูกจัดเรียงออกไปตามแนวขอบทั้งสองด้านของหน้าตัดของท่อ โดยทำให้อนุภาคอยู่ห่างจากผนังของท่อในระยะทางหนึ่งๆ (Bhagat et al., 2008) ดัง รูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของอนุภาคในของไหลจัดเรียงตัวออกไปตามแนวขวางต่อหน้าตัดของท่อโดยแรงยก และผลักให้อนุภาคอยู่ห่างจากผนัง ภายในท่อสี่เหลี่ยมผืนผ้า (ที่มา: ดัดแปลงจาก Bhagat et al., 2008)

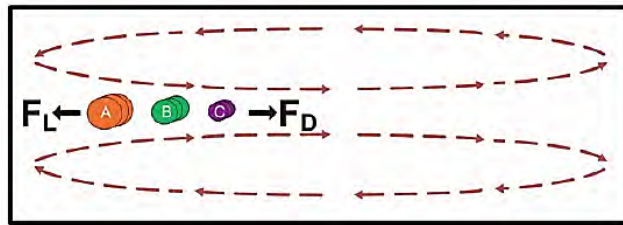
เมื่อของไหลเกิดการไหลในท่อสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีลักษณะโค้ง (curved rectangular microchannel) นั้น ในขณะที่ของไหลไหลผ่านโค้งจะส่งผลทำให้เกิดสนามการไหลแบบหมุนวน (rotational flow field) ตามแนวภาคตัดขวางตามหน้าตัดของท่อในบริเวณรอยโค้งที่ผนังด้านบนและด้านล่างของท่อ เรียกว่า กระแสหมุนวนของดีน (Dean vortex) ดัง รูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงให้เห็น Dean cortices ที่เกิดขึ้นเมื่อของไหลไหลผ่านโค้ง ซึ่งกระแสหมุนวนดังกล่าวจะทำให้เกิดแรงชนิดหนึ่งเรียกว่าแรงของดีน (Dean force) เกิดขึ้นต่ออนุภาคเมื่ออนุภาคเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสหมุนวนนี้ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Kuntaegowdanahalli et al., 2009)

เมื่อมีอนุภาคไหลมาถึงกระแสหมุนวนดังกล่าว จะส่งผลให้อนุภาคที่แขวนลอยอยู่มีการเคลื่อนที่อยู่ในสนามหมุนวน และสนามหมุนวนดังกล่าวจะทำให้เกิดแรงชนิดหนึ่งเรียกว่าแรงของดีน (Dean force หรือ F_D)

เกิดขึ้นและกระทำต่ออนุภาค ซึ่งแรงนี้เป็นแรงฉุดลาก (drag force) ที่ทำให้อนุภาคเคลื่อนที่เข้าสู่ผนังท่อ เมื่ออนุภาคเคลื่อนที่เข้าใกล้ผนังด้านข้างก็จะถูกแรงจากผนังส่งมากระทำต่ออนุภาค โดยจะผลักอนุภาคให้ออกห่างจากผนังท่อ อนุภาคก็จะเคลื่อนที่อยู่ในสนามการไหลจนจนกว่าจะถึงตำแหน่งหนึ่งในท่อเมื่อวัดจากผนังท่อที่อนุภาควิ่งเข้าหาที่ ที่เป็นตำแหน่งของสมดุลแรงทั้งสองที่กระทำต่ออนุภาค (Kuntaegowdanahalli et al., 2009) โดยพบว่าตำแหน่งที่เกิดความสมดุลของแรงทางด้านข้างทั้งสองต่อตัวอนุภาคนั้นจะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคเป็นหลัก และอนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะมีตำแหน่งสมดุลอยู่ใกล้กับผนังด้านในของท่อ ส่วนอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าจะอยู่ใกล้กับจุดกึ่งกลางท่อมักกว่า (Russom et al., 2009) ดัง รูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงสนามการไหลหมุนวนของดิน ที่กระทำต่ออนุภาคและตำแหน่งต่างๆของอนุภาคที่เกิดความสมดุลของแรง ส่งผลให้อนุภาคขนาดเดียวกันมาอยู่ในตำแหน่งสมดุลเดียวกัน (ที่มา: ดัดแปลงจาก Kuntaegowdanahalli et al., 2009)

ซึ่งจากหลักการดังกล่าวนี้ทำให้เห็นว่า ตำแหน่งของสมดุลของเซลล์ในแต่ละขนาดจะขึ้นกับสมดุลของแรงที่สำคัญสองแรง ซึ่งเป็นตัวกำหนดขนาดของสนามการวนของดิน (Kuntaegowdanahalli et al., 2009; Russom et al., 2009) คือ

1. แรงของดิน (F_D) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$F_D = 3\pi\mu U_{Dean} a_p = 5.4 \times 10^{-4} \pi \mu D e^{1.63} a_p$$

เมื่อ

- F_D คือแรงของดิน
- μ คือค่าความหนืดของของไหล (Fluid Viscosity)
- U_{Dean} คือค่าความเร็วเฉลี่ยของดิน (Dean-average velocity) มีค่าประมาณ

$$U_{Dean} = 1.8 \times 10^{-4} D e^{1.63}$$

- a_p คือ ขนาดของอนุภาค
- De คือหมายเลขของดิน (Dean Number) ซึ่งหาได้จาก

$$De = \frac{\rho U_m D_h}{\mu} \sqrt{\frac{D_h}{2R}} = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}}$$

- U_m คือ ความเร็วสูงสุดของของไหล (U_{max})
- D_h คือเส้นผ่านศูนย์กลางทางชลศาสตร์ของท่อซึ่งหาได้จาก

$$D_h = \frac{2(W \times H)}{(W + H)}$$

เมื่อ

W คือความกว้างของหน้าตัด

H คือความสูงของหน้าตัด แต่ในกรณีของท่อสี่เหลี่ยมผืนผ้าสามารถใช้ความสูงของหน้าตัดของท่อ (H) แทนค่า D_h ได้

R คือรัศมีของท่อวัดจากจุดศูนย์กลางไปยังผนังด้านนอกของท่อวงรอบสุดท้าย

R_e คือหมายเลขของเรย์โนลด์ (Reynold Number) ซึ่งในของไหลระบบจุลภาคจะมีค่าอยู่ระหว่าง $1 < R_e < 50$ (Kuntaegowdanahalli et al., 2009)

2. แรงยก(ผลึก) ของผนัง (F_L) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$F_L = \rho G^2 C_L a_p^4$$

เมื่อ

F_L คือแรงของผลึก (ยก)

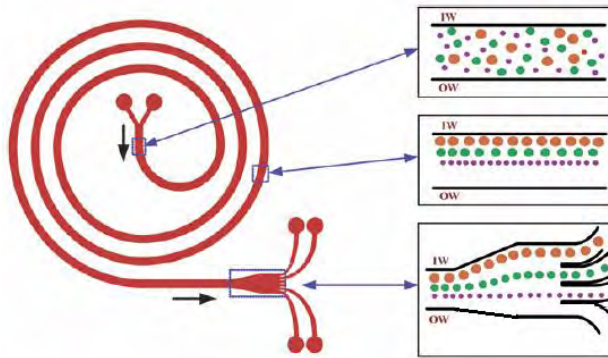
P คือความหนาแน่นของของไหล

G คืออัตราความเฉือนของของไหล (Shear rate) ซึ่งหาได้จาก

$$G = \frac{U_m}{D_h}$$

C_L คือสัมประสิทธิ์แรงยก (ผลึก) ด้านข้าง (Lift Coefficient) ซึ่งเป็นฟังก์ชันของตำแหน่งตามขวางของอนุภาค และเลขเรย์โนลด์ (Reynold Number หรือ R_e)

ดังนั้นจากหลักการดังกล่าวข้างต้น จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการคำนวณและออกแบบอุปกรณ์ ที่ใช้ในการจัดเรียงเม็ดโพลีเมอร์ที่มีขนาดเดียวกัน ให้มาเรียงตัวต่อเนื่องกันเป็นสายกระแสนิ่งของแต่ละขนาดได้ โดยทำการออกแบบให้ท่อสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีการขดโค้ง โดยมีลักษณะเป็นรูปคล้ายกันหอยและมีท่อทางปลายทางออกตามตำแหน่งที่เป็นระยะห่างที่วัดจากผนังด้านในของท่อไปหาจุดกึ่งกลางของท่อเซลล์ โดยแต่ละจุดคาดว่าจะเป็นที่เซลล์ขนาดจะเข้าสู่สมดุลของแรง ซึ่งระยะห่างเหล่านี้จะได้อาจมาจากการคำนวณและจำลองแบบ ซึ่งดัดแปลงมาจาก Kuntaegowdanahalli และคณะ (2009) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงถึงลักษณะของท่อที่ทำการคำนวณและออกแบบ รวมทั้งภาพจำลองของการจัดเรียงตัวของอนุภาคในตำแหน่งต่างๆที่ควรจะเกิดขึ้น(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kuntaegowdanahalli et al., 2009)

และเพื่อเป็นการลดความแปรผันและการรบกวนขององค์ประกอบต่างๆ ในการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการกำหนดปัจจัยต่างๆให้อยู่ในลักษณะคงที่ได้แก่ ค่าความหนาแน่นและความหนืดของของไหลให้ใกล้เคียงกับน้ำ และมีค่า ค่าตัวเลขของเรย์โนลด์ (Re) อยู่ที่ 15 และมีความสูงของท่ออยู่ที่ 130 ไมโครเมตร มีความกว้างเท่ากับ 500 μm และมีระยะห่างระหว่างวงรอบ (interspace) ที่อยู่ติดกันอยู่ที่ 500 μm โดยมีรัศมีรวมของความโค้งของท่อทั้งหมดอยู่ที่ 10 มิลลิเมตรซึ่งจะทำให้มีอัตราส่วนของขนาดของอนุภาคแต่ละขนาดต่อความสูงของท่อ (a_p/H) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.07 เพื่อการแยกที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Bhagat et al., 2008; Kuntaegowdanahalli et al., 2009) ส่วนค่าความเร็วของการไหลสูงสุด (U_m) จะถูกทำให้มีค่าคงที่โดยการใช้ความดันที่คงที่ที่ผลิตจากเครื่อง โดยมีอัตราการไหล (flow rate) อยู่ที่ 1 มิลลิลิตรต่ออนาที (ml/min) และค่าตัวเลขของเรย์โนลด์ซึ่งค่าสูงสุดมีค่าไม่เกิน 15 ตามที่กำหนดไว้ ดังนั้นค่าคงที่และตัวแปรนี้ทั้งหมดจะถูกคำนวณและแทนที่ในสมการ แล้วนำไปสร้างเป็นแบบพิมพ์เขียวก่อนที่จะนำไปสร้างเป็นอุปกรณ์ต้นแบบในขั้นตอนต่อไป

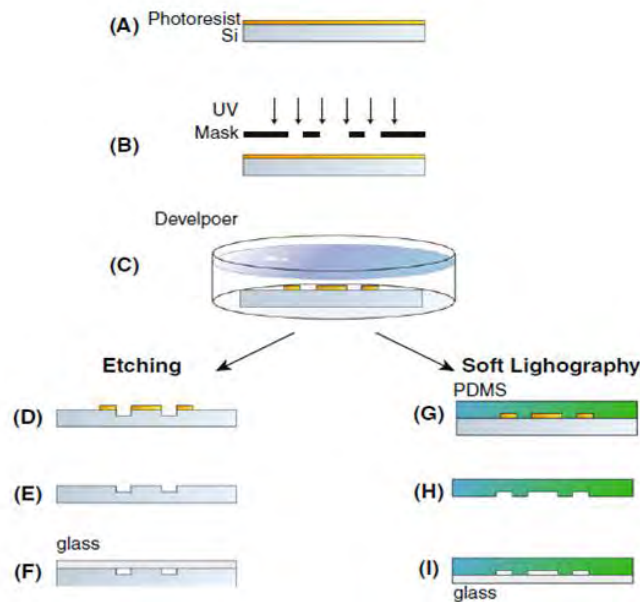
1.2 การจำลองการทำงานของอุปกรณ์ (simulation)

ในการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการจำลองการไหลในท่อโดยในการศึกษาจะทำการจำลองความเป็นไปได้ในการเกิดที่จะเกิดการไหล และผลของแรงต่างๆ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ COMSOLTM Multiphysics (Comsol, USA) รุ่น 5.1

1.3 การสร้างอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาต้นแบบ (device fabrication)

เป็นขั้นตอนที่นำต้นแบบที่ได้รับการออกแบบไว้ และทำการวิเคราะห์การไหลด้วยโปรแกรมจำลองการไหลแล้ว มาทำการสร้างเป็นตัวอุปกรณ์ด้วยวิธี soft lithography โดยแบบร่างที่สร้างไว้จะถูกถ่ายแบบลงบนแผ่นเวเฟอร์ (wafer) ที่ใช้สำหรับออกแบบอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดวงจรรวม (integrated circuit หรือ IC) ด้วยวิธี photoresist หลังจากนั้นจะถูกกัดเซาะให้เกิดร่อง (etching) ซึ่งจะได้แม่พิมพ์สำหรับสร้างชิ้นงานขึ้นมา หลังจากนั้นจะใช้โพลีเมอร์ poly-dimethyl siloxane (PDMS) ที่มีความยืดหยุ่นและใสแบบกระจกเทลงบนแม่พิมพ์ เมื่อ

PDMS แข็งตัวจะถูกลอกออกจากแม่พิมพ์และนำไปประกบลงบนสไลด์แก้วที่สะอาดและถูกเชื่อมติดกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน (oxygen plasma) ดัง รูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนของการทำ soft lithography สำหรับสร้างอุปกรณ์ต้นแบบจาก PDMS

1.3.1 การศึกษาการไหลและการจัดเรียงตัวเป็นสายกระแสการไหลตามขนาดของเม็ดโพลีเมอร์ (polystyrene bead)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ เม็ดโพลีเมอร์ ที่มีขนาดใกล้เคียงโดยประมาณกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 2 ขนาดคือ 10 μm และ 15 μm ทำหน้าที่แทนเซลล์มะเร็งชนิดกลม และใช้เม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 5 μm ซึ่งเป็นขนาดที่เป็นค่าวิกฤติ (critical size) ที่โพลีเมอร์จะไม่จัดเรียงเป็นสายกระแส โดยที่เม็ดโพลีเมอร์ ที่ใช้จะมีขนาดเท่ากันทุกอนุภาคตามขนาดที่กำหนดมาจากโรงงานผู้ผลิต สารแขวนลอยของเม็ดโพลีเมอร์จะประกอบด้วย 100 μl ของ เม็ดโพลีเมอร์ แต่ละขนาดที่ถูกแขวนลอยใน 10% glycerin buffer จำนวน 20 ml และสารแขวนลอยจะถูกขับเคลื่อนโดยใช้ปั๊มอัตโนมัติที่ใช้สำหรับกระบอกฉีดยา (automatic syringe pump) ขนาด 25 ml เป็นตัวให้กำเนิดความดันที่คงที่โดยมีอัตราการไหล (flow rate) อยู่ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและการเคลื่อนไหวของสายกระแสการไหลแต่ละสายจะถูกสังเกตผล และถูกบันทึกภาพเคลื่อนไหวด้วยกล้องบันทึกภาพระบบดิจิทัลตรงบริเวณช่องทางออกรวม (common outlet) และอนุภาค polystyrene ที่ออกมาจากช่องทางออกย่อย (outlet port) แต่

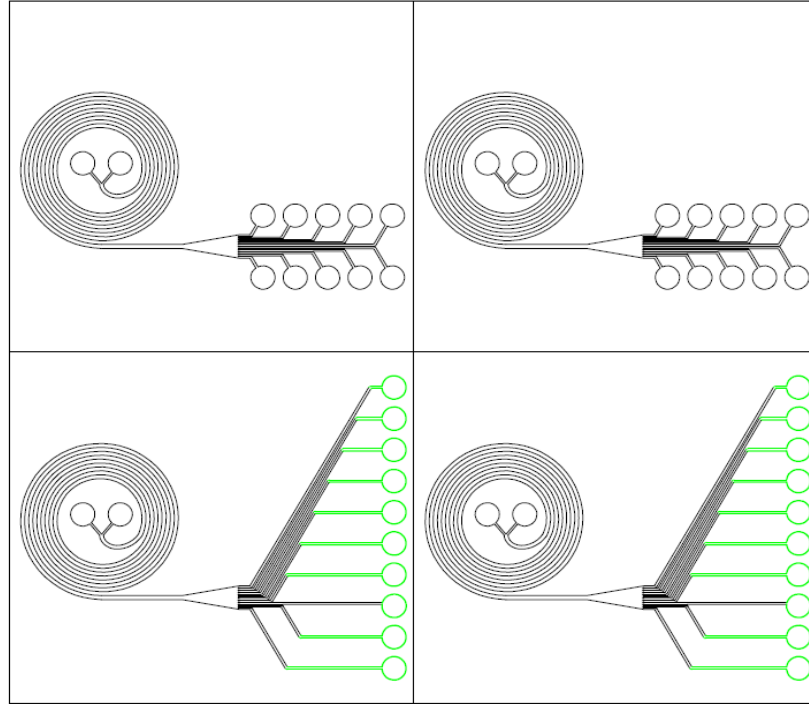
ละช่องจะถูกเก็บไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 ml เพื่อนำไปวัดขนาดด้วยวิธี Flow cytometry เพื่อยืนยันความถูกต้องในการคัดแยกต่อไป

การวัดขนาดเม็ดโพลีเมอร์ ด้วย Flow cytometry

เพื่อยืนยันความถูกต้องในการทำงานของอุปกรณ์ต้นแบบ ในการแยกเม็ดโพลีเมอร์ตามขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ออกจากกัน เม็ดโพลีเมอร์ในแต่ละช่องย่อยที่เก็บได้จะนำไปผ่านเครื่อง Flow cytometer โดยก่อนที่จะทำการวัดขนาดอนุภาคที่ศึกษาจะใช้สารแขวนลอยมาตรฐานที่มีเม็ดโพลีเมอร์ ขนาดมาตรฐานหลายๆขนาด (3.4, 5.11, 7.4, 10.3, 14.5 μm ตามลำดับ) ที่ใช้สำหรับ Flow cytometry ที่ใส่ผสมกันมาในหลอดเดียวกันจำนวน 300 μl ไหลผ่านเข้าสู่เครื่อง Flow cytometer เพื่อทำการสร้างค่ามาตรฐานของเม็ด bead แต่ละขนาดว่าจะอยู่ในตำแหน่งใดของรูปกราฟแบบจุด (dot plot) หลังจากนั้นเมื่อได้ค่าที่อ่านได้จะทำการสร้างของเขตมาตรฐาน (gating) ของ bead แต่ละขนาดขึ้นเพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิง จากนั้นนำตัวอย่างของอนุภาค polystyrene ที่เก็บได้ในแต่ละช่องออกย่อยจำนวนอย่างละ 300 μl ไหลผ่านเข้าเครื่อง Flow cytometer ทำการบันทึกผลเป็นรูป dot plot ของแต่ละหลอด แล้วทำการอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดโพลีเมอร์ แต่ละขนาดที่เกิดขึ้นว่าอยู่ในบริเวณใดของบริเวณมาตรฐานที่กำหนดไว้ก็จะทำให้ทราบขนาดของเม็ดโพลีเมอร์ได้

ผลการทดลอง

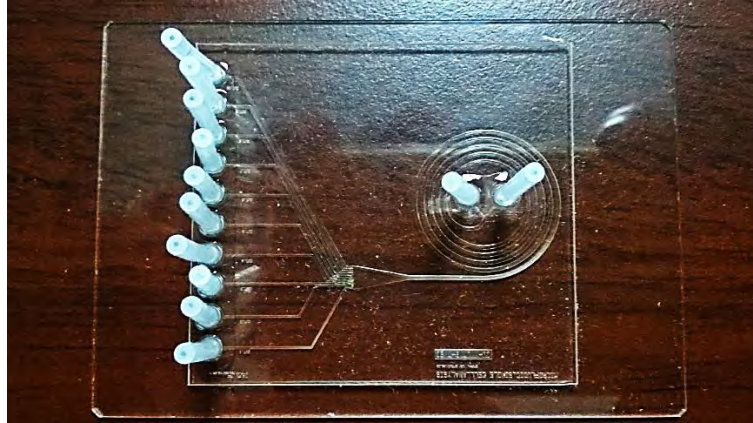
ผลการออกแบบ เมื่อนำค่าปัจจัยต่างๆตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มาทำการคำนวณและออกแบบด้วยระบบคอมพิวเตอร์โดยใช้ซอฟต์แวร์ AutoCAD (Autodesk, USA) ในการเขียนแบบ ผลลัพธ์ที่ได้ทำให้ได้แผนภาพพิมพ์เขียว (blueprint) ของอุปกรณ์ต้นแบบ ดังรูปที่ 6 โดยพบว่าถ้าใช้แผ่นซิลิกอนขนาด 6 นิ้ว จำนวน 1 แผ่นจะสามารถบรรจุอุปกรณ์ได้ 4 ชิ้น



รูปที่ 6 แสดงแบบพิมพ์เขียวที่นำไปใช้สร้างแม่พิมพ์สำหรับสร้างอุปกรณ์

1.4 ผลการสร้างอุปกรณ์ และการติดตั้งอุปกรณ์สำหรับทำการศึกษา

ด้วยวิธี soft lithography ทำให้สามารถสร้าง (fabrication) อุปกรณ์ต้นแบบ โดยใช้สารโพลีเมอร์ประเภท polydimethylsiloxane (PDMS) สำหรับสร้างเป็นโครงของอุปกรณ์ต้นแบบได้สำเร็จ โดยเมื่อนำแผ่นซิลิกอนมาสร้างแม่พิมพ์ตามแบบพิมพ์เขียวที่สร้างขึ้นตามวิธีที่กำหนดไว้และทำการกัด (etching) ลายของท่อต้นแบบที่อยู่ภายในแล้ว หลังจากนั้นนำ PDMS มาเทลงบนแม่พิมพ์และเมื่อ PDMS แห้งและแข็งตัว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที PDMS จะถูกลอกออกจากพิมพ์ และถูกเชื่อมต่อกับฐานที่เป็นแผ่นกระจกสไลด์ด้วย oxygen plasma และจะได้อุปกรณ์ของระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยมีลักษณะ ดังรูปที่ 7



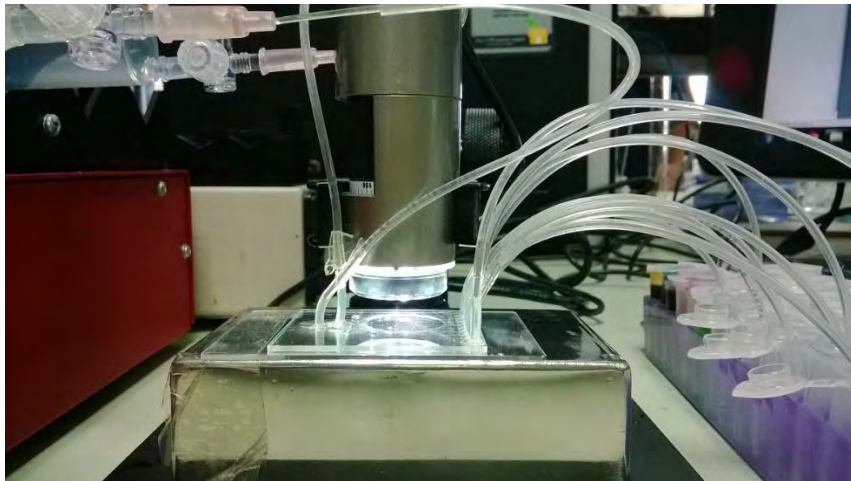
รูปที่ 7 แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้น

ซึ่งลักษณะของอุปกรณ์ประกอบไปด้วยท่อเข้า (inlet) จำนวน 2 ท่อ สำหรับสารแขวนลอยเม็ดโพลีเมอร์ 1 ท่อและท่อทางเข้าสำหรับสารละลายปัฟเฟอร์ จำนวน 1 ท่อ ช่องทางเดินของของไหลจะมีหน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า และมีการขดเป็นวงกลมจำนวน 5 รอบ โดยมีระยะห่างระหว่างรอยโค้ง (interspace) ที่อยู่ติดกันเท่ากับ $500\ \mu\text{m}$ ขนาดของช่องจะมีขนาดความกว้างเท่ากับ $500\ \mu\text{m}$ และมีความสูงเท่ากับ $130\ \mu\text{m}$ ที่ปลายท่อของวงรอบสุดท้ายจะถูกขยายออกเป็นท่อทางออกรวม (common outlet) ขนาดกว้าง $20\ \text{mm}$ ก่อนจะต่อสู่ท่อทางออกย่อย (outlet port) จำนวน 10 ท่อ โดยระยะห่างแต่ละท่อจะตรงกับระยะห่างที่สายของอนุภาคแต่ละสายจะเกิดการรวมตัวเป็นสายกระแสและไหลออกมาตามที่คำนวณได้ก่อนหน้า ภายหลังจากสร้างอุปกรณ์ต้นแบบเสร็จสิ้นแล้ว ก็จะนำอุปกรณ์ต้นแบบที่ได้ไปติดตั้งเข้ากับปั๊มอัดโนมัติ และทำการทดสอบการทำงานโดยใช้สารแขวนตะกอนของเม็ดโพลีเมอร์ polystyrene แต่ละขนาด จะถูกผสมรวมกันและแขวนลอยในสารละลาย 10% glycerin ในน้ำกลั่น ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงการติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับปั๊มอัตโนมัติเพื่อทดสอบการทำงาน

ผลการทดลองที่ได้จะถูกบันทึกด้วยกล้องดิจิทัล ที่ถูกติดตั้งอยู่บนเหนืออุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค ดังรูปที่ 9 และภาพการทดลองที่ได้จะถูกบันทึกตรงบริเวณช่องทางออกร่วม (common outlet) และถูกประมวลผลด้วยไมโครคอมพิวเตอร์ ดังรูปที่ 10



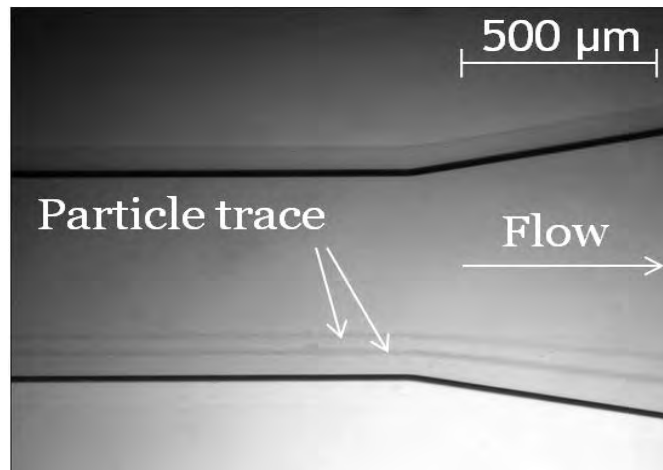
รูปที่ 9 แสดงวิธีการติดตั้งกล้องดิจิทัลเพื่อบันทึกผลการทดลองในขณะทำงานจริง



รูปที่ 10 แสดงการติดตั้งอุปกรณ์ และ ประมวลผลภาพที่ได้จากการศึกษาบนเครื่อง ไมโครคอมพิวเตอร์

ผลการแยกเม็ดโพลีเมอร์ตามขนาด

จากการทดลองในการทำการแยกอนุภาคของเม็ดโพลีเมอร์ที่มีขนาด 10 and 15 μm ซึ่งผสมรวมกันอยู่ พบว่า อุปกรณ์ต้นแบบที่สร้างขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพในการที่จะทำให้อนุภาคโพลีเมอร์ทั้งสองขนาดนั้น แยกออกจากกันเกิดเป็นสายการไหล (streamline) ตามขนาดของอนุภาคแต่ละขนาดได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 11 โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้อัตราการไหลอยู่ที่ 1 mL/min

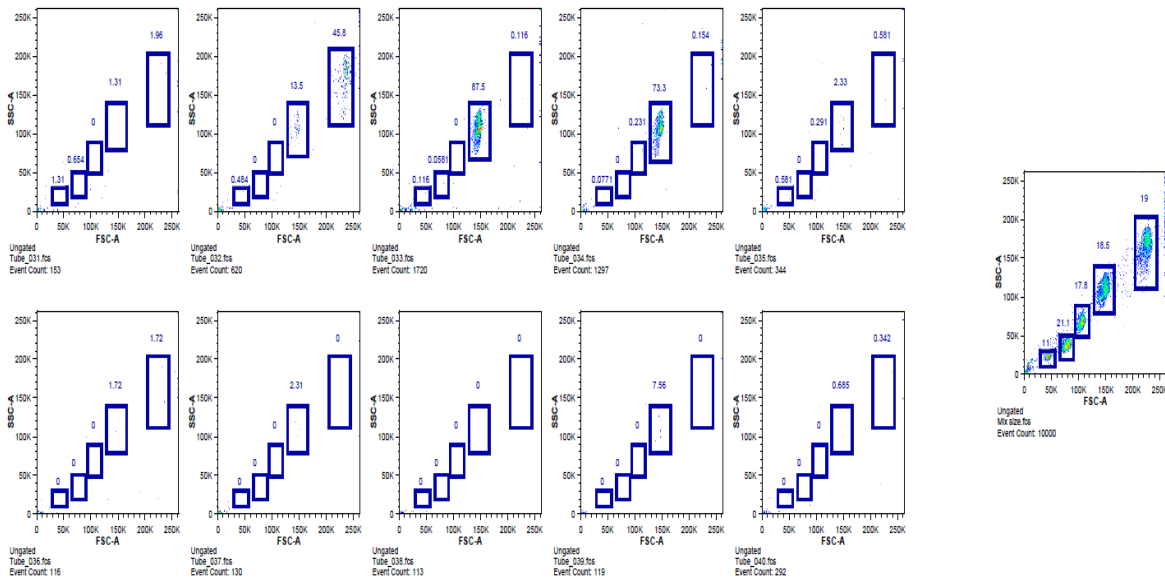


รูปที่ 11 แสดงให้เห็นการเกิดการรวมตัวกัน (focusing) ของอนุภาคขนาด 10 และ 15 ไมโครเมตร เกิดเป็นสายการไหล (streamline) จำนวน 2 เส้นที่แยกออกจากกันตามขนาดของอนุภาคอย่างชัดเจน

โดยพบว่า มีสายกระแสของเม็ดโพลีเมอร์ในสายแรก จะอยู่ใกล้กับของผนังด้านในของท่อจุลภาคและไหลออกทางช่องออกย่อยที่ 2 ซึ่งคาดว่าเป็นสายกระแสที่เกิดจากการรวมตัวกันของเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 15 μm

ในขณะที่สายกระแสที่สองคาดว่าเกิดจากการรวมตัวกันของเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm โดยสายกระแสของอนุภาคนี้อยู่ในตำแหน่งถัดขึ้นมาด้านบนเข้าสู่แนวตรงกลาง (center) ของท่อและไหลออกทางช่องออกย่อยที่ 3 และ 4

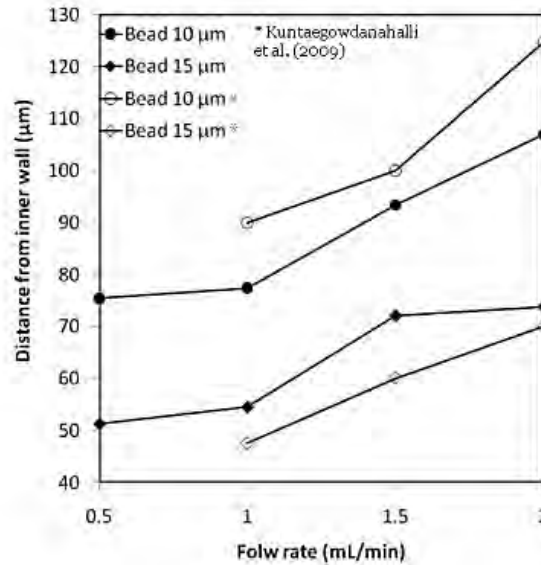
เมื่อนำเอาอนุภาคที่เก็บได้ในแต่ละช่องทางออกย่อยไปทำการวัดขนาดด้วยวิธี Flow cytometry จะพบว่า ในหลอดตัวอย่างที่ 2 ที่ต่อกับช่องย่อยที่ 2 จะพบกลุ่มของอนุภาคขนาด 15 μm รวมกลุ่มกันอยู่ และในหลอดตัวอย่างที่ 3 และ 4 จะพบกลุ่มของเม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 μm รวมตัวกันอยู่ โดยขนาดของอนุภาคที่วัดได้จะเทียบกับขนาดของเม็ดโพลีเมอร์มาตรฐานที่ผสมปนกันมาหลายขนาด ซึ่งถูกผลิตออกมาในรูปสารแขวนลอยเชิงพาณิชย์ (commercial bead suspension) ที่ใช้กับ Flow cytometry ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงผลการวัดขนาดเม็ดโพลีเมอร์ ที่ถูกเก็บจากช่องออกย่อยในแต่ละช่อง ด้วยวิธี Flow cytometry โดยภาพแถวบนจะเป็นผลจากช่องทางออกย่อยที่ 1-5 และภาพแถวล่างจะเป็นผลจากช่องทางออกย่อยที่ 6-10 และภาพขวากลางจะเป็นค่าอ้างอิงที่ได้จากการวัดขนาดของเม็ดโพลีเมอร์มาตรฐานที่ผสมรวมกันที่ใช้สำหรับ Flow cytometry จากภาพจะเห็นได้ว่า อนุภาค polystyrene ขนาด 15 μm จะไหลออกมาทางช่องออกย่อยที่ 2 ในขณะที่อนุภาคโพลีเมอร์ขนาด 10 μm จะออกมาทางช่อง 3 และ 4 ตามลำดับ

เมื่อทำการวัดระยะห่างระหว่างสายกระแสของอนุภาคกับผนังด้านในท่อแต่ละสาย เทียบกับค่ามาตรฐานที่ได้ถูกรายงานไว้ในการศึกษาโดย Kuntaegowdanahalli และคณะ (2009) ซึ่งใช้อุปกรณ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น ภายใต้เงื่อนไขที่ใกล้เคียงกันจะพบว่า ระยะห่างของสายกระแสของอนุภาคที่ได้จากการ

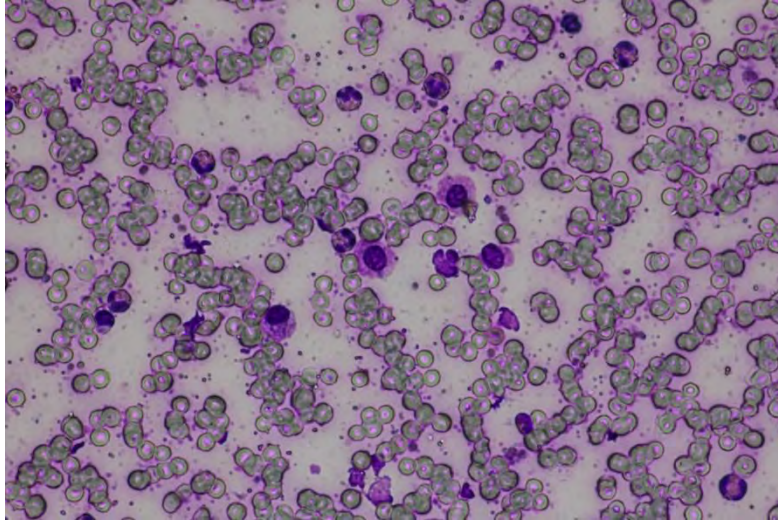
ทดลองในครั้งนี้ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับค่าอ้างอิง โดยพบว่าระยะห่างของสายกระแสของอนุภาคขนาด 15 μm ที่อัตราการไหล 1 mL/min จะอยู่ที่ 45 mm และของอนุภาคขนาด 10 μm จะอยู่ที่ 75 mm เมื่อเทียบกับค่าอ้างอิงจะอยู่ที่ 52 และ 90 mm ตามลำดับ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงให้เห็นระยะห่างระหว่างสายกระแสการไหลของอนุภาคทั้งสองสายที่เกิดขึ้นในการทดลองเทียบกับค่ามาตรฐานที่รายงานไว้โดย Kuntaegowdanahalli และคณะ (2009)

1.5 การทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ และควมมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการผ่านอุปกรณ์คัดแยกเซลล์มะเร็ง

เก็บตัวอย่างก้อนเนื้ออกชนิดเซลล์กลมในสุนัข การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่าง เนื้ออกมาสต์เซลล์ในสุนัข โดยการเก็บก้อนเนื้ออกสด จากห้องผ่าตัดของโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก้อนเนื้ออกดังกล่าวได้รับการตรวจกรองโดยวิธีการเจาะดูดเซลล์จากก้อนเนื้ออก (fine needle aspiration, FNA) และย้อมด้วยสี Wright's giemsa และวินิจฉัยโดยพยาธิสัตวแพทย์ เป็นก้อนเนื้ออกมาสต์เซลล์ในสุนัข ดังรูปที่ 14 (อัจฉริยา ไสละสูต, 2556; Sailasuta et al., 2014) ก้อนเนื้ออกจากสุนัขป่วยได้รับอนุญาตจากเจ้าของสุนัขให้นำมาศึกษาวิจัยได้



รูปที่ 14 เซลล์วิทยาของเซลล์มะเร็งที่ผิวหนังของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ รูปร่างกลมภายในมีแกรนูลติดสีชมพูอมม่วง เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15-20 μm สีจิมซ่า (กำลังขยาย 200 X)

ตัวอย่างก้อนเนื้ออกมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังของสุนัขชนิดที่เก็บได้นั้น ตัดเป็นชิ้นขนาด น้ำหนักประมาณ 1 กรัม (ขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร) ย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยกระบวนการย่อยเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยเอนไซม์ Trypsin (trypsinization ; 0.25% Trypsin in 0.01% EDTA ใน 500 μl PBS) ทำการบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 % Fetal calf Serum (FCS) ปริมาณ 1 ml จากนั้นเซลล์มะเร็งจะถูกนำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เพื่อแยกเซลล์มะเร็งให้บริสุทธิ์ ทำการล้างด้วย PBS และปั่นแยกอีก 2 ครั้ง จากนั้น ย้อมเซลล์มะเร็งด้วย Eosin Methylene Blue (EMB) เพื่อตรวจลักษณะของเซลล์

ทำการประเมินคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตอยู่ โดยการย้อมสี Vital dye 2 ชนิด ได้แก่ 1) 0.4 % Trypan blue (Hyclone TM, GE Healthcare Life Science, USA) 2) 500 μl ของ Tetramethyl rhodamine Methylene ester (Thermo Fisher Scientific, TMRM) in PBS ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการย้อมในที่ปลอดแสง เพื่อตรวจหา DNA ตรวจการติดสีด้วย spectrophotometer ทำการนับจำนวนเซลล์ก่อนเริ่มทำการทดลองด้วย hemocytometer เซลล์มะเร็งจะถูกทำให้เป็นสารละลายแขวนลอยด้วย น้ำกลั่น (Di water) สัดส่วน 1:100 และบรรจุสารละลายเซลล์มาสต์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร และต่อเข้ากับอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคจึงเริ่มดำเนินการทดลอง โดยใช้ syringe pump เพื่อดูสารละลายเซลล์มาสต์แขวนลอยเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.1 ml/hr ต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ชั่วโมง ทำการสังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ได้ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการชะล้างเซลล์แขวนลอยที่ค้างค้างอยู่ในระบบออกจนหมดด้วยสารละลาย PBS โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.01 ml/min

ผลการทดสอบ

จากนั้นสารแขวนลอยซึ่งมีเซลล์มะเร็ง มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเซลล์ที่ 4.16×10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร จากการทดสอบ 3 ครั้งในอุปกรณ์คัดแยกเซลล์มะเร็ง พบเซลล์มะเร็งอยู่ที่ ขนาด 10-20 μm จำนวนเซลล์ที่ได้ ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นประมาณร้อยละ 50.18 (ครั้งที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 50.46 , ครั้งที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 50.63 และครั้งที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 49.44 ตามลำดับ) จากการทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดยใช้ สี Trypan blue พบว่า การมีชีวิตอยู่ของเซลล์เนื้องอกชนิดเซลล์กลมในสุนัข ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 25-30

สรุปและวิจารณ์ผลโครงการย่อยที่ 1

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidic-based device) ที่สามารถนำมาใช้แยกเม็ดโพลีเมอร์ที่มีขนาดต่างกันออกจากกันได้ โดยอุปกรณ์ที่ได้จะประกอบไปด้วยท่อสำหรับของไหลที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของท่ออยู่ที่ 130 μm มีความกว้างเท่ากับ 500 μm ท่อทั้งหมดจะขดเป็นรูปวงกลมจำนวน 5 วง และมีระยะห่างระหว่างวงรอบ (interspace) ที่อยู่ติดกันอยู่ที่ 500 μm โดยมีรัศมีรวมของความโค้งของท่อทั้งหมดอยู่ที่ 10 มิลลิเมตร และมีอัตราส่วนของขนาดของอนุภาคที่ใช้ศึกษาต่อความสูงของท่อ (a_p/H) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.07 การทำให้การแยกที่เกิดขึ้นเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก โดยอุปกรณ์นี้จะต่อกับท่อทางเข้าจำนวน 2 ท่อ ซึ่งท่อแรกจะต่อสารแขวนลอยของอนุภาค และอีกด้านหนึ่งจะต่อกับน้ำกลั่น โดยสารแขวนลอยและน้ำกลั่นจะถูกฉีดเข้าสู่อุปกรณ์โดยปั๊มอัตโนมัติ ที่ปลายของท่อรอบสุดท้ายจะมีลักษณะขยายออกโดยมีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่ 2 mm และต่อเข้ากับช่องออกย่อยจำนวน 10 ช่อง โดยในการศึกษานี้จะใช้อัตราการไหลอยู่ที่ 1 ml/min

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า อุปกรณ์ในระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพที่จะสามารถทำให้เกิดการการแยกเม็ดโพลีเมอร์ ที่มีขนาดแตกต่างกันและปนกันอยู่ด้วยกันออกจากกันได้ โดยเกิดเป็นกระแสการไหลของเม็ดโพลีเมอร์แยกกันจำนวน 2 เส้นตามขนาด โดยเส้นแรกเกิดจากเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 15 μm ในขณะที่เส้นที่สองที่อยู่ด้านบนของสายกระแสเส้นแรกจะเกิดจากเม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm ซึ่งความถูกต้องของขนาดของเม็ดโพลีเมอร์ ที่แยกได้จะถูกยืนยันโดยวิธี Flow cytometry ซึ่งจากการทดลองพบว่า เม็ดโพลีเมอร์ที่เก็บได้ในหลอดที่ 2 จะมีขนาด 15 μm และที่หลอดที่ 3 และ 4 จะมีขนาด 10 μm การที่เม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 μm นั้น สามารถออกสู่ทางออกที่ 3 และ 4 ได้ทั้งสองช่องอาจเป็นเพราะว่า ลักษณะของช่องทางออกที่ 3 อาจจะมีลักษณะที่สั้นกว่าช่องที่ 4 จึงทำให้มีอนุภาคส่วนหนึ่งสามารถหักเลงสู่ช่องทางออกย่อยที่สั้นกว่า หรืออาจจะเกิดเนื่องจากการค้างอยู่ของอนุภาคภายในท่อที่ใช้ต่อช่องทางออกย่อย ซึ่งใช้ท่อเดิมจากการทดลองครั้งก่อน นอกจากนี้จากการวัดระยะห่างของสายการไหลของอนุภาคจากขอบผนังด้านใน ของแต่ละสายพบว่า ระยะห่างที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รายงานไว้โดย Kuntaegowdanahalli และคณะ (2009)

การประยุกต์วิธีการไหลและคัดแยกเม็ดโพลีเมอร์ นำมาศึกษาในเซลล์เนื้อเยื่อชนิดกลมในสุนัข หรือมาสต์เซลล์ พบว่าขนาดของมาสต์เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 μm และมากกว่าพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะออกมาตามท่อที่ได้ทำจำลองการไหลและแยกเซลล์ด้วยเม็ดโพลีเมอร์ แสดงว่าแรงที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกับเม็ดโพลีเมอร์ อย่างไรก็ตามพบว่ามีการเกาะของเซลล์ตามท่อเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปฏิกิริยาของเยื่อหุ้มเซลล์กับวัสดุท่อ มีการเกาะติดรวมทั้งเซลล์มีชีวิตจะมีคุณสมบัติการจับกันเป็นกลุ่ม (aggregation) และการพบเซลล์เซลล์ (debris) ในสารแขวนลอย สอดคล้องกับผลของเซลล์ที่ออกมาจากท่อที่มีจำนวนลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง รวมทั้งร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากผ่านอุปกรณ์แยกเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 30 เนื่องจากแรงเหวี่ยงในท่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสมดุลย์ ซึ่งควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการทำงาน และผลกระทบของเซลล์ในท่อต่อไป

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาคั้งนี้น่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับคัดแยกเซลล์ต่างๆได้ อย่างไรก็ตามเพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการคัดแยกและแปรผล ยังมีความจำเป็นต้องปรับปรุงช่องทางออกย่อย เพื่อให้เกิดการไหลของเซลล์แต่ละขนาดแยกออกสู่ช่องทางออกที่ถูกต้องได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โครงการย่อยที่ 2

การสร้างอุปกรณ์ดักจับเซลล์มะเร็งด้วยระบบของไหลจุลภาค

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การศึกษาในขั้นแรกนั้นเริ่มจากการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคที่มีหลุมเพาะเลี้ยงอยู่ที่พื้นของอุปกรณ์เพื่อใช้ดักจับอนุภาครวมถึงเซลล์ จะอาศัยหลักการทำงานของระบบของไหลจุลภาค (microfluidics) ที่อยู่บนพื้นฐานของพลศาสตร์ของของไหล (hydrodynamic) ซึ่งขบวนการดังกล่าวจะเป็นการคัดแยกแบบ passive ซึ่งจะไม่มีการใช้สนามของแรงจากภายนอก (external force field) มาเป็นตัวบังคับการเคลื่อนที่ของเซลล์ลงหลุมเพาะเลี้ยง แต่จะอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ภายในของของไหล (internally physical property) เป็นปัจจัยในการพาเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดปัญหาของอิทธิพลของแรงจากสนามภายนอกที่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และให้เซลล์มีชีวิตอยู่

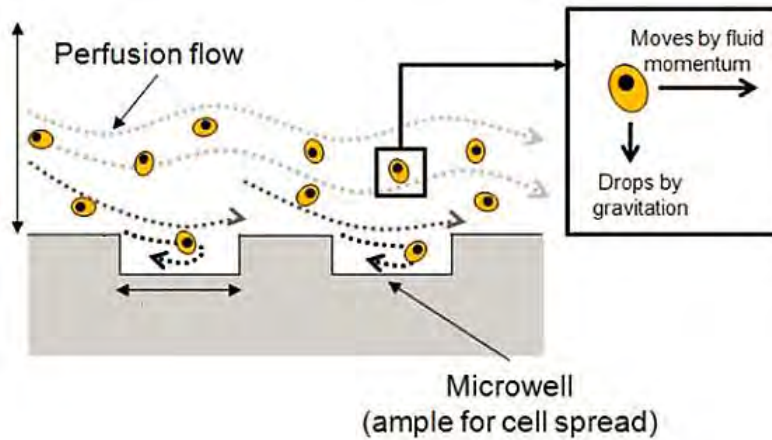
ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้

- 2.1 การออกแบบอุปกรณ์
- 2.2 การจำลองการทำงานของอุปกรณ์
- 2.6 การสร้างอุปกรณ์
- 2.4 การตรวจสอบการทำงานของอุปกรณ์แบบ ณ เวลาจริง
- 2.5 การตรวจสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่จับเก็บได้จากอุปกรณ์

2.1. การออกแบบอุปกรณ์ (geometrical design of microwell)

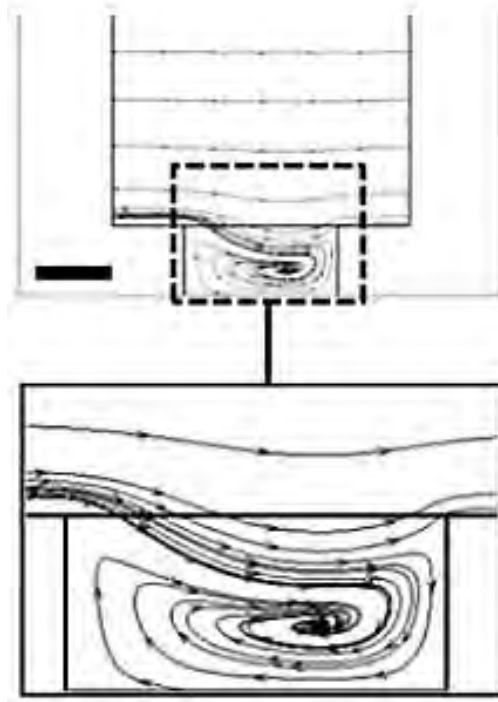
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ซึ่งหลักเกณฑ์ในการออกแบบนั้นจะกำหนดว่า การไหลของของไหลตัวกลาง (fluid medium) ภายในท่อของอุปกรณ์ที่ออกแบบจะมีลักษณะการไหลแบบจัดเรียงเป็นชั้น (laminar flow) และมีเซลล์ลอยอยู่ในแต่ละชั้นของของไหล ซึ่งเซลล์จะถูกพาให้เคลื่อนที่โดยอาศัยแรงเฉื่อย (inertial force) และโมเมนตัมของโมเลกุลของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ที่เคลื่อนที่ผ่านเป็นตัวให้กำเนิดแรงที่จะทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนของการไหล และเมื่อปล่อยให้เซลล์เคลื่อนที่ไปด้วยแรงเฉื่อยได้ระยะหนึ่ง เซลล์จะถูกดึงให้ข้ามชั้นการไหลของของไหลตัวกลางตกลงสู่พื้นด้านล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity) ซึ่งหลักการดังกล่าวสามารถสรุปให้เห็นได้ ดัง รูปที่ 15



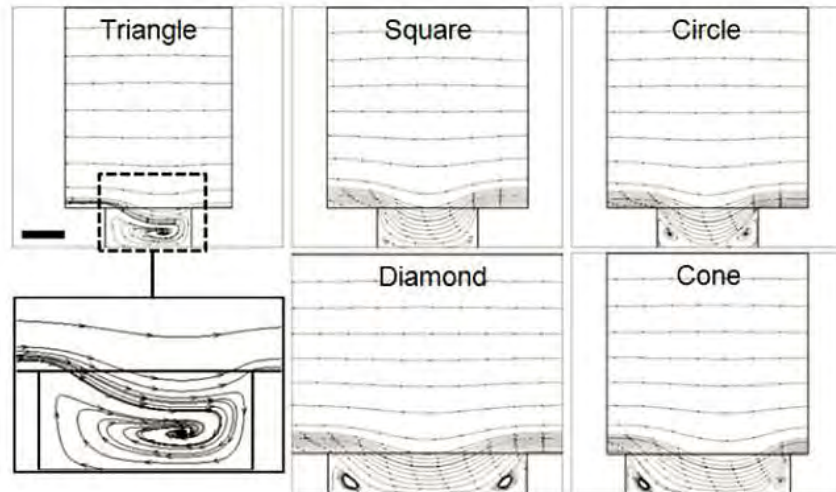
รูปที่ 15 แสดงถึงปัจจัยทางพลศาสตร์ของของไหล (hydrodynamic) ที่สำคัญได้แก่ แรงเฉื่อย (inertial force) และ โมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ที่ทำให้เกิดไหลทั่ว (perfusion flow) ของของไหลตัวกลางและ ผลของแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity) ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่กระจายตัวอยู่ในชั้นการไหลในระดับต่างๆในระบบของไหลจุลภาค (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)

ในการศึกษาของ Park และคณะ (2010) ด้วยการทำการจำลองการไหลของของไหลตัวกลางด้วยคอมพิวเตอร์ (computational simulation) พบว่าภายในหลุมเพาะเลี้ยง (microwell) เมื่อมีของไหลตัวกลางไหลผ่านลงไป จะเกิดการไหลของของไหลตัวกลางมีลักษณะเป็นการเคลื่อนที่แบบหมุนวนอยู่ภายในเรียกว่า recirculation flow ซึ่งการไหลแบบหมุนวนนี้จะสามารถดึงเอาอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่อยู่ในระนาบเดียวกันกับของไหลตัวกลางและอยู่ใกล้ๆปากหลุมเพาะเลี้ยง ที่กระจายตัวอยู่ในระดับชั้นการไหล (flow layer) เดียวกับของไหลตัวกลางที่เกิดการไหลแบบหมุนวนในหลุมเพาะเลี้ยง หรือเป็นเซลล์ตกลงมาสู่ระดับชั้นการไหลดังกล่าวด้วยแรงโน้มถ่วงของโลกไหลเข้าสู่หลุมเพาะเลี้ยงซึ่งหลักการดังกล่าวสามารถสรุปให้เห็นได้ ดังรูปที่ 16 และ 17



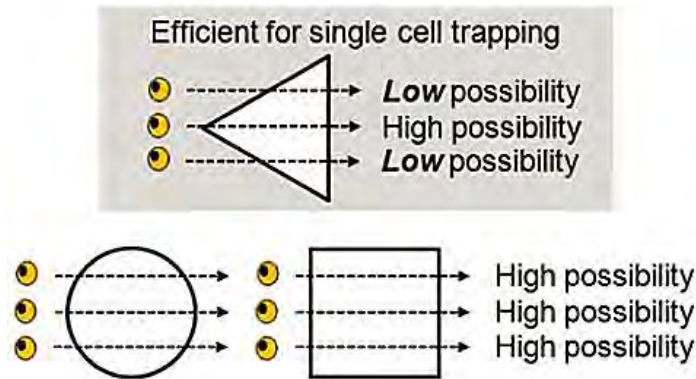
รูปที่ 16 แสดงผลการศึกษาด้วยการจำลองการไหลของของไหลตัวกลางด้วยคอมพิวเตอร์ ที่ศึกษาโดย Park และคณะในปี 2010 ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีของไหลตัวกลางที่มีระดับชั้นการไหลที่อยู่ชิดกับหลุมเพาะเลี้ยงไหล (microwell) และเคลื่อนที่ผ่านหลุมเพาะเลี้ยง ของไหลตัวกลางในระดับชั้นการไหลดังกล่าวจะมีการเคลื่อนที่ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของของไหลตัวกลางมีการเคลื่อนที่แบบหมุนวน (recirculation flow) และส่งผลให้อุณหภูมิและเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆบริเวณหลุมเพาะเลี้ยงนั้นๆไหลลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงได้ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)

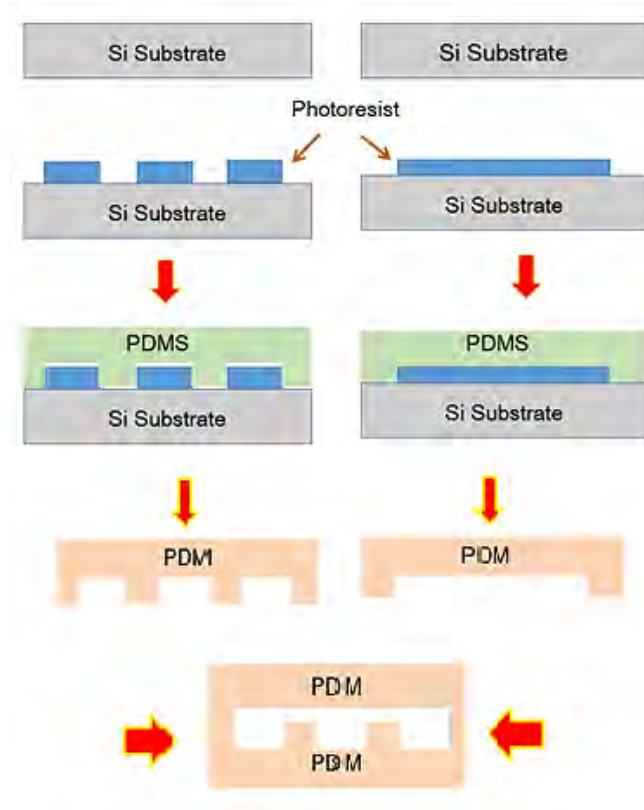
นอกจากนี้ผลจากการศึกษาการจำลองการไหลด้วยคอมพิวเตอร์ของ Park และคณะ (2010) ยังพบอีกว่า ลักษณะทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละรูปแบบ นั้นมีผลต่อความแรงในการเกิดการไหลแบบหมุนวนเวียนของของไหลตัวกลาง (recirculation flow) ภายในหลุมเพาะเลี้ยง ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า หลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงสามเหลี่ยมนั้น จะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางได้แรงที่สุด เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงแบบอื่นๆ เช่น วงกลมหรือสี่เหลี่ยมจัตุรัส ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 แสดงผลการศึกษาของ Park และคณะ ที่ทำการจำลองการเกิดการไหลแบบหมุนเวียนของของไหลตัวกลาง (recirculation flow) ด้วยคอมพิวเตอร์ที่เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิต (geometry) แบบต่างๆ ผลของการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ จะมีผลต่อความแรงในการเกิดการไหลแบบหมุนเวียน โดยที่หลุมเพาะเลี้ยงแบบรูปสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนได้แรงที่สุด เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงอื่นๆ ได้แก่ วงกลม (circle) สี่เหลี่ยมจัตุรัส (square) รูปสามเหลี่ยม (diamond) และรูปกรวย (cone) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Park et al., 2010)

และผลการศึกษาของ Park และคณะ (2010) ยังแสดงให้เห็นอีกว่ารูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงนั้นมีส่วนในการกำหนดประสิทธิภาพของหลุมเพาะเลี้ยงต่อการดักจับอนุภาคและเซลล์ ให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 1: 1 (single trapping efficacy หรือ S.T.E.) โดยพบว่า หลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตแบบสามเหลี่ยมนั้นมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เพียงเซลล์เดียว รวมทั้งป้องกันการไหลของเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์บรรจุอยู่แล้วได้ดีกว่าหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงแบบอื่นๆ ดังแสดงใน รูปที่ 18 ดังนั้นหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม จึงเป็นรูปทรงทางเรขาคณิตที่ถูกเลือกใช้ในการออกแบบอุปกรณ์ของไหลจุลภาคเพื่อใช้ดักจับเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้



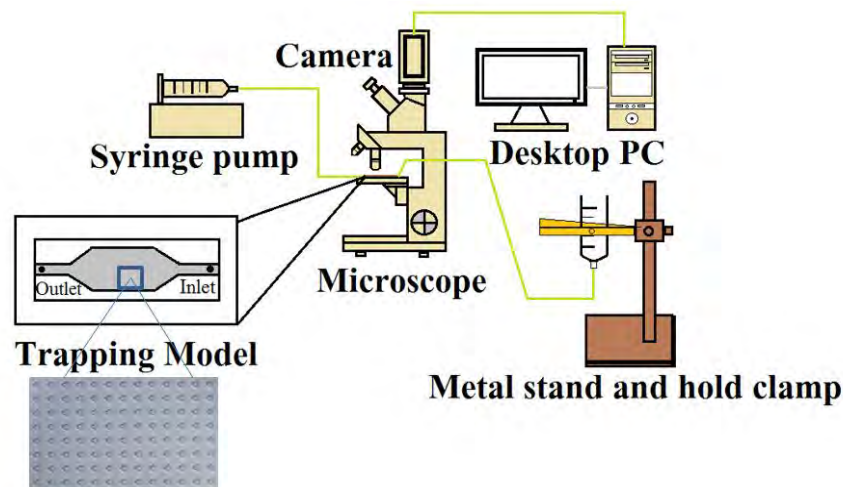


รูปที่ 19 แสดงขั้นตอนในการสร้างและประกอบ (fabrication) อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ดักจับเซลล์ด้วยเทคนิค soft-lithography ซึ่งแม่พิมพ์จะถูกสร้างด้วยแผ่นเวเฟอร์ชนิดซิลิกอน (silicon wafer) ที่ใช้ในการสร้างชิ้นส่วนอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดวงจรรวม (IC) และตัวอุปกรณ์ถูกสร้างด้วยสารโพลีเมอร์ชนิด polydimethyl siloxane (PDMS) และชิ้นส่วนของอุปกรณ์แต่ละส่วนจะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพลาสมาของออกซิเจน (oxygen plasma)

2.4. การตรวจสอบการทำงานและการติดตั้งอุปกรณ์ของไหลจุลภาค (microfluidics-device installation)

อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างขึ้นมาจะถูกเชื่อมต่อเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งจะประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope) (Olympus, Japan) ที่ติดตั้งกล้องบันทึกภาพวิดีโอแบบดิจิทัล (digital video) ที่มีความละเอียด 3 ล้านจุด (3 million pixels) (Motic, China) สำหรับใช้บันทึกภาพการไหลของเซลล์และการดักจับที่เกิดขึ้นภายในอุปกรณ์ และส่งภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์เพื่อทำการประมวลผลภาพ (image processing) โดยที่อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคจะถูกวางลงบนฐานของกล้องจุลทรรศน์ โดยที่ปลายด้านหนึ่งของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุเซลล์ด้วยท่อซิลิโคน (silicone tube) ที่ช่องทางเข้า (inlet) โดยกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์จะถูกยึดไว้กับเสาแขวนในลักษณะตั้งฉากกับพื้น และในส่วนช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับ

กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรด้วยท่อซิลิโคน ที่เชื่อมต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้ (automated syringe pump) รุ่น Fusion-F100 (Chemyx, USA) โดยทำการตั้งค่าให้ปั๊มทำงานเดินถอยหลัง เพื่อดูดของไหลตัวกลางและเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ การติดตั้งระบบเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง สามารถแสดงให้เห็นใน ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 เป็นภาพจำลองแสดงลักษณะการติดตั้งอุปกรณ์ (instrumentation) ที่ใช้ในการทดลองเพื่อดักจับเซลล์ โดยอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างขึ้นมาจะถูกเชื่อมต่อเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง กล้องบันทึกภาพวิดีโอแบบดิจิทัล ชุดเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ทำการประมวลผลภาพ โดยที่อุปกรณ์จะถูกลงบนกล้องจุลทรรศน์และเชื่อมปลายด้านหนึ่งของอุปกรณ์เข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์ และในส่วนของช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่ต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้

2.4.1 การทดสอบอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคในการดักจับเซลล์ (trapping)

2.4.1.1. การทดลองโดยใช้เม็ดโพลีสไรมอร์ (polystyrene bead) เป็นรูปแบบแทนเซลล์

วัสดุและอุปกรณ์

โดยใช้เม็ดโพลีสไรมอร์ขนาด 10 μm เป็นตัวแทนของเซลล์ เพื่อตรวจสอบว่าอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการจะดักจับเซลล์ต่อไป โดยในการทดลองขั้นนี้จะเริ่มจาก การเตรียมสารแขวนลอยของเม็ดโพลีสไรมอร์ขนาด 10 μm ด้วยการผสมสารแขวนตะกอนของเม็ดโพลีสไรมอร์ กับ น้ำกลั่นไม่มีประจุ (deionized water หรือ DI water) และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิด Tween 20 ในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 100: 1: 10 V/ V/ V และสารผสมที่ได้จะถูกนำมาผสมกับสารละลายสีผสมอาหารสีเขียว (Fast green FCF; $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_3\text{Na}_2$)

เพื่อเพิ่มความสามารถในการมองเห็น (visualization) ของอนุภาค สารแขวนตะกอน polystyrene ที่ผสมเรียบร้อยแล้วจะถูกนำไปใส่ไว้ในกระบอกฉีดยาที่เชื่อมต่อกับอุปกรณ์ที่ทางด้านทางเข้า

ก่อนเริ่มทำการทดลอง อุปกรณ์ของไหลจุลภาคจะถูกล้างทำความสะอาดและไล่ฟองอากาศที่คั่งค้างในอุปกรณ์โดยฉีดสารละลายที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำกลั่นไม่มีประจุกับ Tween 20 ในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1: 10 V/V ด้วยอัตราการไหล 0.5 ml/hr โดยฟองอากาศ(ถ้ามี)จะถูกไล่ออกจนหมดจึงเริ่มทำการทดลองและบันทึกผล หลังจากนั้นสารแขวนลอยเม็ดโพลีเมอร์ จะถูกดูดเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหลที่ 0.1 ml/hr อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองเม็ดโพลีเมอร์ ที่คั่งค้างอยู่ในระบบจะถูกล้างออกด้วยสารละลายเดียวกับที่ใช้ทำความสะอาดในตอนต้น ด้วยอัตราการไหล 0.5 ml/hr และทำการไล่ฟองอากาศด้วยวิธีเดียวกันจนฟองอากาศหายไปจากระบบ จากนั้นจึงบันทึกผลการทดลอง ที่บริเวณด้านหน้า ตรงกลาง และด้านหลังของอุปกรณ์ เพื่อดูประสิทธิภาพในการดักจับเม็ดโพลีเมอร์ โดยจะนับที่บริเวณหลุมเพาะเลี้ยงที่มี เม็ดโพลีเมอร์ ถูกดักจับมากที่สุดในแต่ละส่วน โดยนับจากหลุมเพาะเลี้ยงจำนวน 117 หลุม (9 x 13) ต่อหนึ่งพื้นที่

ซึ่งในการวัดประสิทธิภาพในการทำงานของอุปกรณ์ในขั้นที่สามนั้น ภาพของหลุมเพาะเลี้ยงจะถูกแบ่งออกเป็นชุดๆ และถูกกำหนดขอบเขตในการจับภาพของพื้นที่แต่ละชุด เพื่อให้สามารถจับภาพหลุมเพาะเลี้ยงได้ครบทั่วทั้งอุปกรณ์ ก่อนที่จะถูกนำมานับรวมกัน และเพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ถูกดักจับนั้น ตัวอุปกรณ์จะถูกวางบนแผ่นสไลด์ที่มีชุดตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส (grid) ขนาด 1 ตารางมิลลิเมตรวางอยู่ ทำการนับจำนวนของช่องตารางที่ครอบคลุมพื้นที่ของชุดหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมดทั้งด้านแนวนอนและแนวตั้ง โดยใช้กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่ 4X ต่อมาทำการนับจำนวนของหลุมเพาะเลี้ยงที่อยู่ในตารางขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร เพื่อใช้คำนวณหาจำนวนของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมดในอุปกรณ์ 1 ชิ้น โดยใช้กำลังขยาย 100X ซึ่งจำนวนของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมดจะคำนวณได้จาก

$$TNMW = NG_{col} \times NG_{row} \times NMW_{smm}$$

โดยที่

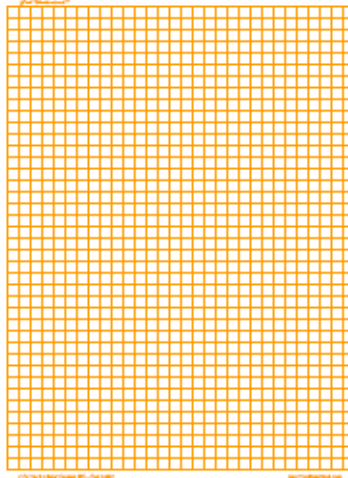
$TNMW$ = จำนวนหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมดในอุปกรณ์ (total number of microwells)

NG_{col} = จำนวนหลักของช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่ครอบคลุมหลุมเพาะเลี้ยงตามแนวตั้งที่ (number of grid columns)

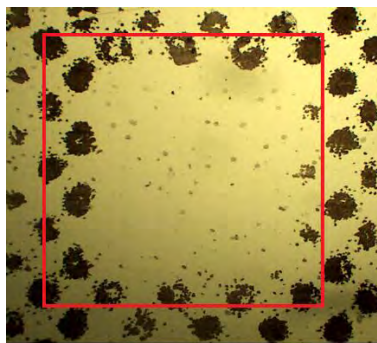
NG_{row} = จำนวนแถวของช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่ครอบคลุมหลุมเพาะเลี้ยงตามแนวนอน (number of grid columns)

NMW_{smm} = จำนวนของหลุมเพาะเลี้ยงในพื้นที่ของสี่เหลี่ยมจัตุรัสใน 1 ตารางมิลลิเมตร (number of microwells in one square millimeter)

ซึ่งลักษณะชุดตารางสีเหลืองจัตุรัสและภาพขยายพื้นที่ที่ใช้กำหนดขอบเขตและถ่ายภาพ สำหรับนับ จำนวนหลุมเพาะเลี้ยงภายในอุปกรณ์ สามารถแสดงให้เห็นได้ ดังรูปที่ 21 และ 22 ตามลำดับ



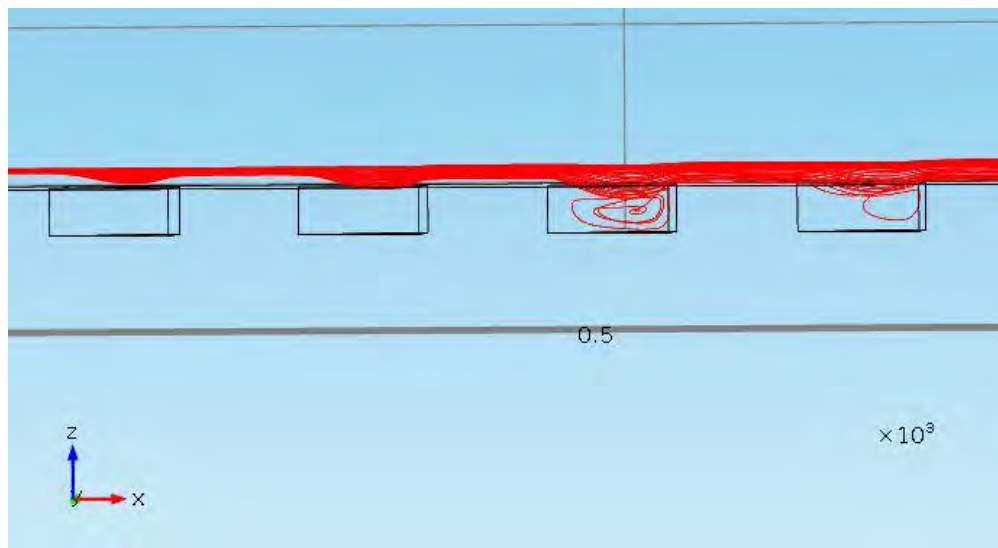
รูปที่ 21 แสดงลักษณะของชุดตารางที่ใช้กำหนดขอบเขตในการนับจำนวน และถ่ายภาพหลุมเพาะเลี้ยง โดยที่ช่อง สีเหลืองจัตุรัสหนึ่งช่องเล็กจะมีพื้นที่ขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร



รูปที่ 22 แสดงขอบเขตของช่องสีเหลืองจัตุรัสขนาด 1 ตารางมิลลิเมตรที่ใช้สำหรับเป็นกรอบอ้างอิง ในการ กำหนดขอบเขตการจับภาพหลุมเพาะเลี้ยง เพื่อใช้คำนวณหาจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด และจำนวนหลุม เพาะเลี้ยงที่มีเซลล์บรรจุอยู่ เพื่อนำมาคำนวณประสิทธิภาพของอุปกรณ์ต่อไป กรอบสีเหลืองสีแดงคือบริเวณที่ใช้ สำหรับนับจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงที่กำลังขยายตัว (40X)

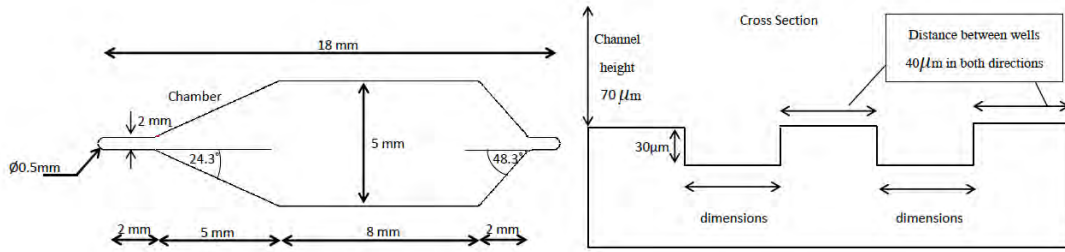
ผลการทดลอง

ผลการจำลองความเป็นไปได้ในการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation flow) ในหลุมเพาะเลี้ยง โดยการใช้โปรแกรม COMSOLTM Multiphysics (Comsol, USA) ทำการจำลองรูปแบบการไหลเพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการเกิดการไหลแบบหมุนวนในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการที่ติดตั้งเซลล์ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง จากการศึกษาพบว่า เมื่อของไหลตัวกลางเคลื่อนที่มาถึงบริเวณพื้นของอุปกรณ์แล้ว ถ้าบริเวณนั้นมี หลุมเพาะเลี้ยงอยู่ ของไหลตัวกลางที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเลี้ยวเบนและไหลลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงและเกิดเป็นการไหลแบบหมุนวนขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยงขึ้น ซึ่งจะสามารถช่วยติดตั้งเซลล์ที่อยู่ในแนวการไหลให้ลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงได้ ลักษณะการเกิดการไหลเวียนแบบหมุนวน สามารถจำลองให้เห็นได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ดังรูปที่ 23



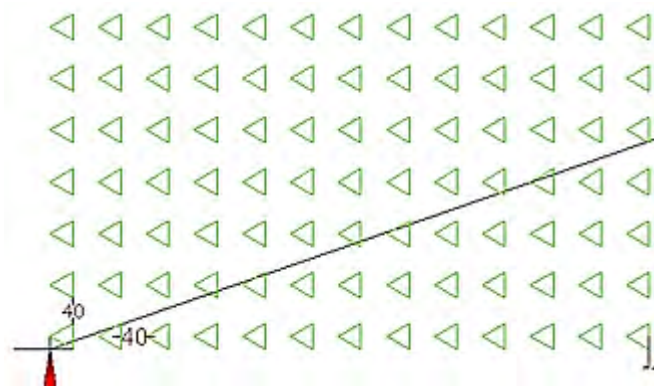
รูปที่ 23 แสดงให้เห็นความเป็นไปได้และลักษณะของการไหลวนของของเหลวตัวกลาง (recirculation flow) ที่เกิดขึ้นในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม ที่ได้จากการจำลองด้วยระบบคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม COMSOLTM Multiphysics

ผลการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ เมื่อได้ทำการจำลองความเป็นไปได้ในการเกิดรูปแบบการไหลวนของของไหลตัวกลางในหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมแล้ว และผลการศึกษาได้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเกิดการไหลแบบหมุนวน ภายใต้ค่าพารามิเตอร์เชิงมิติ (dimensional parameter) ของหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมตามที่กำหนดให้แล้ว จึงได้ทำการออกแบบและเขียนแบบอุปกรณ์โดยใช้ซอฟต์แวร์ AutoCADTM (Autodesk, USA) ในการเขียนแบบ ผลลัพธ์ที่ได้ทำให้ได้แผนภาพพิมพ์เขียว (blueprint) ของอุปกรณ์ต้นแบบ ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงแบบภาพพิมพ์เขียว (blueprint) ที่เขียนแบบด้วยโปรแกรม AutoCAD™ ซึ่งแบบพิมพ์เขียวที่ได้จะนำไปใช้สร้างแม่พิมพ์ซิลิกอน (silicon mold) ที่ใช้สำหรับสร้างและประกอบอุปกรณ์ต่อไป

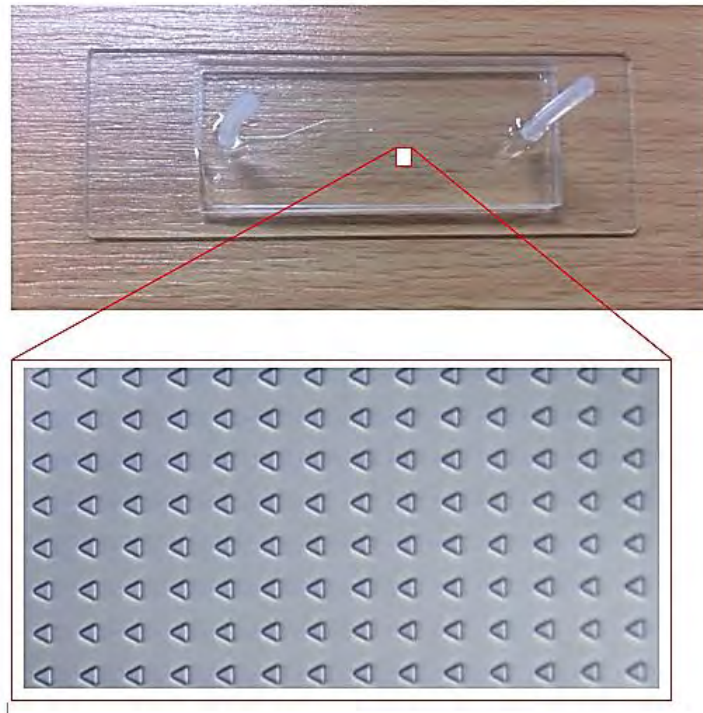
ลักษณะของอุปกรณ์ประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก และทั้งสองส่วนจะถูกเชื่อมติดกันด้วยพลาสติกของออกซิเจน ซึ่งส่วนประกอบหลักทั้งสองส่วนได้แก่ ส่วนที่เป็นช่องทางหลัก (main flow channel) ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องทางเข้าออกของของไหลตัวกลางและเซลล์ โดยทำการลดความสูงจากเดิมที่เคยได้รายงานไว้ในอุปกรณ์ของ Park และคณะ (2010) จาก 160 μm เหลือ 70 μm เพื่อเพิ่มโอกาสให้เซลล์อยู่ระดับชั้นของการไหลของของไหลตัวกลางที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น โดยที่ปลายของช่องหลักด้านหนึ่งจะมีช่องทางเข้าของของไหลตัวกลางและเซลล์ (inlet) จำนวน 1 ช่องซึ่งจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ และช่องทางออก (outlet) จำนวน 1 ช่องซึ่งจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่เชื่อมต่อกับปั๊มอัตโนมัติ และภายในช่องทางไหลหลักจะมีลักษณะเป็นช่องทางเดินของของไหลตัวกลางที่มีลักษณะตามภาคตัดขวางเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ในส่วนที่สองของอุปกรณ์จะเป็นส่วนที่มีชุดของหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยมที่มีการวางตัวต่อกันเป็นแถวยาวและแต่ละแถววางตัวขนานกันไป (microwell array) ซึ่ง โดยแต่ละ หลุมเพาะเลี้ยงในแต่ละแถวจะอยู่ห่างกัน 40 μm และแต่ละแถวก็อยู่ห่างกัน 40 μm เช่นกัน ส่วนขนาดของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุม จะมีความสูงตามแนวระนาบเท่ากับ 40 μm และมีความลึกเท่ากับ 40 μm ตามลำดับ ลักษณะการเรียงตัวของชุดของหลุมเพาะเลี้ยง สามารถแสดงให้เห็นได้ ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 แสดงการเรียงตัวของชุดหลุมเพาะเลี้ยงรูปทรงสามเหลี่ยม (triangular microwell array) ที่อยู่ที่พื้นด้านล่างของอุปกรณ์ ที่ทำหน้าที่ดักจับเซลล์ โดยแต่ละหลุมเพาะเลี้ยงในแต่ละแถวจะอยู่ห่างกัน 40 μm และแต่

ละแวกที่อยู่ห่างกัน $40\ \mu\text{m}$ ส่วนขนาดของหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุมจะมีความสูงตามแนวระนาบเท่ากับ $40\ \mu\text{m}$ และมีความลึกเท่ากับ $40\ \mu\text{m}$ ตามลำดับ

อุปกรณ์ที่สร้างและประกอบขึ้นมาในครั้งนี้ ถูกสร้างขึ้นมาจากด้วยเทคนิค soft lithography โดยใช้สารโพลีเมอร์ประเภท polydimethyl siloxane (PDMS) สำหรับสร้างเป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้สามารถสร้างและประกอบอุปกรณ์ขึ้นมาได้เป็นผลสำเร็จด้วยเทคนิคดังกล่าว และได้อุปกรณ์ที่มีลักษณะดังรูปที่ 26

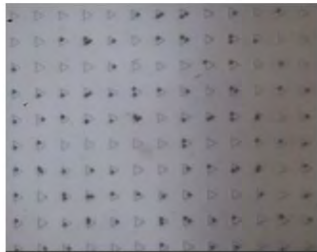


รูปที่ 26 แสดงลักษณะของอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่ถูกสร้างและประกอบขึ้นมา ด้วยเทคนิค soft-lithography ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ โดยภาพขยายจะแสดงให้เห็นถึงชุดของหลุมเพาะเลี้ยงรูปสามเหลี่ยมที่จัดเรียงตัวอยู่ในส่วนที่สองของอุปกรณ์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์

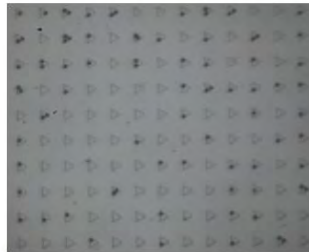
ผลการทดสอบการทำงานของอุปกรณ์ด้วยการดักจับเม็ดโพลีเมอร์

จากการใช้เม็ดโพลีเมอร์ ขนาด $10\ \mu\text{m}$ เพื่อยืนยันในขั้นแรกว่า อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมามีความสามารถในการดักจับอนุภาครวมถึงเซลล์ได้ จากการทดลองพบว่า ที่อัตราการไหลที่ $0.1\ \text{mL/hr}$ จะมีเม็ดโพลีเมอร์ ถูกดักจับลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงที่บริเวณด้านหน้ามากกว่าตรงกลางและด้านหลังของอุปกรณ์ตามลำดับ และที่อัตราการไหลดังกล่าว พบว่าประสิทธิภาพในการดักจับ เม็ดโพลีเมอร์ที่บริเวณด้านหน้าคิดเป็นร้อยละ 63.25 ตรงกลางคิดเป็นร้อยละ 44.44 และด้านหลังคิดเป็นร้อยละ 19.67 ตามลำดับโดยอ้างอิงวิธีการนับประสิทธิภาพของ Park และคณะ (2010) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่แท้จริงออกมาแล้ว โดยเทียบเป็นร้อยละ

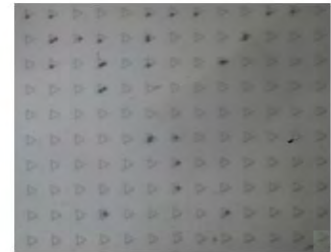
ในการดักจับต่อจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด พบว่าประสิทธิภาพของอุปกรณ์จะอยู่ที่ประมาณร้อยละ 20 ถึงแม้ว่าเม็ดโพลีเมอร์ ที่ถูกดักจับในหลุมเพาะเลี้ยงโดยส่วนใหญ่จะมีจำนวนเม็ดโพลีเมอร์ เพียงอันเดียว แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีหลุมเพาะเลี้ยงหลายๆหลุมที่มีการดักจับเม็ดโพลีเมอร์ ได้มากกว่า 1 อัน อยู่ด้วย ดังรูปที่ 27



Front



Middle



Rear

รูปที่ 27 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นว่ามีความสามารถนำมาใช้ในการใช้ดักจับอนุภาค polystyrene bead ได้ รวมทั้งแสดงลักษณะและประสิทธิภาพการดักจับ polystyrene bead article ในบริเวณต่างๆ ของอุปกรณ์ ได้แก่ ด้านหน้า ตรงกลาง และด้านหลังของอุปกรณ์ ซึ่งการดักจับจะเกิดขึ้นในบริเวณส่วนหน้า มากกว่า ตรงกลาง และ ส่วนท้ายของอุปกรณ์ ตามลำดับ (จุดสีดำแสดง polystyrene bead)

2.4.1.2. การใช้อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคในการดักจับเซลล์เนื้องอกชนิดกลมในสุนัข

การทดลองใช้อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคดักจับเซลล์มาสต์แชนวलय (mast cell tumor suspension)

ก่อนเริ่มทำการทดลอง อุปกรณ์ของไหลจุลภาคจะถูกล้างทำความสะอาดและไล่ฟองอากาศที่ค้างค้างในอุปกรณ์โดยฉีดสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) ที่ผ่านการกรองด้วย filter ขนาด 0.2 μm ด้วยอัตราการไหล 0.5 ml/hr โดยฟองอากาศ (หากมี) จะถูกไล่ออกจนหมดจึงเริ่มทำการทดลองและบันทึกผล หลังจากนั้นเซลล์มาสต์แชนวलयจากก้อนเนื้องอกชนิด mast cell tumor ที่บริเวณผิวหนังของสุนัขจะถูกดูดเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหลที่ 0.1 ml/hr อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองเซลล์แชนวलयที่ค้างค้างอยู่ในระบบจะถูกล้างออกจนหมดด้วยสารละลาย PBS โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.01 ml/min จากนั้นจึงบันทึกผลการทดลอง โดยทำการนับเซลล์ที่บริเวณด้านหน้า ตรงกลาง และด้านหลังของอุปกรณ์ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์

โดยก่อนเริ่มการทดลอง อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคจะถูกจัดเตรียมและติดตั้งเข้ากับระบบควบคุม (control unit) ที่ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง กล้องบันทึกภาพวิดีโอแบบดิจิทัล ชุดเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการประมวลผลภาพ โดยที่อุปกรณ์จะถูกวางลงบนกล้องจุลทรรศน์และเชื่อมปลายด้านหนึ่ง

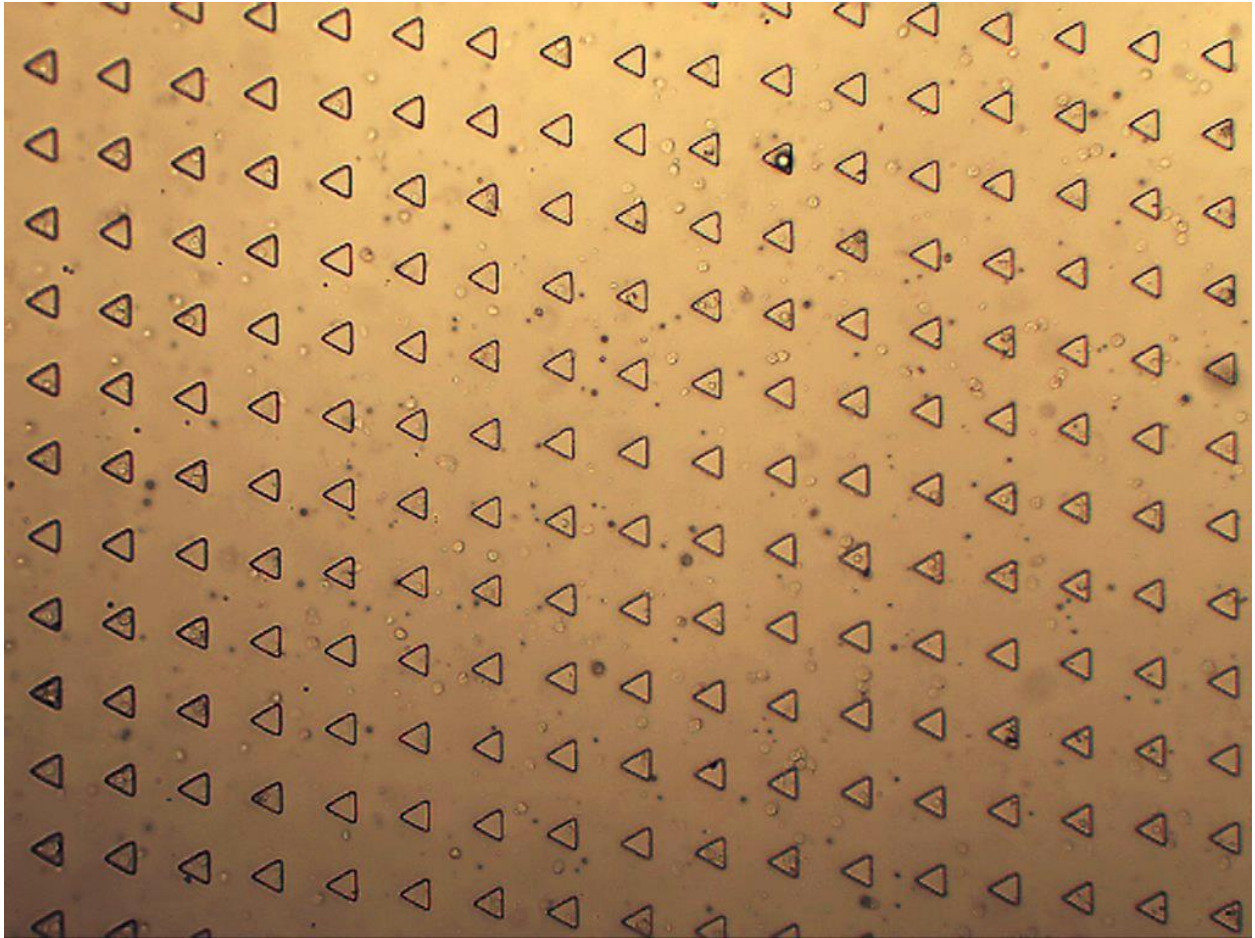
ของอุปกรณ์เข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุเซลล์ และในส่วนของช่องทางออก (outlet) ของอุปกรณ์จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่ต่อเข้ากับระบบปั๊มอัตโนมัติที่สามารถตั้งค่าได้

ตัวอย่างก่อนเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังของสุนัขสดที่เก็บได้นั้น ตัดเป็นชิ้นขนาด น้ำหนักประมาณ 1 กรัม (ขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร) ย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยกระบวนการย่อยเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยเอนไซม์ Trypsin (trypsinization ; 0.25% Trypsin in 0.01% EDTA ใน 500 μ l PBS) ทำการบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 % Fetal calf Serum (FCS) ปริมาณ 1 ml จากนั้นเซลล์มะเร็งจะถูกนำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เพื่อแยกเซลล์มะเร็งให้บริสุทธิ์ ทำการล้างด้วย PBS และปั่นแยกอีก 2 ครั้ง จากนั้น ย้อมเซลล์มะเร็งด้วย Eosin Methylene Blue (EMB) เพื่อตรวจลักษณะของเซลล์

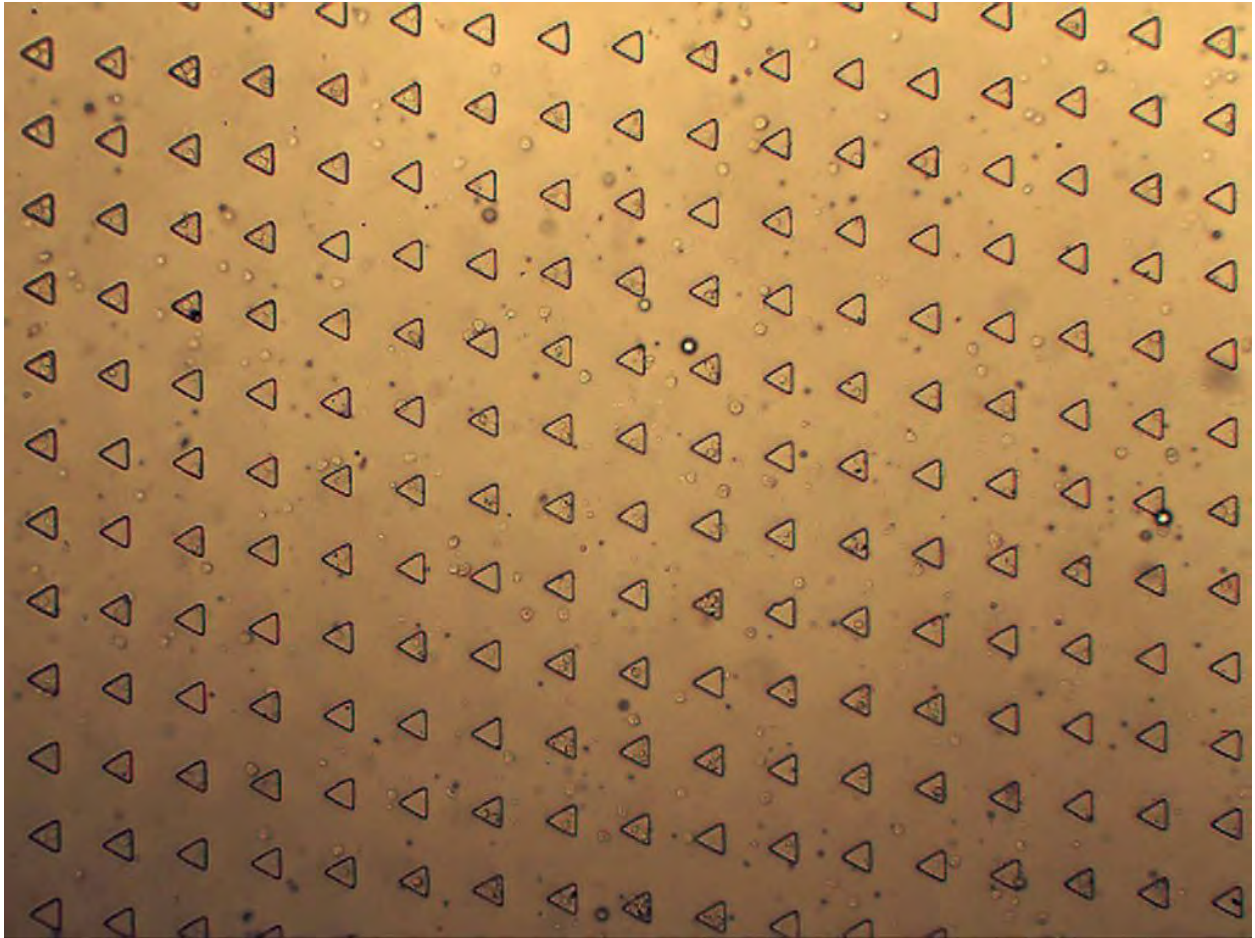
ทำการประเมินคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตอยู่ โดยการย้อมสี Vital dye 2 ชนิด ได้แก่ 1) 0.4 % Trypan blue (Hyclone TM , GE Healthcare Life Science, USA) 2) 500 μ l ของ Tetramethyl rhodamine Methylene Ester (Thermo Fisher Scientific, TMRM) in PBS ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการย้อมในที่ปลอดแสง เพื่อตรวจหา DNA ตรวจการติดสีด้วย spectrophotometer ทำการนับจำนวนเซลล์ก่อนเริ่มทำการทดลองด้วย hemocytometer และบรรจุสารละลายเซลล์มาสต์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิตรลงในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิตร และต่อเข้ากับอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่มีหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ระดับจุลภาค (microwells) รูปสามเหลี่ยม โดยมีความสูงของรูปสามเหลี่ยมตามแนวระนาบเท่ากับ 40 μ m และมีความลึกของหลุมเท่ากับ 30 μ m และจึงเริ่มดำเนินการทดลอง โดยใช้ syringe pump เพื่อดูดสารละลายเซลล์มาสต์แขวนลอยเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.1 ml/hr ต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ชั่วโมง ทำการสังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ได้ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการชะล้างเซลล์แขวนลอยที่คงค้างอยู่ในระบบออกจนหมดด้วยสารละลาย PBS โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.01 ml/min

ผลการทดลอง

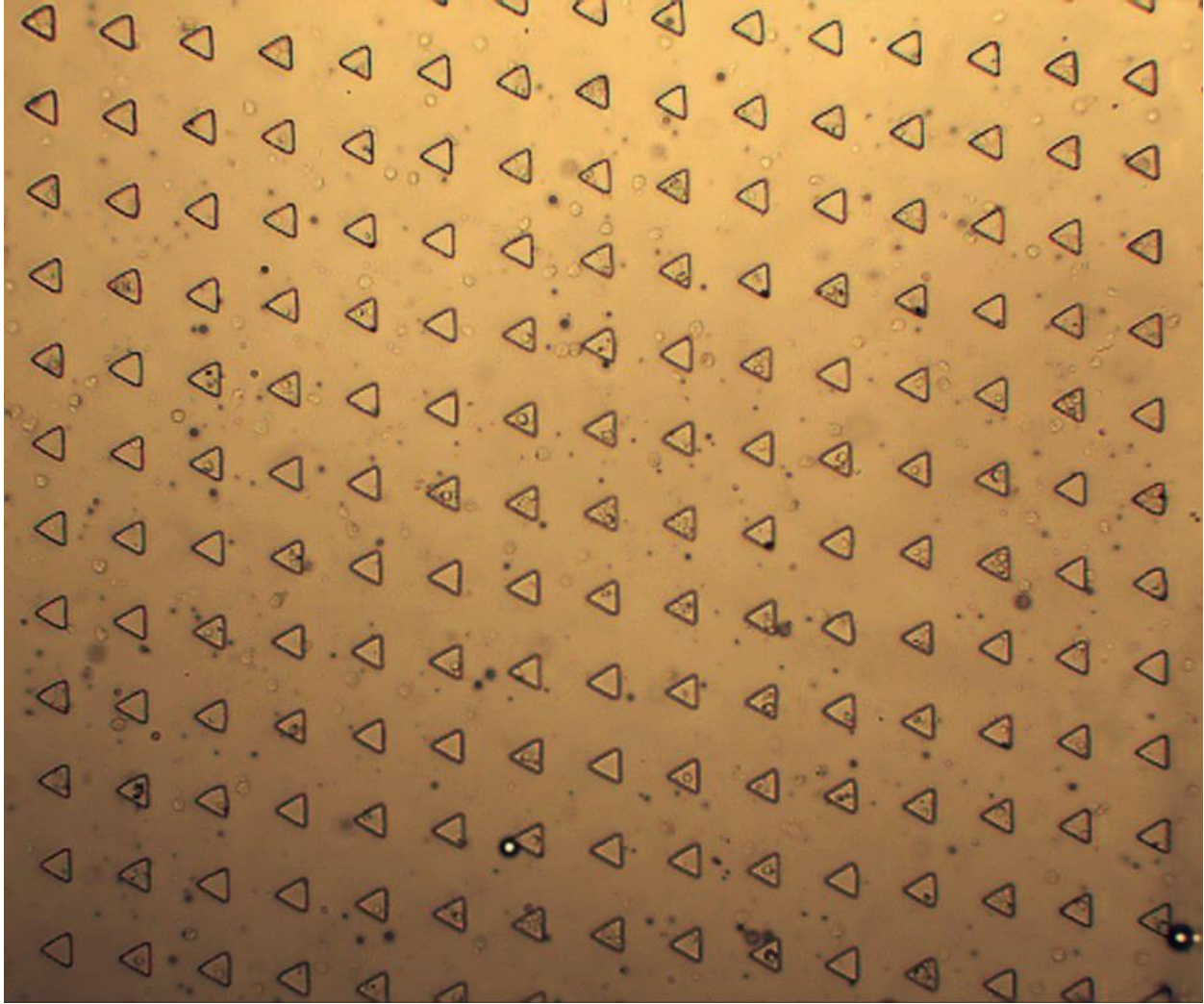
จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นนั้นมีความสามารถในการดักจับเซลล์มาสต์จำนวน 1 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์คิดเป็นร้อยละ 29.83, 27.78 และ 33.89 ตามลำดับ ความสามารถในการดักจับเซลล์มาสต์จำนวน 2 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์คิดเป็นร้อยละ 7.20, 9.77 และ 10.11 ตามลำดับ และมีความสามารถในการดักจับเซลล์มาสต์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 3 เซลล์ในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์คิดเป็นร้อยละ 2.56 2.68 และ 3.55 ตามลำดับ โดยลักษณะของการดักจับเซลล์มาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงในบริเวณด้านหน้า กลาง และท้ายของอุปกรณ์สามารถแสดงให้เห็นได้ ดังรูปที่ 28-31 ตามลำดับ



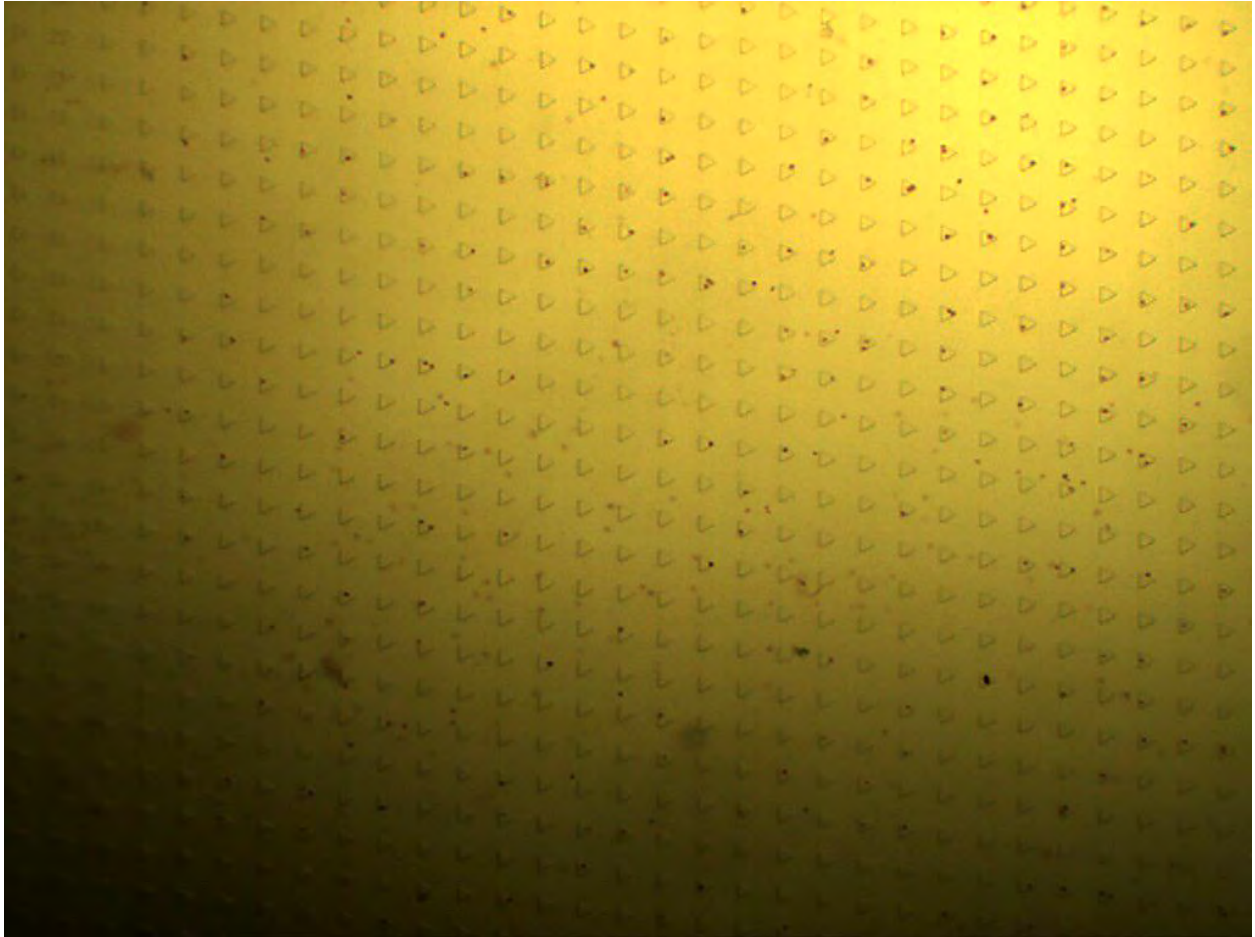
รูปที่ 28 แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งมาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านหน้า(กำลังขยาย 200X) (เซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ แสดงลักษณะรูปทรงกลมไม่ติดสียอยู่ในหลุม เซลล์ที่ไม่ติดสี มีลักษณะใส แสดงว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต)



รูปที่ 29 แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มะเร็งมาตรฐานของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณตรงกลาง (กำลังขยาย 200X) (เซลล์มะเร็งมาตรฐานเซลล์ แสดงลักษณะรูปทรงกลมไม่ติดสียอยู่ในหลุม เซลล์ที่ไม่ติดสีย มีลักษณะใส แสดงว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต)



รูปที่ 30 แสดงลักษณะของการดักจับเซลล์มาสต์ของสุนัขในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านท้าย(กำลังขยาย 200X)
(เซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ แสดงลักษณะรูปทรงกลมไม่ติดสีอยู่ในหลุม เซลล์ที่ไม่ติดสี มีลักษณะใส แสดงว่าเป็น
เซลล์ที่มีชีวิต)



รูปที่ 31 แสดงถึงการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งในหลุมเพาะเลี้ยงบริเวณด้านท้ายของอุปกรณ์ใกล้กับช่องทางออก (outlet) ที่สามารถดักจับเซลล์ไว้ได้ โดยหลุมเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะมีเซลล์เพียงเซลล์เดียว

	ไม่มีเซลล์	1 เซลล์	2 เซลล์	≥ 3 เซลล์	รวม
ด้านหน้า	638	315	76	27	1,056
ร้อยละ	60.41667	29.82955	7.19697	2.556818	100
ตรงกลาง	624	290	102	28	1,044
ร้อยละ	59.77011	27.77778	9.770115	2.681992	100
ด้านหลัง	503	325	97	34	959
ร้อยละ	52.45047	33.88947	10.1147	3.54536	100

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ของสุนัขในที่พบในแต่ละช่วงของอุปกรณ์ พบเซลล์ถูกจับเป็นลักษณะเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่ด้านหลังและด้านหน้าของอุปกรณ์ ค่าเฉลี่ยเซลล์เดี่ยวที่ดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมได้ร้อยละ 30

สรุปและวิจารณ์ผล

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ออกแบบประกอบอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค (microfluidics-based device) ที่สามารถนำมาใช้ดักจับอนุภาคที่แขวนลอยในของไหลตัวกลางได้แก่ เม็ดโพลีเมอร์ ขนาด 10 μm และเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัข ชนิดมาสต์เซลล์ ที่มีขนาดในช่วง 10-20 μm ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการออกแบบอุปกรณ์นั้นจะใช้หลักการขั้นพื้นฐานทางพลศาสตร์ของไหล (hydrodynamic) โดย Park และคณะ (2010) มาเป็นปัจจัยหลักในการพิจารณา โดยหลักการทำงานของอุปกรณ์จะเป็นการทำงานโดยที่ไม่ต้องใช้สนามของแรงจากภายนอก (external force field) เป็นตัวบังคับอนุภาคให้เคลื่อนที่ลงหลุมเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่ของอนุภาครวมทั้งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของไหลตัวกลางจะมีการเคลื่อนที่ไปตามแนวแกนการไหลของของไหลตัวกลางด้วยแรงเฉื่อย (inertial force) การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของของไหลตัวกลาง (fluid momentum) ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ อนุภาคแต่ละตัวจะถูกดึงให้ตกลงสู่พื้นล่างของอุปกรณ์ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force) ที่กระทำต่ออนุภาค เมื่ออนุภาคถูกดึงมาอยู่ในระดับชั้นการไหลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหลุมเพาะเลี้ยง อนุภาคจะถูกดึงลงสู่หลุมเพาะเลี้ยงเนื่องจากภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวน (recirculation force) ของของไหลตัวกลางเกิดขึ้นภายในหลุมเพาะเลี้ยง นอกจากนี้รูปทรงทางเรขาคณิตของหลุมเพาะเลี้ยงแบบสามเหลี่ยมจะทำให้เกิดการไหลเวียนแบบหมุนวนที่มีความแรงที่สุด และเพิ่มความน่าจะเป็นในการที่จะดักจับอนุภาครวมทั้งเซลล์เป้าหมายให้อยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงเพียงอนุภาคเดียว เมื่อเทียบกับหลุมเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงทางเรขาคณิตอื่นๆ เช่น วงกลมและสี่เหลี่ยมจัตุรัส

ก่อนที่จะทำการออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการทำการจำลองให้เห็นถึงความน่าจะเป็นในการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าภายในหลุมเพาะเลี้ยงจะมีการเกิดการไหลแบบหมุนวนของของไหลตัวกลางเกิดขึ้น โดยในการจำลองจะกำหนดให้หลุมเพาะเลี้ยงมีรูปร่างแบบสามเหลี่ยม ที่มีความสูงตามแนวระนาบเท่ากับ $40\ \mu\text{m}$ และความลึก $30\ \mu\text{m}$ ซึ่งจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่าความแรงของการไหลแบบหมุนวน จะมีขนาดที่เพียงพอที่จะดึงเอาอนุภาคลงสู่หลุมเพาะเลี้ยง

จากหลักการดังกล่าวทั้งหมดจึงนำมาสู่การออกแบบ และประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยอุปกรณ์ได้ถูกประกอบด้วยวิธี soft-lithography โดยใช้ PDMS ทำหน้าที่เป็นโครงของอุปกรณ์ ซึ่งอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมาจะประกอบไปด้วยสองส่วนหลักได้แก่ ช่องการไหลหลัก (main flow channel) สำหรับให้ของไหลตัวกลางและอนุภาคไหลผ่านเข้าออก โดยภาคตัดขวางของช่องจะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีความสูงของช่องอยู่ที่ $70\ \mu\text{m}$ และมีความกว้างเท่ากับ $500\ \mu\text{m}$ โดยที่ปลายของอุปกรณ์ด้านหนึ่งจะต่อกับช่องทางเข้า (inlet) จำนวน 1 ช่องและช่องทางออก (outlet) จะอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของอุปกรณ์

ภายหลังจากที่ติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับระบบควบคุมแล้ว โดยในขั้นแรกได้ทำการทดลองดักจับเม็ดโพลีเมอร์ขนาด $10\ \mu\text{m}$ โดยใช้อัตราการไหลที่ $0.1\ \text{ml/hr}$ อย่างต่อเนื่องเพื่อทดสอบว่าอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นมีความสามารถในการดักจับอนุภาคเป้าหมายได้ ผลจากการทดลองพบว่าอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ดักจับเม็ดโพลีเมอร์ ได้โดยมีประสิทธิภาพของการดักจับอนุภาคที่บริเวณด้านหน้าคิดเป็น 63.25 เปอร์เซ็นต์ ตรงกลางคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์และด้านหลังคิดเป็น 19.67 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนหลุมเพาะเลี้ยง 117 หลุมต่อหนึ่งพื้นที่หรือคิดเป็น 20% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด อย่างไรก็ตามวิธีการนับดังกล่าวเป็นวิธีนับที่ถูกนำเสนอโดย Park และคณะ (2010) ซึ่งไม่สามารถสะท้อนประสิทธิภาพของอุปกรณ์ได้อย่างแท้จริง ต่อมาได้ทดลองการใช้อุปกรณ์ในการดักจับเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัข จึงได้ทำการทดลองออกเป็นสองช่วง โดยช่วงแรกทำการทดลองแบบเดียวกับการทดลองโดยใช้เม็ดโพลีเมอร์ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์คิดเป็น 22% ของหลุมเพาะเลี้ยงทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับในการทดลองด้วย ส่วนในช่วงที่สองทำการทดลองโดยทำการปล่อยสารแขวนลอยของเซลล์ เป็นช่วงๆ โดยใช้อัตราการไหลที่ $0.03\ \text{ml/min}$ ($1.8\ \text{ml/hr}$) และทำการนับประสิทธิภาพโดยใช้ระบบชุดตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 ตารางมิลลิเมตรเข้าช่วยในการนับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการดักจับโดยรวมเพิ่มขึ้นเป็น 53.2% หรือมีจำนวนหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์อยู่ในหลุม 4,994 หลุมจากจำนวนหลุมทั้งหมด 9,310 หลุม โดยมีอัตราส่วนระหว่างหลุมเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์เดี่ยวต่อหลายเซลล์อยู่ที่ 2.7:1 (3,614/ 1,335) และบริเวณที่ดักจับได้มากที่สุดคือบริเวณตรงกลางของอุปกรณ์ รองลงมาคือส่วนด้านหน้าและด้านหลังตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับดักเซลล์มะเร็งชนิดกลมของสุนัขชนิดมาสต์เซลล์ได้ ค่อนข้างดี (กำหนดไว้ที่ 45%) อย่างไรก็ตามในอนาคตยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการพารามิเตอร์ทางกายภาพ (physical parameter) ต่างๆ ที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์ เช่น อัตราการไหล ลักษณะการ

จัดวางชุดของหลุมเพาะเลี้ยง และชนิดของของไหลตัวกลาง เป็นต้น ให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงแก้ไขอุปกรณ์ไปในอนาคต ทำให้ได้อุปกรณ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ที่สูงขึ้นต่อไป รวมทั้งควรทำการทดสอบอุปกรณ์กับเซลล์ชนิดอื่นๆด้วย เพื่อดูผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์กับผลในการศึกษาครั้งนี้ ก่อนที่จะนำอุปกรณ์นี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยระดับเซลล์เดี่ยวต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้คือ ความสามารถในการใช้องค์ความรู้ของการไหลของของไหลมาออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมการไหลของของไหลจุลภาค เพื่อให้เกิดการจัดเรียงตัวของเซลล์ในของไหลนั้นให้เป็นสายของกระแสการไหลของเซลล์ ที่แยกออกจากกันตามขนาดของเซลล์ เพื่อทำการจัดเรียงเซลล์และคัดแยกเซลล์แต่ละชนิดออกมาให้ได้ตามแต่ละขนาดที่ต้องการอย่างถูกต้องและเซลล์ที่ได้ยังมีชีวิตอยู่ และมีความสามารถที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง รวมทั้งสามารถนำเซลล์เหล่านั้นมาศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาต่างๆของเซลล์ ในระดับเซลล์เดี่ยวได้ต่อไป

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการศึกษาที่ได้จะถูกถ่ายทอด หรือถูกอ้างอิงไปสู่คณะวิจัยอื่นๆที่ต้องการคัดแยกเซลล์ต่างๆให้อยู่ในรูปของเซลล์เดี่ยวอย่างสมบูรณ์และเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ รวมทั้งสามารถที่จะนำเซลล์เหล่านี้มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพในลักษณะเซลล์เดี่ยวได้ รวมทั้งองค์ความรู้และเทคนิคในการออกแบบจะสามารถถูกถ่ายทอดและประยุกต์ใช้ในงานทางวิศวกรรมของไหลระดับจุลภาคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

อัจฉริยา ไสละสูต 2556 บทที่ 6 เซลล์วิทยาวิจิตร และ เซลล์วิทยาของเนื้องอก และ บทที่ 7 การประยุกต์ใช้เซลล์วิทยาวิจิตรทางคลินิก ใน สมพร เตชะงามสุวรรณ นพดล พิหารรัตน์ บรรณาธิการ วิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 3 หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ฮ่องกง กราฟิค หน้า 145-156 และหน้า 171-191.

Ailles L.E. and Weissman I.L. 2007. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotech.* 18: 460-466.

Batchelor, E., Kann, M. G., Przytycka, T. M., Raphael, B. J. and Wojtowicz, D. 2013. Modeling cell heterogeneity: from single-cell variations to mixed cells. *Biocomputing.* 445-450.

Bhagat, A.A.S., Sathyakumar S. Kuntaegowdanahalli, S.S. and Papautsky, I. 2008. Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration. *Lab Chip.* 8: 1906-1914.

Chao, TC. and Ros, A. 2008. Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. *J R Soc Interface.* 5: S139-150.

Clevers H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 17(3): 313-319.

Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins R. G. and Tone, M. 2007. Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. *PNAS.* 104(48): 18892-18897.

Dick J.E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 112(13): 4793-4807.

Fritzsche, F. S. O., Dusny, C., Frick, O. and Schmid, A. 2012. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 3: 129-155.

Heppner G.H. 1984. Tumor Heterogeneity. *Cancer Res.* 44: 2259-2265.

Kasukurti A., Potcoava M., Desai S.A., Eggleton C. and Marr D.W.M. 2011. Single-cell isolation using a DVD optical pickup. *Opt Exp.* 19(11).

- Kim J. and Orkin S.H. 2011. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med.* 3:75.
- Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S, Kumarb, G. and Papautsky, I. 2009. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip.* 9: 2973-2980.
- Lecault, V., White, A. K., Singhal, A. and Hansen, C. L. 2012. Microfluidic single cell analysis: from promise to practice. *Curr Opin Chem Biol,* 16: 381-390.
- Lee, W., Aminia, H. Stonec, H. A. and Di Carlo, D. 2010. Dynamic self-assembly and control of microfluidic particle crystals. 2010. *PNAS.* 107(52): 22413-22418.
- Lobo N.A., Shimono Y., Qian D. and Clarke M.F. 2007. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:675-99.
- Marusyk A., Almendro V. and Polyak K. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer. *Nat Rev Can.* 12: 323-334.
- Marysyk A. and Polyak K. 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochi Biophys Acta.* 1805: 105-117.
- Michor F. and Polyak K. 2010. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res.* 3: 1361-1364.
- Mogilner A, Wollman RA and Marshall WF. 2006. Quantitative modeling review in cell biology: what is it good for?. *Dev Cell.* 11: 279-287.
- Nilsson J., Evander M., Hammarström B., and Laurell T. 2009. Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. *Analyt Chimi Acta.* 649: 141–157.
- O'Brien A.C., Kreso A. and Dick J.E., PhD. 2009. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Semin Radiat Oncol.* 19: 71-77.
- Park JY., Morgan M, Sachs AN, Samorezov J, Teller R, Shen Y, Kenneth J, Pienta KJ and Takayama S. 2010. Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation. *Microfluid Nanofluid.* 8: 263-268.
- Rota L.M., Lazzarino D.A., Ziegler A.N., LeRoith D. and Wood L.T. 2012. Determining Mammosphere-Forming Potential: Application of the limiting dilution analysis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 17: 119-123.

Russom, A., Gupta, A. K., Gupta, A.K., Nagrath, S. Di Carlo, D. Edd, J.F. and Toner, Mehmet. 2009. Different inertial focusing of particles in curved low-aspect-ratio microchannels. *New J Phys.* 11: 1-9.

Sackmann E. K., Fulton A. L. and Beebe D. J. 2014. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature.* 507: 181-189.

Sailasuta, A., Ketpun, D., Piyaviriyakul, P., Theerawatanasirikul, S., Theewasutrakul, P. and Rungsipipat, A. 2014 "The Relevance of CD117-Immunocytochemistry Staining Patterns to Mutational Exon-11 in c-kit Detected by PCR from Fine-Needle Aspirated Canine Mast Cell Tumor Cells," *Veterinary Medicine International*, vol. 2014, Article ID 787498, 8 pages, doi:10.1155/2014/787498.

Tang D.G. 2012. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 22: 457-472.

Tirino V., Desiderio V., Paino F., De Rosa A., Papaccio F., La Noce M., Laino L., De Francesco F. and Papaccio G. 2013. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB.* 27: 1-3.

Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J.V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J.J, Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G.J., Wöhrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H.E., Andreeff M. and Eaves C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Can.* 12: 767-775.

Wu, M. and Singh, A. K. 2011. Single-cell protein analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 23: 1-6.

Yin, H. and Marshall, D. 2012. Microfluidics for single cell analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 23: 110-119.

ภาคผนวก

ผลงานวิชาการเผยแพร่ในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ

- Title:** การคัดแยกอนุภาคในท่อของไหลขนาดจุลภาครูปร่างขดเกลียว (Separation of Particles in Spiral Microchannels)

Authors: อรรถวุฒิ ถนอมศรีเดชชัย, เดชชชัย เกตุพันธ์, อลงกรณ์ พิมพ์พิณ, วีระยุทธ ศรีธรรวานิช, ประพศิตี ปิยะวิริยะกุล, อัจฉรียา ไสละสูต, วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศิริ, วิศรุต ศรีพุ่มไช้, จีรวัดน์ จันทะวงศ์, จักรพงศ์ ศุภเดช และวิน บรรจงปรุ

Conference: การประชุมวิชาการเครือข่ายวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28 (MENETT 28)

City/ Country: Khon-Kaen, Thailand

DOC: October 15-18, 2014
- Title:** Sorting of Multiple-Size Cells Using Spiral Microchannels

Authors: A. Thanormsridetchai, D. Ketpun, A. Pimpin, W. Srituravanich, P. Piyaviriyakul, A. Sailasuta, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, J. Jantawong and J. Supadech

Conference: 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference

City/ Country: Fukuoka, Japan

DOC: November 4-7, 2014
- Title:** A microfluidic model for single microparticle and future single-cell trappings

Authors: D. Ketpun, S. Bhanpattanakul, A. Sailasuta, T. Tongmanee, T. Suwannaphan, A. Pimpin, W. Srituravanich, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, P. Piyaviriyakul

Conference: The 40th International Conference on Veterinary Sciences (The 40th ICVS)

City/ Country: Nonthaburi, Thailand

DOC: November 11-13, 2015
- Title:** Development of A Triangular Microwell for Single Cell Trapping-Computational Study

Authors: Tewan Tongmanee, Alongkorn Pimpin, Werayut Srituravanich, Dettachai Ketpun, Achariya Sailasuta, Prapruddee Piyaviriyakul, Wutthinan Jeamsaksiri, and Witsaroot Sripumkhai

Conference: The 2015 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON-2015)

City/ Country: Pattaya, Thailand

DOC: November 25-27, 2015

5. **Title:** Investigation of Shear Stress and Cell Survival in A Microfluidic Chip for A Single Cell Study

Authors: Thammawit Suwannaphan, Alongkorn Pimpin, Werayut Srituravanich, Dettachai Ketpun, Achariya Sailasuta, Prapruddee Piyaviriyakul, Wutthinan Jeamsaksiri, and Witsaroot Sripumkhai

Conference: The 2015 Biomedical Engineering International Conference (BMEICON-2015)

City/ Country: Pattaya, Thailand

DOC: November 25-27, 2015