

การศึกษาเทคนิคหลุมขนาดจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยมสำหรับการดักจับอนุภาคขนาดจุลภาค



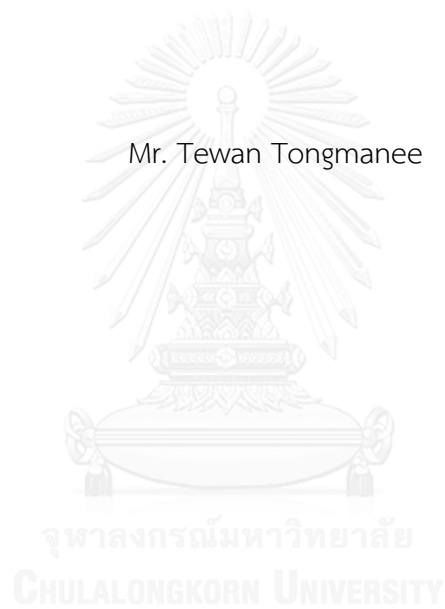
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY OF TRIANGULAR MICROWELL TECHNIQUE FOR MICRO-PARTICLES TRAPPING

Mr. Tewan Tongmanee



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

Department of Mechanical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเทคนิคหลุมขนาดจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยม สำหรับการดักจับอนุภาคขนาดจุลภาค
โดย	นายเทวัญ ตงมณี
สาขาวิชา	วิศวกรรมเครื่องกล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ นาย สัตวแพทย์ ดร.ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงษ์ พุทธิวิสุทธิศักดิ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เลิศนุวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ นาย สัตวแพทย์ ดร.ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ ศรีธรรมานิช)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.มยุรี ชนะสกุลนิยม)

เทวัญ ตงมณี : การศึกษาเทคนิคหลุมขนาดจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยมสำหรับการดักจับอนุภาคขนาดจุลภาค (A STUDY OF TRIANGULAR MICROWELL TECHNIQUE FOR MICRO-PARTICLES TRAPPING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. น. สพ. ดร.ประพุดดี ปิยะวิริยะกุล, 94 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อออกแบบและสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สามารถดักจับเซลล์เดี่ยว โดยเทคนิคที่เลือกใช้จะเป็นหลุมรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดจุลภาค ในการศึกษาจะใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ในการช่วยจำลองการไหลภายในหลุมเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของการไหลสำหรับหลุมที่มีขนาดพารามิเตอร์ต่างกัน โดยหลุมเป็นสามเหลี่ยมด้านเท่าที่มีความกว้าง 40, 60 และ 80 ไมโครเมตรและแต่ละความกว้างมีความลึกเป็น 15, 30 และ 45 ไมโครเมตร ซึ่งพบว่าโครงสร้างของการไหลภายในหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรที่ความลึก 30 ไมโครเมตร น่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการดักให้เป็นเซลล์เดี่ยวมากกว่าหลุมขนาดอื่น หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดลองด้วยอุปกรณ์ที่มีท่อการไหลขนาดความกว้าง 5 มิลลิเมตร ยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 70 ไมโครเมตร โดยที่ภายในช่องการไหลจะมีหลุมรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดจุลภาคที่แตกต่างกัน 3 ขนาดประกอบอยู่ซึ่งมีความยาวด้านละ 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร และความลึก 30 ไมโครเมตร การทดลองจะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือการทดลองกับอนุภาคและเซลล์เม็ดเลือดขาว ในส่วนแรกจะใช้เม็ดพอลิเมอร์ที่มีขนาด 5 ถึง 20 ไมโครเมตร โดยทำให้เป็นสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.8×10^5 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และใช้อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองแสดงว่าการดักจับอนุภาคของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคขนาด 10 และ 15 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้ 21% และ 8.6% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคทั้งสองขนาดที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้ 18.5% และ 14.5% ตามลำดับ และสุดท้ายหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร การดักจับอนุภาคทั้งสองขนาดได้ 12.9% และ 9.4% ตามลำดับ สำหรับการทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาด 7 ถึง 15 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่อัตราการไหลเดียวกัน พบว่าปริมาณการดักจับเซลล์เดี่ยวของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรได้ 20% ส่วนการดักจับเซลล์เดี่ยวของหลุมขนาด 60 ไมโครเมตรได้ 16.5% และหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร สามารถดักจับเซลล์เดี่ยวได้ 10.7% จากผลการทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าประสิทธิภาพในการดักจับของอุปกรณ์มีความสอดคล้องและใกล้เคียงกันกับการดักจับอนุภาคพลาสติกขนาด 10 ไมโครเมตร

ภาควิชา	วิศวกรรมเครื่องกล	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเครื่องกล	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5670546821 : MAJOR MECHANICAL ENGINEERING

KEYWORDS: MICRO-CHANNEL, TRIANGULAR MICROWELL, CELL TRAPPING, CANCER CELL, SOFT LITHOGRAPHY

TEWAN TONGMANEE: A STUDY OF TRIANGULAR MICROWELL TECHNIQUE FOR MICRO-PARTICLES TRAPPING. ADVISOR: ASST. PROF.ALONGKORN PIMPIN, Ph.D., CO-ADVISOR: PRAPRUDEE PIYAVIRIYAKUL, Ph.D., 94 pp.

This research aims to examine appropriate parameters to design and fabricate a microfluidic device that can trap single cells. Triangular microwell technique was chosen for trapping cells in this current study. At the beginning, the computational simulation was used to analyze the effects of difference microwell's dimensions on the flow structures inside the microwells. The microwells with equilateral length of 40, 60 and 80 μm , and the depth of 15, 30 and 45 μm were investigated. The results suggested that the equilateral triangular with the length of 40 μm and depth of 30 μm should be able to effectively trap a single cell. After that, the trapping device was fabricated. It consist of a rectangle microchannel (5 mm wide, 15 mm long and 70 μm high) and the array of triangular microwells— fabricated on the bottom surface of microchannel. The microwells with equilateral length of 40, 60 and 80 μm with the same depth of 30 μm were investigated. To examine a trapping performance, polystyrene beads were used to replicate cell which their dimension was within the range of 5 to 20 μm . The polystyrene beads were mixed with deionized water to a concentration of 1.8×10^5 beads/ml and the flow rate of 0.1 ml/h were used. The results showed that the trapping efficiency of the microwells with length of 40 μm for trapping 10 and 15 μm particles was 21% and 8.6%, respectively. For microwells with 60 μm in size, the trapping efficiency for those particles was 18.5% and 14.5%, respectively, and for the microwells with length of 80 μm , the trapping efficiency for those particles was 12.9% and 9.4% respectively. For the white blood cells experiment, the concentration of 3×10^5 cells/ml with same the flow rate was used. The results showed that the trapping efficiency of the microwells with length of 40, 60 and 80 μm was 20%, 16.5% and 10.7%, respectively. This result agrees with the experiment of 10 μm particle.

Department: Mechanical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Mechanical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ "ผศ.ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิณ" ที่ได้เสียสละเวลาส่วนตัวมาให้ความรู้ คำปรึกษา คำสั่งสอน ในด้านของงานวิจัยที่เป็นประโยชน์ อีกทั้งยังช่วยผลักดันให้ผู้วิจัยทำสำเร็จได้ตามที่คาดหวัง

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วีระยุทธ ศรีธรรมาภิบาล ที่คอยให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะทางการศึกษาที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.สพญ.ดร. อัจฉริยา ไชยะสุต อ.นสพ.ดร.ประพตติดี ปิยะวิริยะกุล และ น.สพ.เดชะชัย เกตุพันธ์ ที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ในการทดลองและอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศิริ นายวิศรุต ศรีพุ่มไช่ นายจีรวัดณ์ จันตะวงค์ นายจักรพงษ์ ศุภเดช และ นายวิน บรจรงปรุ ที่คอยสนับสนุนการผลิตอุปกรณ์การดักจับเซลล์และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ นายสุเทพ ตงมณี และ นางอัมพร ตงมณี ครอบครัวของผู้วิจัยที่คอยอบรมเลี้ยงดูสั่งสอนให้นักวิจัยประสบความสำเร็จได้ในวันนี้

ขอขอบคุณ ทูน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง.....	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.4 ระเบียบขั้นตอนของงานวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	6
2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	6
2.2 วิธีการดักจับเซลล์หรืออนุภาค.....	7
2.2.1 การดักจับเซลล์โดยใช้แรงภายนอก.....	7
2.2.1.1 การดักจับเซลล์ด้วยแม่เหล็ก (Magnetic Trapping).....	7
2.2.1.2 การดักจับเซลล์ด้วยแรงทางไฟฟ้า (Electric Trapping).....	7
2.2.2 การดักจับเซลล์โดยไม่ใช้แรงภายนอก (Passive).....	8
2.2.2.1 การดักจับเซลล์ด้วยการไหล (Hydrodynamic Trapping)	8
2.2.2.2 การดักจับเซลล์ด้วยหลุมขนาดเล็ก (Microwell Trapping)	9
2.3 สรุป	19

บทที่ 3 การศึกษาเบื้องต้น.....	20
3.1 กระบวนการสร้างระบบของไหลขนาดเล็ก	20
3.2 ขั้นตอนการเตรียมการทดลอง	21
3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการทดลอง	21
3.2.2 ชุดทดลอง.....	22
3.3 ขั้นตอนการทดลอง	22
3.4 ผลการทดลอง.....	23
3.4.1 การทดลอง	23
3.4.2 ผลการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 mL/h.....	24
3.4.3 ผลการทดลองที่อัตราการไหล 0.3 mL/h.....	25
3.5 สรุปผล.....	27
บทที่ 4 การจำลองการไหลเบื้องต้น.....	28
4.1 การวาดรูปทรงเรขาคณิต	28
4.2 การกำหนดคุณสมบัติ	29
4.3 การกำหนดเงื่อนไขต่าง ๆ.....	29
4.4 ผลของการจำลอง	30
4.4.1 เส้นการเคลื่อนที่ของของไหลที่ตำแหน่งความสูงต่างกัน	30
4.4.2 เส้นการเคลื่อนที่ของของไหลที่ตำแหน่งพื้นของช่องการไหล	30
4.4.3 การกระจายตัวของความเร็วภายในหลุมจูลภาค	31
4.4.4 การกระจายตัวของการหมุน (Vorticity) ภายในหลุมจูลภาค.....	48
4.4.5 การกระจายตัวของหลุมขนาดเล็กแบบสลับฟันปลา (Zigzag).....	54
4.4.6 การเคลื่อนที่แบบ 3 มิติ ของของไหลภายในหลุม	57
4.5 สรุปผล.....	59

บทที่ 5 ผลการทดลอง.....	60
5.1 อุปกรณ์ดักจับเซลล์แบบใหม่.....	60
5.2 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร.....	61
5.3 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร	62
5.4 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร	62
5.5 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 20 ไมโครเมตร	63
5.6 ผลการทดลองกับเซลล์จริง.....	68
5.7 สรุปผล.....	72
บทที่ 6 สรุปผลของงานวิจัย	73
6.1 สรุปงานวิจัย.....	73
6.2 ข้อเสนอแนะ	75
รายการอ้างอิง	77
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก รูปภาพจากการทดลองการดักจับของอุปกรณ์	81
ภาคผนวก ข ขนาดจริงของหลุมสำหรับดักจับ	86
ภาคผนวก ค เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	88
ภาคผนวก ง การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวและสารละลายอนุภาค.....	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	94

สารบัญญภาพ

รูปที่ 1.1 ระบบการรวมอุปกรณ์จุลภาคสำหรับคัดแยกและดักเซลล์ (Scale bar 200 μm).....	2
รูปที่ 1.2 แสดงทิศทางการไหลและรูปร่างของหลุม	4
รูปที่ 2.1 ตัวอย่างของอุปกรณ์ที่ใช้แรงการไหล ก) เส้นทางการไหลภายในหลุมขนาดเล็ก ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพและอัตราส่วนความยาว [20].....	10
รูปที่ 2.2 ตัวอย่างของหลุมขนาดเล็ก ก) หลุมขนาดเล็กที่มีเซลล์อยู่ด้านล่างของหลุม ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนหลุมที่ของไหลเคลื่อนที่ผ่าน ค) การดักจับเซลล์ (ซ้าย-ไม่ยอมสี ขวา-ยอมสี) [22].....	10
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างของหลุมขนาดเล็ก (ก-ค) แสดงการดักเซลล์ NIH 3T3 ในหลุมขนาดเล็กที่มีรูปร่างต่างกัน [23]	11
รูปที่ 2.4 หลุมขนาดจุลภาคแบบยืดหยุ่น ก) หลุมขนาดเล็กที่สามารถยืดหยุ่นได้ ข) ท่อสำหรับใส่สารละลายและทำหน้าที่เป็นตัวขยายหลุมให้มีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกดด้วยแรง [24].....	12
รูปที่ 2.5 แสดงการดักเซลล์และนำเซลล์ออกจากหลุมขนาดเล็ก [24]	13
รูปที่ 2.6 ตัวอย่างการดักจับอนุภาคด้วยหลุมขนาดจุลภาค ก) ผลของการไหลหมุนวนภายในหลุมรูปร่างต่างๆ ข) ความเป็นไปได้สำหรับการดักเซลล์เดี่ยว ค) การดักจับเซลล์ที่ได้จากอุปกรณ์ [14] .	14
รูปที่ 3.1 กระบวนการสร้างระบบของไหลขนาดเล็ก.....	21
รูปที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	21
รูปที่ 3.3 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 ml/h ก) ณ เวลาเริ่มต้น ข) เมื่อเวลาผ่านไป 33 วินาที ค) เมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที ง) สิ้นสุดการทดลอง.....	24
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงช่วงความเร็วในการดักอนุภาคที่อัตราการไหล 0.1 ml/h (ความเร็วเฉลี่ยของของไหล 540 $\mu\text{m/s}$).....	25
รูปที่ 3.5 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.3 ml/h (ก) ณ เวลาเริ่มต้น, (ข) เมื่อเวลาผ่านไป 15 วินาที, (ค) เมื่อเวลาผ่านไป 50 วินาที, (ง) สิ้นสุดการทดลอง.....	26
รูปที่ 3.6 กราฟแสดงช่วงความเร็วในการดักอนุภาคที่อัตราการไหล 0.3 ml/h (ความเร็วเฉลี่ยของของไหล 960 $\mu\text{m/s}$).....	26

รูปที่ 4.1 รูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับทดลองการจำลองการไหล (ก) แนวแถวเดียว (ข) สลับฟันปลา	28
รูปที่ 4.2 โดเมนและสภาวะขอบเขตในการคำนวณ ก) เงื่อนไขของรูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับการทดลองจำลองการไหล ข) จำนวน mesh	29
รูปที่ 4.3 ลักษณะเส้นการเคลื่อนที่ของของไหล (ก) ผลของการจำลองการไหลที่ตำแหน่งความสูงต่างๆ (ข) ผลของการจำลองการไหลที่ตำแหน่งพื้นของช่องการไหล.....	31
รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 15 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	32
รูปที่ 4.5 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	34
รูปที่ 4.6 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	36
รูปที่ 4.7 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 15 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	40
รูปที่ 4.8 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	41
รูปที่ 4.9 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	42
รูปที่ 4.10 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 15 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	45
รูปที่ 4.11 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	46
รูปที่ 4.12 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	47
รูปที่ 4.13 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	51
รูปที่ 4.14 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	52

รูปที่ 4.15 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายใน หลุมขนาด 80 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	53
รูปที่ 4.16 การวางเรียงตัวของหลุมในรูปแบบสลับฟันปลา.....	54
รูปที่ 4.17 การกระจายตัวของความเร็ว (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุม ขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	55
รูปที่ 4.18 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุม ขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z.....	56
รูปที่ 4.19 การเคลื่อนที่ของของไหลภายในหลุม ก) ขนาด 40 ลึก 30 ไมโครเมตร ข) ขนาด 60 ลึก 30 ไมโครเมตร ค) ขนาด 80 ลึก 30 ไมโครเมตร (ซ้าย) มุมมองด้านบน (Top view) (ขวา) มุมมองด้านข้าง (Cross section).....	58
รูปที่ 5.1 ก) อุปกรณ์การดักจับเซลล์ ข) ตำแหน่งการถ่ายรูปสำหรับการนับอนุภาค (Scale bar 120 μm)	61
รูปที่ 5.2 จำนวนอนุภาคขนาด 5 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุม ขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm	64
รูปที่ 5.3 จำนวนอนุภาคขนาด 10 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm	65
รูปที่ 5.4 จำนวนอนุภาคขนาด 15 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm	66
รูปที่ 5.5 จำนวนอนุภาคขนาด 20 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm	67
รูปที่ 5.6 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุม ขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm	70
รูปภาพ ก.1 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค 5 μm ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)	81

รูปภาพ ก.2 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค 10 μm ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)	82
รูปภาพ ก.3 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค 15 μm ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)	83
รูปภาพ ก.4 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค 20 μm ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)	84
รูปภาพ ก. 5 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)	85
รูปภาพ ข.1 ขนาดจริงของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μm)	86
รูปภาพ ข.2 ขนาดจริงของหลุมขนาด 60 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μm)	86
รูปภาพ ข.3 ขนาดจริงของหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μm)	87
รูปภาพ ค.1 อุปกรณ์การดักจับเวอร์ชัน 1 มีความกว้าง 500 ไมโครเมตร ความยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร.....	88
รูปภาพ ค.2 อุปกรณ์การดักจับเวอร์ชัน 2 มีความกว้าง 5 มิลลิเมตร ความยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 0.07 มิลลิเมตร.....	89
รูปภาพ ค.3 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Seek.....	90
รูปภาพ ค.4 หลอดฉีดยาขนาด 10 ml และสายยาง.....	90
รูปภาพ ค.5 ปืนสำหรับสร้างอัตราการไหล รุ่น NE-1600/NE-1800.....	91

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 วิธีการดักจับเซลล์ด้วยเทคนิคต่างๆ.....	15
ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพในการดักจับอนุภาคของหลุมขนาดต่างๆ	70
ตารางที่ 5.2 ประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาวของหลุมขนาดต่างๆ	71



บทที่ 1

บทนำ

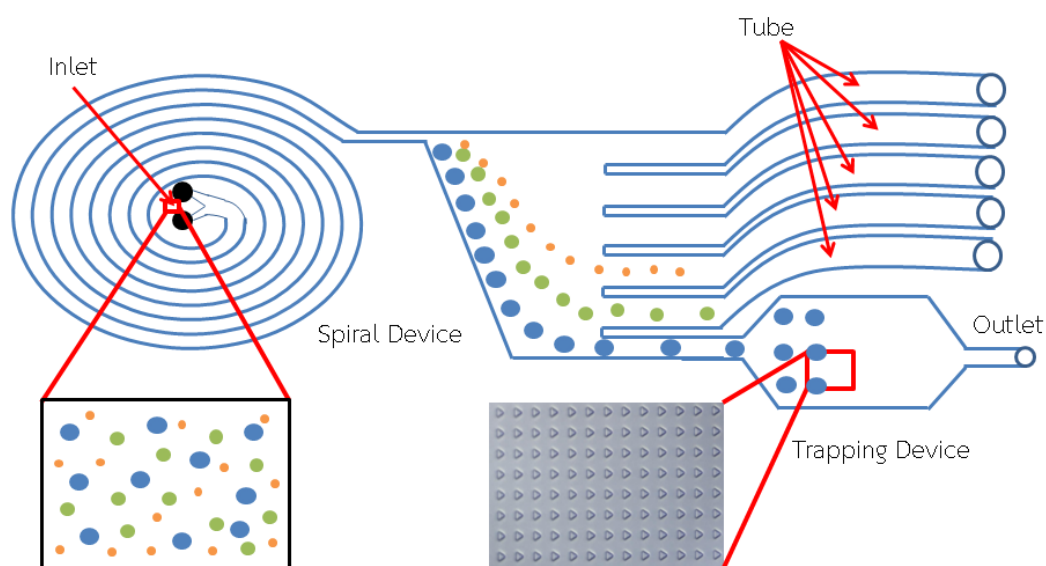
1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในระยะเวลาหลายสิบปีที่ผ่านมาพบว่าปัญหาการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของคนไทยคือโรคมะเร็ง และยังมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยเมื่อไม่นานมานี้ว่าคนไทยเสียชีวิตจากโรคนี้อันดับหนึ่ง โดยเฉลี่ยปีละประมาณ 60,000 คน ซึ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นประเภทที่คร่าชีวิตผู้ป่วยเพศชายมากที่สุด (16.2%) และในเพศหญิงเสียชีวิตจากมะเร็งเต้านมมากที่สุด (37.5%) [1]

เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลาทำให้ยังไม่ทราบถึงที่มาของเซลล์มะเร็งอย่างละเอียดอีกทั้งยังมีข้อจำกัดมากมายทั้งในด้านของการเพาะเลี้ยงเซลล์ [2] และการแยกเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติออกจากกัน ด้วยเหตุนี้จึงเกิดความสนใจที่จะนำเซลล์มะเร็งมาทำการศึกษาคูณสมบัติทางชีวภาพเพื่อเป็นการศึกษาหาวิธีการรักษาโรคมะเร็ง แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งนั้นมีขนาดเล็กมากทำให้ต้องใช้อุปกรณ์สำหรับการคัดแยกหรือการตรึงเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงด้วย

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการบนชิพ (Lab On a Chip) สามารถตอบโจทย์ความต้องการของการศึกษาเซลล์มะเร็งได้เป็นอย่างดีเนื่องจากวิธีการนี้สามารถนำเอาทุกขั้นตอนของห้องปฏิบัติการ เช่น การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์มารวมอยู่บนชิพเล็กๆ เพียงแค่ชิ้นเดียว อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้ในอีกหลากหลายรูปแบบ เช่น แพลตฟอรม์ที่ใช้แรงดันในการขับเคลื่อน [3] โดยมีแหล่งกำเนิดแรงดันจากปั๊มเพื่อทำให้เกิดแรงดันที่แตกต่างกันและนำไปใช้ควบคุมการเคลื่อนที่ของของไหลซึ่งตัวแพลตฟอร์มจะขึ้นรูปมาจาก PDMS ดังตัวอย่างชิพของ บริษัท Agilent ที่สามารถคัดแยกและดักเซลล์ได้ในอุปกรณ์เดียว [4] โดยอุปกรณ์มีขนาด 150 mm x 70 μ m และสามารถบรรจุของเหลวได้ในปริมาตร 500 นาโนลิตร

ทางคณะผู้วิจัยจึงเกิดความสนใจที่จะนำห้องปฏิบัติการบนชิพ (Lab On a Chip) มาใช้ในการศึกษาเซลล์มะเร็งโดยจะต้องเป็นระบบที่สามารถคัดแยกเซลล์ ดักจับเซลล์และปลดเซลล์ออกจากอุปกรณ์ได้ ตัวอย่างของอุปกรณ์แสดงในรูปที่ 1.1 เนื่องจากการทำงานร่วมกันของทั้งสามส่วนนี้สามารถทำให้เซลล์มะเร็งแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวได้ ซึ่งในส่วนแรกจะอาศัยการคัดแยกเซลล์ที่มีขนาดต่างๆ ออกจากกันโดยใช้ท่อรูปขดเกลียว [5] หลังจากนั้นจะทำการดักเซลล์มะเร็งด้วยหลุมขนาดจุลภาคและสุดท้ายเป็นการปลดเซลล์ออกจากกระบบเพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 1.1 ระบบการรวมอุปกรณ์จุลภาคสำหรับคัดแยกและดักเซลล์ (Scale bar 200 μm)

งานวิจัยที่น่าสนใจในส่วนของ การดักจับเซลล์ให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยว เพราะว่าเซลล์ที่เรานำมาศึกษา จะได้มาจากการตัดเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนออกมาทำให้เซลล์ที่ได้มานั้นมีจำนวนมากมายหลายขนาดและหลายคุณสมบัติ ซึ่งถ้าหากมีเซลล์ใดเซลล์หนึ่งเกิดความผิดปกติไปจากเดิมจะส่งผลทำให้เซลล์รอบข้างนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวภาพไปด้วยเรียกว่า การติดต่อกันระหว่างเซลล์ (Cell to cell Interaction) ดังนั้นเราจำเป็นที่จะต้องการแยกเซลล์เหล่านั้นออกให้เป็นเซลล์เดี่ยว

การดักจับเซลล์นั้นจะต้องมีการคัดแยกขนาดของเซลล์ออกจากกันก่อนเพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการดักจับเซลล์โดยการคัดแยกขนาดของเซลล์โดยอาศัยทอรูปขดเกลียว หลักการของการแยกขนาดนั้นจะอาศัยแรงของของไหลที่เรียกว่า แรงของดิน (Dean drag force) และ แรงยก (Inertial Lift force) เนื่องจากแรงทั้งสองจะแยกเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และเล็กให้แยกออกจากกันและหลังจากได้ขนาดที่ต้องการแล้วต่อมาก็จะเป็นการดักจับเซลล์

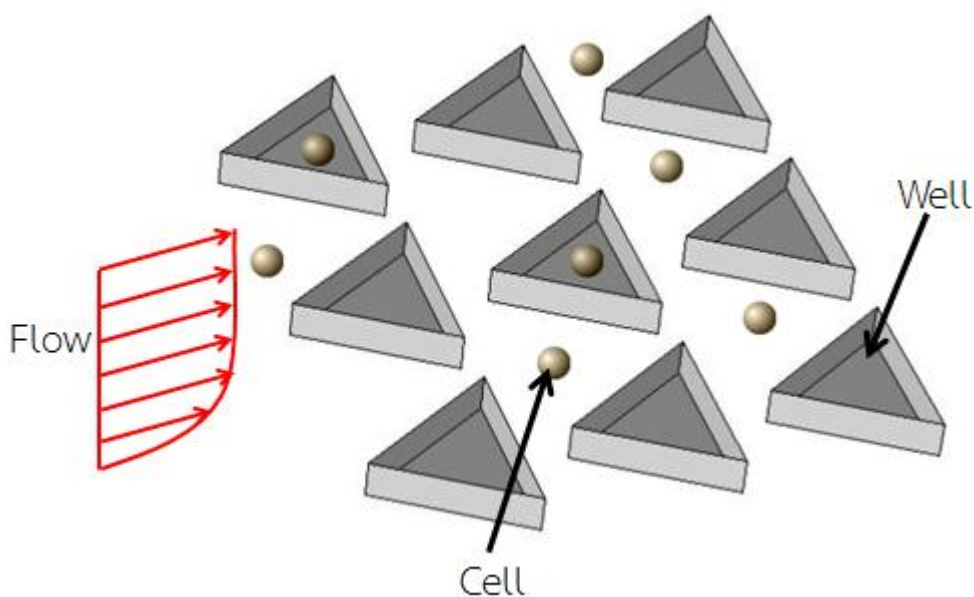
ในอดีตที่ผ่านมาวิธีสำหรับการดักเซลล์หลากหลายรูปแบบ เช่น เทคนิคไม้อาศัยการสัมผัสพื้นผิว (Contact-less) [6] ได้แก่ การดักเซลล์โดยอาศัยแรงจากแม่เหล็กด้วยแม่เหล็กขนาดเล็กที่มีการทำงานต่างกัน [7] การดักเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าโดยการใช้คุณสมบัติทางไฟฟ้าที่ต่างกันจากอิเล็กโทรด 4 ตัว ทำให้เกิดเป็นแรงไดอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบเนกาทีฟ (negative dielectrophoresis) [8] การศึกษาการดักเซลล์ด้วยไดอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยเป็นการควบคุมเซลล์ด้วยการใส่ความต่าง

ศักย์ไฟฟ้าด้วยความถี่และแอมพลิจูดที่มีค่าต่างกันซึ่งความถี่อยู่ในช่วง 100 กิโลเฮิร์ตซ์ ถึง 1.5 เมกะเฮิร์ตซ์และแอมพลิจูดระหว่าง 2-7 โวลต์ให้กับแท่งอิเล็กโทรดสามตำแหน่ง (บน กลาง ล่าง) จนทำให้เกิดแรงไดอิเล็กโทรโฟเรซิส [9] และในอีกรูปแบบหนึ่งจะเป็นการอาศัยสัมผัสพื้นผิว (Surface Contact) [6] ได้แก่ การดักเซลล์ด้วยการเคลื่อนที่ของของเหลว [10] ซึ่งใช้ของเหลวเป็นตัวกลางในการนำเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นท่อการไหลคล้ายตัวดับเบิ้ลยูซึ่งมีทางเชื่อมเป็นรูเล็กๆสำหรับดักเซลล์ เมื่อเกิดการดักเซลล์ที่ตำแหน่งทางเชื่อมแล้วเซลล์ที่ไหลตามมาจะเปลี่ยนเส้นทางไปสู่ช่องการไหลหลักและไหลออกจากอุปกรณ์ไป ซึ่งที่ตำแหน่งทางเชื่อมจะมีแผ่นอลูมิเนียมทำหน้าที่ให้ความร้อนด้วยเลเซอร์อยู่ เพื่อใช้ในการสร้างฟองอากาศและเมื่อเกิดฟองอากาศที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมันจะไปแทนที่เซลล์ทำให้เซลล์นั้นหลุดออกจากอุปกรณ์ไป และยังมีอีกหลายวิธีสำหรับการดักเซลล์ในรูปแบบ Micro array และการเคลื่อนที่ด้วยของเหลว [11-13] โดยงานวิจัยนี้จะเลือกใช้การดักจับเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาค (Micro well Trapping) เพราะต้องการศึกษาเซลล์มะเร็งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและนำเซลล์ที่ดักได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยต้องไม่มีแรงภายนอกมาเกี่ยวข้องกับการดักเซลล์ด้วย เพราะถ้าเกิดมีแรงภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้องอาจจะส่งผลให้คุณสมบัติของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อนได้ อีกทั้งวิธีการดักเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาคนี้นี้ยังมีขั้นตอนการใช้งานที่ไม่ซับซ้อนและสามารถสร้างระบบได้ง่าย

ในอดีต Joong Yull Park และคณะ [14] ได้ทำการทดลองและศึกษาเกี่ยวกับการดักเซลล์เดี่ยวด้วยหลุมขนาดจุลภาคดังแสดงในรูปที่ 1.2 ที่มีรูปร่างต่างกัน 5 แบบคือ สามเหลี่ยม สี่เหลี่ยม วงกลม รูปกรวย และข้าวหลามตัด โดยแต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตรและความลึก 20 ไมโครเมตรเท่ากันทุกแบบ ซึ่งหลุมขนาดเล็กเหล่านี้จะอยู่ในช่องการไหล ที่มีความสูง 200 ไมโครเมตร กว้าง 5 มิลลิเมตร และยาว 15 มิลลิเมตร โดยการดักเซลล์ของบทความนี้จะอาศัยหลักการไหลวนของของไหลและมีการทดสอบกับเซลล์มะเร็งอีกด้วย จากผลการทดลองปรากฏว่ารูปร่างสามเหลี่ยมมีประสิทธิภาพในการดักเซลล์มากที่สุดอยู่ที่ 62 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในงานวิจัยนี้อาจจะยังมีข้อมูลที่ไม่เพียงพอเนื่องจากไม่ได้อธิบายถึงค่าของความเร็วกว่าความเร็วในช่วงใดและลักษณะโครงสร้างการไหลเป็นแบบใดจึงจะสามารถดักเซลล์ได้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ขาดหายที่อาจจะนำไปสู่การพัฒนาให้ดีขึ้นได้

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาพารามิเตอร์สำหรับการดักอนุภาคด้วยหลุมขนาดจุลภาครูปร่างสามเหลี่ยมและสามารถบอกถึงประสิทธิภาพในการทำงานของอุปกรณ์ได้



รูปที่ 1.2 แสดงทิศทางการไหลและรูปร่างของหลุม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เป้าหมายสุดท้ายของงานวิจัยคือต้องการดักเซลล์ให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยในเบื้องต้นจะเริ่มทดลองกับอนุภาคพลาสติกขนาด 5 ถึง 20 ไมโครเมตรที่อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดในช่วง 7 ถึง 15 ไมโครเมตรด้วยอัตราการไหลเดียวกันเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งการวัดประสิทธิภาพของอุปกรณ์จะนับจากจำนวนเซลล์ที่อยู่ในหลุม

1.4 ระเบียบขั้นตอนของงานวิจัย

1.4.1 ศึกษากระบวนการดักเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่เป็นหลุมรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จากนั้นทำการออกแบบและสร้างอุปกรณ์เพื่อใช้สำหรับการทดลองเบื้องต้น โดยเริ่มต้นจะทำการทดลองกับอนุภาคพลาสติกเพื่อปรับหาอัตราการไหลที่เหมาะสมที่ทำให้อนุภาคพลาสติกกลงหลุม

1.4.2 จำลองการไหลภายในท่อเพื่อดูรูปแบบของการไหลในหลุมสำหรับพารามิเตอร์ของหลุมที่มีขนาด 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร ความลึก 15, 30 และ 45 ไมโครเมตร ที่อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

1.4.3 ออกแบบและสร้างอุปกรณ์ใหม่และนำมาทดลองกับอนุภาคพลาสติกขนาด 5 ถึง 20 ไมโครเมตรและเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาด 7 ถึง 15 ไมโครเมตรพร้อมนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในหลุมเพื่อวัดประสิทธิภาพของอุปกรณ์

1.4.4 สรุปผลงานวิจัยและจัดทำรูปเล่ม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความเข้าใจอิทธิพลของหลุมขนาดต่างๆ ต่อสนามความเร็วในหลุมที่อาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดักจับอนุภาคที่มีขนาดต่างกัน อีกทั้งยังสามารถนำต้นแบบของอุปกรณ์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการดักจับเซลล์มะเร็งได้เนื่องจากอุปกรณ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการใช้งาน และยังให้ประสิทธิภาพที่ค่อนข้างสูง



บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

ในบทนี้จะกล่าวถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ วิธีการดักจับอนุภาคที่ใช้ในปัจจุบันรวมถึงการแบ่งวิธีการดักจับที่เป็นแบบใช้แรงภายนอกและที่ไม่ใช้แรงภายนอกมาเกี่ยวข้องและการประยุกต์การใช้งานของอุปกรณ์ที่ใช้หลุมขนาดจุลภาคในกรณีต่างๆ

2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ [15] ถือเป็นเรื่องที่สำคัญอีกวิธีหนึ่งในทางชีววิทยา วิศวกรรมชีวการแพทย์ และที่สาขาเกี่ยวกับการแพทย์อื่นๆ ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นไม่สามารถที่จะศึกษาเซลล์ที่มีหลากหลายในงานเพาะเลี้ยงเซลล์อันเดียวได้ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันจะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในระบบของไหลขนาดจุลภาค (Microfluidic system) เนื่องจากเทคนิคระบบของไหลขนาดจุลภาคนี้สามารถส่งของไหล สารบัฟเฟอร์ (Buffer) หรือแม้กระทั่งอากาศให้ไหลผ่านอุปกรณ์นี้ได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการรวมกันระหว่างส่วนประกอบต่างๆ ให้แพลตฟอร์มอันเดียวเพื่อวิเคราะห์และศึกษาตัวอย่างเซลล์ที่ผสมผสานกันอยู่ได้ ดังนั้นระบบของไหลจุลภาคนี้สามารถทำให้มีสภาพแวดล้อมตลอดจนปฏิกิริยาต่อเซลล์ต่างๆ เสมือนอยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ โดยโครงสร้างการเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิตินั้นถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการสร้างระบบของไหลในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามการทำอุปกรณ์ของไหลจุลภาคให้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติ จะมีประโยชน์มากกว่าโดยมีรายละเอียดดังนี้

เซลล์ที่ใช้การเพาะเลี้ยงในระบบ 2 มิตินี้จะใช้กับเซลล์จำพวกเซลล์ที่อยู่ในร่างกายมนุษย์ที่เป็นแบบชิดติดกันซึ่งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะควบคุมชนิดของเซลล์ได้ง่ายโดยระบบของไหลจุลภาคส่วนใหญ่จะใช้การเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ

การเพาะเลี้ยงในระบบ 3 มิติ ส่วนใหญ่นั้นจะใช้เกี่ยวกับพวกเซลล์ของสัตว์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว โดยในปี 2012 Edmond W.K. Young et al. [16] ได้อธิบายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารแขวนลอยโดยการพัฒนาแพลตฟอร์มของระบบของไหลขนาดจุลภาคที่สามารถเพาะเลี้ยง การเลี้ยงเซลล์ การย้ายสีและการวิเคราะห์ภาพของการเจริญเติบโตของเซลล์ ต่อมาในปี 2015 O. Frey et al. [17] ต้องการที่จะเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างชนิดภายในระบบเดียวกันจึงได้พัฒนาและสร้างอุปกรณ์ขึ้นมาโดยระบบการเลี้ยงเซลล์นี้จะประกอบไปด้วยพื้นที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 3 พื้นที่โดยสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้สามชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน และจะถูกใช้เพื่อเป็นการหา

ประสิทธิภาพของเซลล์ที่ต่างกัน ผลการศึกษาชี้ว่าการใส่ออกซิเจนเข้าไปในพื้นที่การเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะปกติและเซลล์ก็มีการเติบโตภายในอุปกรณ์ได้ดีด้วย

การเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องมีการคัดกรองเซลล์เช่นการดักจับเซลล์ในภาชนะที่เป็นตัวรองรับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างๆ อุปกรณ์ที่เราจะนำมาดักและเพาะเลี้ยงเซลล์ก็มีหลากหลายรูปแบบดังจะกล่าวในหัวข้อต่อไป

2.2 วิธีการดักจับเซลล์หรืออนุภาค

การดักจับเซลล์นั้นมีหลากหลายรูปแบบซึ่งในปัจจุบันการดักจับเซลล์ที่ใช้มี 2 รูปแบบคือ 1) ใช้แรงภายนอกมาเกี่ยวข้อง (Active) และ 2) ไม่ใช้แรงภายนอกมาเกี่ยวข้อง (Passive)

2.2.1 การดักจับเซลล์โดยใช้แรงภายนอก

การดักจับเซลล์ด้วยวิธีนี้จะเป็นการใช้แรงเข้ามามีส่วนร่วมในการดักจับเซลล์ แรงเหล่านี้ อาจจะไปส่งผลให้เซลล์ที่ถูกดักจับนั้นเกิดความเสียหายหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีววิทยาได้ อย่างไรก็ตามการดักจับเซลล์ด้วยวิธีการนี้ก็สามารถทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวได้ซึ่งวิธีการดักจับเซลล์ที่ใช้แรงภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้องนี้ก็มากมายหลายรูปแบบดังต่อไปนี้

2.2.1.1 การดักจับเซลล์ด้วยแม่เหล็ก (Magnetic Trapping)

A. Winkleman et al. [18] และคณะได้เสนอวิธีการใช้แม่เหล็กถาวรมาในการดักจับเซลล์ซึ่งการดักจับเซลล์นี้จะใช้การหยดของสารละลายที่มีพาราแมกเนติกอยู่และในสารละลายนั้นจะมีอนุภาคไดอะแมกเนติกอยู่ด้วย โดยจะถูกหยดไว้ระหว่างแม่เหล็กสองอันที่มีสนามแม่เหล็กที่ผลัดกันการทำงานของแม่เหล็กนี้สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระซึ่งการเคลื่อนตัวแม่เหล็กนั้นก็ส่งผลให้เกิดขนาดและแรงของแม่เหล็กที่แตกต่างกัน จากการทดลองนั้นพบว่าการเคลื่อนแม่เหล็กให้มีระยะห่างกัน 50 μm ก็ยังสามารถดักเซลล์ได้อยู่และการทดลองพบว่าสามารถดักเซลล์หรืออนุภาคได้โดยการดักจับเซลล์นี้จะไม่ส่งผลให้เซลล์ที่ดักได้นั้นเกิดการตายระหว่างกันดักเซลล์

ต่อมา J. Pivetal et al. [7] ได้เสนอวิธีการพัฒนาอุปกรณ์การดักเซลล์แบบที่เรียกที่เป็นเซลล์เดี่ยวซึ่งจะใช้แม่เหล็กขนาดเล็กเป็นตัวขับเคลื่อนให้เซลล์แบบที่เรียกเคลื่อนที่ ในงานนี้เซลล์เป้าหมายคือเซลล์แบบที่เรียกที่ถูกติดสัญลักษณ์ด้วยการใช้แอนติบอดีเข้าไปในอนุภาคแม่เหล็กขนาดเล็ก ข้อดีของวิธีการนี้คือมีลักษณะจำเพาะสูง

2.2.1.2 การดักจับเซลล์ด้วยแรงทางไฟฟ้า (Electric Trapping)

Y. Yoshimura et al. [19] ได้เสนอวิธีการดักจับเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่มีรูปร่างเป็นหลุมขนาดเล็กโดยใช้แรงทางไฟฟ้าแบบโพซิทีฟ-ไดอิเล็กโตรโฟรีติก (p-DEP) เป็นตัวดักจับเซลล์ซึ่งในการทดลอง

จะใช้เซลล์มะเร็งของหนูที่ถูกย้อมด้วยสีเขียวและถูกนำใส่เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยการหยดเข้าที่ทางเข้า จากนั้นใส่แรงทางไฟฟ้าเข้าไปด้วยความต่างศักย์ 10 โวลต์ (10V_{pp}) เพื่อทำให้เกิดการดักเซลล์หลังจากนั้นทำการล้างด้วยสารละลายซูโคสเพื่อทำการกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกดักในหลุมออกต่อมาได้ทำการให้ความต่างศักย์อีกครั้งเพื่อเป็นการนำเซลล์ที่มีมากกว่า 1 เซลล์ออกจากหลุมโดยจากการทดลองที่กล่าวมานี้เมื่อทำการเพิ่มความต่างศักย์และความเข้มข้นของสารละลายแล้วปรากฏว่าเซลล์ที่ดักได้นั้นไม่เกิดอันตรายหรือทำให้เซลล์ตายได้

จากการศึกษารายงานเกี่ยวกับการใช้แรงแม่เหล็กและไฟฟ้าเข้ามาเกี่ยวข้องกับการดักจับเซลล์ทำให้พบเห็นถึงปัญหาของทั้งสองวิธีนี้คือไม่สามารถดักเซลล์ให้มีจำนวนมากได้เนื่องจากมีพื้นที่สำหรับดักจับอยู่เป็นบริเวณน้อย อีกทั้งยังมีเรื่องของข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่มีวิธีการสร้างที่ค่อนข้างซับซ้อนและยุ่งยากเพราะว่าการที่จะทำการดักจับด้วยแรงทางไฟฟ้านั้นจำเป็นจะต้องสร้างแท่งอิเล็กโทรดขึ้นมาเพื่อเป็นแหล่งจ่ายไฟฟ้า ในทางกลับกันการดักจับเซลล์ด้วยแรงแม่เหล็กนั้นมีเพียงแค่แม่เหล็กถาวรก็เพียงพอที่จะดักจับเซลล์ได้แล้ว อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้อาจจะทำให้คุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงได้

2.2.2 การดักจับเซลล์โดยไม่ใช้แรงภายนอก (Passive)

การดักจับเซลล์ด้วยวิธีการนี้จะเป็นการอาศัยการไหลของของไหลเพื่อนำพาเซลล์หรืออนุภาคให้เข้าสู่อุปกรณ์เพื่อเป็นการดักจับเซลล์โดยที่การดักจับเซลล์นี้จะไม่ทำให้เซลล์เกิดการตายและเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวิตหรือถ้าเกิดก็จะส่งผลน้อยมาก อย่างไรก็ตามการดักจับเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะสามารถดักเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์ได้ด้วยวิธีที่หลากหลาย ซึ่งวิธีที่นิยมในการดักจับเซลล์นี้คือการดักจับเซลล์ด้วยหลุมขนาดเล็ก (Microwell)

2.2.2.1 การดักจับเซลล์ด้วยการไหล (Hydrodynamic Trapping)

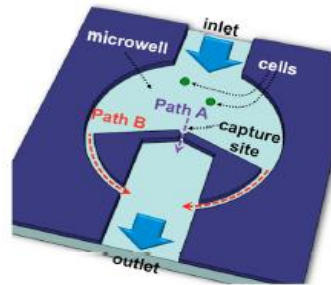
การไหลของของไหลนั้นสามารถนำพาอนุภาคหรือเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ได้และของไหลนี้ยังส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์น้อยกว่าการใช้แรงอื่นๆ เข้ามาช่วยสำหรับการดักเซลล์ ดังนั้นจึงมีการคิดค้นและพัฒนาอุปกรณ์การดักจับเซลล์ด้วยการใช้ของไหลขึ้นซึ่งในปี 2011 J. Chung et al. [20] ได้เสนอการสร้างอุปกรณ์เพื่อใช้ดักจับเซลล์เดี่ยวด้วยการใช้ของไหลขึ้นมา โดยอุปกรณ์ดังกล่าวที่จะถูกออกแบบให้มีลักษณะเป็นช่องการไหลและภายในช่องการไหลจะมีหลุมขนาดเล็กอยู่ เมื่อมีของไหลผ่านเข้ามาในช่องการไหลจะส่งผลให้เกิดทิศทางการไหลดังรูปที่ 2.1 (ก) คือของไหลจะไหลผ่านเข้าที่ช่องทาง A ก่อนและเมื่อมีอนุภาคหรือเซลล์ไปขวางกั้นจะทำให้อนุภาคหรือเซลล์ที่ไหลตามมาเปลี่ยน

ทิศการไหลไปตามช่องทาง B แทน โดยในการออกแบบจะมีพารามิเตอร์ที่สำคัญอยู่สองส่วน คือ L_B/L_A และ W_B/W_A (L คือความยาวและ W คือความกว้างของช่องทาง A และ B) ซึ่งการทดลองจะให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดจะต้องทำให้ค่า L_B/L_A มาก และ W_B/W_A น้อยแต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดอยู่คือ W_A จะต้องออกแบบให้เล็กกว่าขนาดอนุภาคที่เราต้องการจะดัก W_B และความสูงจะต้องใหญ่ เนื่องจากป้องกันการเกิดการติดขัดเพื่อทำให้ของไหลไหลได้สะดวกซึ่งในงานทดลองนี้ได้ออกแบบให้มีอัตราส่วนของช่อง A:B 4 แบบคือ 1:20, 1:40, 1:80 และ 1:160 และเมื่อทำการทดลองกับอนุภาคขนาด $15 \mu\text{m}$ ที่ความเข้มข้น $1.8 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ ด้วยอัตราการไหล $1.5 \mu\text{l/min}$ พบว่าหลังจากที่เปิดปล่อยให้ของไหลไหลเข้ามาจะใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาทีก็สามารถดักจับเซลล์ได้แล้วซึ่งประสิทธิภาพของอุปกรณ์จะนับจากหลุมขนาดเล็กจำนวน 8 หลุม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (ข) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ประสิทธิภาพและความยาวโดยที่กำหนดให้มีอัตราส่วนความกว้างเป็น $2.5 \mu\text{m}$ ผลปรากฏว่าการทดลองกับเซลล์จริงโดยใช้ความเข้มข้น $5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ สามารถดักเซลล์ได้มากกว่า 80%

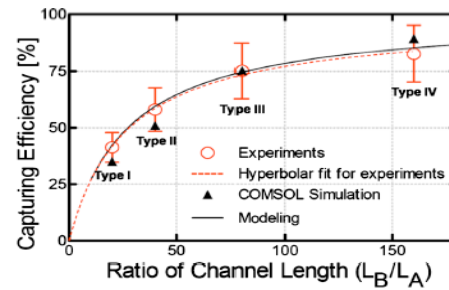
2.2.2.2 การดักจับเซลล์ด้วยหลุมขนาดเล็ก (Microwell Trapping)

ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงการดักเซลล์ด้วยการใช้หลุมขนาดเล็กโดยจะแบ่งการดักเซลล์เพื่อศึกษาเป็นแบบเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์ ปี 2007 H. C. Moeller et al. [21] ได้เสนอวิธีการใช้หลุมขนาดเล็กเพื่อใช้ดักจับเซลล์โดยการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ embryonic stem ทางด้านรูปร่าง ขนาดและความไม่เข้ากันของเซลล์ดังกล่าว ซึ่งเซลล์จะถูกดักในหลุมที่มีขนาดแตกต่างกัน 5 ขนาดคือ 50, 70, 100, 150 และ $175 \mu\text{m}$ แต่มีความลึกเท่ากันหมดคือ $20 \mu\text{m}$ โดยหลุมแต่ละขนาดนั้นจะถูกทำมาจาก Poly ethylene glycol (PEG) ที่มีมวลโมเลกุลต่างกัน (มวลโมเลกุล 258, 330, 575 และ 1,000) ทั้งนี้คุณสมบัติของ PEG จะป้องกันไม่ให้เซลล์เหล่านั้นติดกับพื้นผิวอีกด้วย

ในสองปีต่อมา S. Lindstrom et al. [22] ได้ศึกษาและพัฒนาการรวมกันของอุปกรณ์ขึ้นมา โดยอุปกรณ์นี้สามารถดักจับเซลล์ด้วยหลุมขนาดเล็กซึ่งอุปกรณ์ดังกล่าวจะเป็นการรวมกันระหว่าง 1) บั้มขนาดเล็ก 2) ช่องการไหลที่ทำจาก PDMS ซึ่งจะมีหลุมขนาดเล็กอยู่ประมาณ 40 หลุม 3) บ่อพักสำหรับป้อนเซลล์เข้าอุปกรณ์และ 4) แผ่นกระจก ผลที่ได้นั้นสามารถพิสูจน์การทำงานของอุปกรณ์ที่ได้สร้างขึ้นมาว่าสามารถดักจับเซลล์ได้จริงดังรูป 2.2 อุปกรณ์นี้สามารถดักเซลล์ได้และใช้เวลาน้อยสำหรับการดักจับเซลล์ รวมไปถึงระบบการดักจับเซลล์นี้จะไม่ทำให้เซลล์เกิดการเสียหายระหว่างการทดลอง

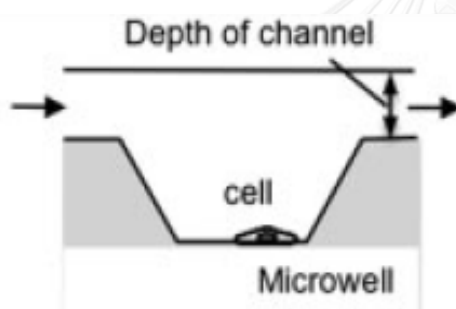


(ก)

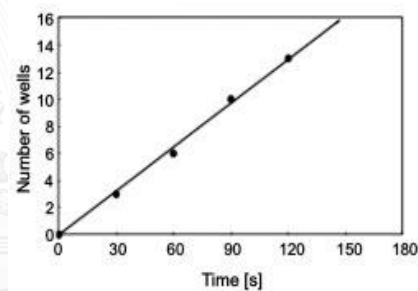


(ข)

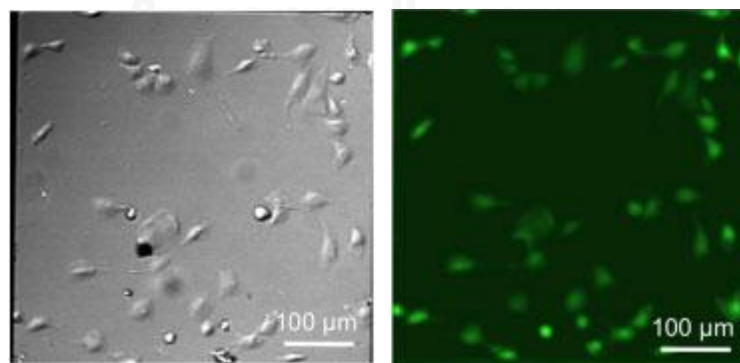
รูปที่ 2.1 ตัวอย่างของอุปกรณ์ที่ใช้แรงการไหล ก) เส้นทางการไหลภายในหลุมขนาดเล็ก ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพและอัตราส่วนความยาว [20]



(ก)



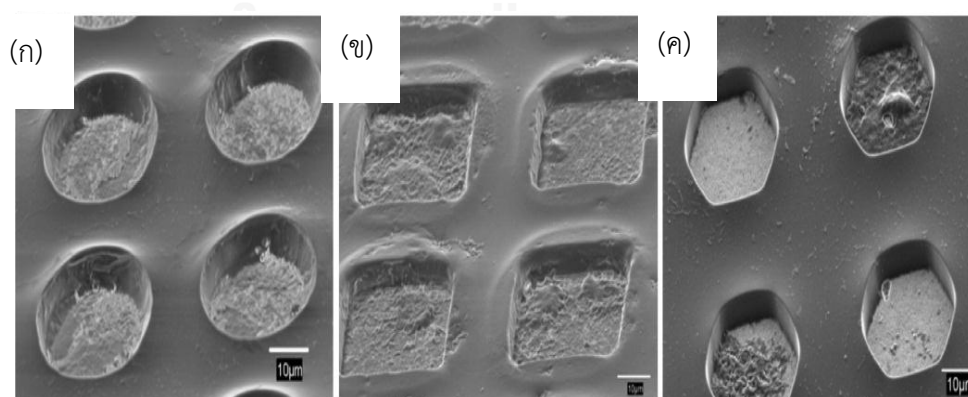
(ข)



(ค)

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างของหลุมขนาดเล็ก ก) หลุมขนาดเล็กที่มีเซลล์อยู่ด้านล่างของหลุม ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนหลุมที่ของไหลเคลื่อนที่ผ่าน ค) การดักจับเซลล์ (ซ้าย-ไม่ย้อมสีขวา-ย้อมสี) [22]

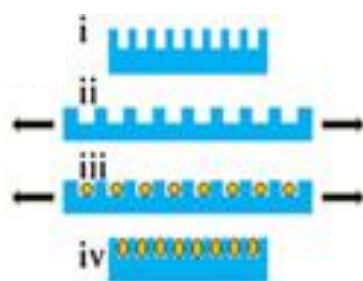
หลังจากนั้นในปี 2010 N. Ferrell et al. [23] ได้คิดค้นและพัฒนาวิธีการป้อนเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยการทำให้บริเวณที่ต้องการเป็นสุญญากาศด้วยความดัน 17-58 กิโลปาสกาล โดยงานนี้จะเป็นการศึกษาหาจำนวนของเซลล์ที่ติดและไม่ติดกับพื้นผิวในหลุมที่ดักเซลล์ได้ สำหรับการทดลองครั้งนี้จะใช้เซลล์ NIH 3T3 และ THP-1 ซึ่งเริ่มแรกนั้นจะเป็นการป้อนเซลล์ NIH 3T3 เข้าไปในหลุมสองขนาดคือ 20 และ 50 μm โดยหลุมขนาด 50 μm จะป้อนเซลล์ด้วยความเข้มข้น 100, 200 และ 300 cells/mm² ที่อัตราการไหล 5 ถึง 25 nL/min ต่อหลุม ในขณะที่หลุมขนาด 20 μm ป้อนเซลล์ด้วยความเข้มข้น 300, 450 และ 600 cells/mm² อัตราการไหล 0.8 ถึง 4 nL/min ต่อหลุม จากนั้นจะทำการวัดความเข้มข้นที่รูปร่างของหลุมต่างกันสามแบบ คือ วงกลม สี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม โดยรูปที่ 2.3 (ก) แสดงถึงผลการทดลองของเซลล์ NIH 3T3 ในหลุมวงกลมแต่ละอันเป็นแบบเซลล์เดี่ยวส่วนในรูปที่ 2.3 (ข) แสดงถึงเซลล์ที่อยู่ในหลุมสี่เหลี่ยมโดยบนซ้ายด้านล่างขวาจะเห็นเซลล์มากกว่าหนึ่งเซลล์และรูป 2.3 (ค) จะเห็นว่าทั้งสองหลุมที่ว่างอยู่ไม่สามารถดักจับเซลล์ได้ทำให้การทดลองครั้งต่อไปใช้รูปร่างของหลุมเป็นรูปวงกลมเนื่องจากสามารถดักได้เป็นเซลล์เดี่ยวมากกว่ารูปร่างอื่น โดยประสิทธิภาพของการทำงานของอุปกรณ์นี้พบว่า 95% สามารถดักเซลล์ให้ลงหลุมได้ ซึ่งที่หลุมขนาด 20 μm ยิ่งความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นประสิทธิภาพการดักเซลล์ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วยแต่อัตราการดักได้มากกว่า 1 เซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นตามเช่นกัน (50% ที่เป็นเซลล์เดี่ยว) และขนาดหลุม 50 μm ก็จะมีแนวโน้มเดียวกันกับหลุมขนาด 20 μm แต่จะมีโอกาสการดักเซลล์ได้มากกว่า 1 เซลล์เนื่องจากมีขนาดหลุมที่ใหญ่กว่า (74% ที่ดักได้ 1-3 เซลล์) กล่าวโดยสรุปของอุปกรณ์นี้ว่าสามารถดักเซลล์ได้ทั้งที่เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติติดและไม่ติดกับพื้นผิวได้อีกทั้งยังสามารถดักจับเซลล์ที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้



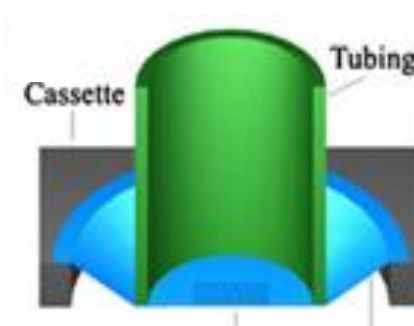
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างของหลุมขนาดเล็ก (ก-ค) แสดงการดักเซลล์ NIH 3T3 ในหลุมขนาดเล็กที่มีรูปร่างต่างกัน [23]

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังมีเทคนิคการดักจับเซลล์อยู่เป็นจำนวนมากแถมยังคงมีราคาถูก เพื่อทำให้เกิดเทคนิคที่ใช้ง่ายต่อการใช้งานและก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูง Y. Wang et al. [24] จึงได้พัฒนาและคิดค้นวิธีการดักจับเซลล์เดี่ยวแบบใหม่ขึ้นมาภายใต้แนวคิดที่ว่าอุปกรณ์นี้จะต้องสามารถยืดหยุ่นได้และต้องเป็นอุปกรณ์ที่สามารถใช้งานได้ง่ายไม่ซับซ้อนมากนักซึ่งคุณสมบัติของพลาสติกสามารถตอบโจทย์ได้ดีที่สุดจึงได้ทำการเลือกเป็น PDMS มาสร้างเป็นอุปกรณ์ขึ้น ดังนั้นการดักจับเซลล์ของงานนี้จะใช้ประโยชน์จากการยืดหยุ่นของ PDMS มาเป็นตัวช่วยสำหรับการดักจับเซลล์ โดยหลักการทำงานของอุปกรณ์จะเริ่มจากการกดท่อ (สีเขียว) ลงไปเพื่อให้เกิดการยืดออกของ PDMS (สีฟ้า) และเมื่อปล่อยจะทำให้ PDMS กลับมาสู่สภาพเดิมดังรูปที่ 2.4 (ก และ ข) โดยหลุมที่ทำจาก PDMS จะมีขนาด $12\ \mu\text{m}$ ลึก $15\ \mu\text{m}$ ซึ่งเมื่อเกิดการยืดออกแล้วจะส่งผลให้หลุมมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น $20\ \mu\text{m}$ จากนั้นจะนำเซลล์ที่ดักได้ไปวิเคราะห์หาพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยการย้อมสี เป็นต้น โดยการที่จะนำเซลล์ออกจากหลุมเพื่อไปวิเคราะห์นั้นทำโดยการใช้เข็มขนาดที่มีขนาด $12.5\ \mu\text{m}$ จิ้มไปที่ด้านหลังของ PDMS เพราะว่าบริเวณนี้จะทำให้เกิดการคลายตัวของ PDMS และทำให้เซลล์หลุดออกมาได้

การทดลองกับอุปกรณ์นี้จะใช้เซลล์ Ba/F3 ซึ่งจะหยุดสารละลายที่มีเซลล์อยู่ลงตรงท่อที่เรา กดเพื่อให้ PDMS ยืดออกซึ่งการดักจับเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.5 (ก) และลูกศรสีแดงคือเป้าหมายในการเอาเซลล์ออกโดยใช้เข็มขนาดเล็กหลังจากที่เอาเซลล์ออกจากหลุมแสดงดังรูปที่ 2.5 (ข และ ค) จากนั้นนำเซลล์ที่ออกจากหลุมมาใส่ในงานเพาะเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่อไปดังรูปที่ 2.5 (ง) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการพิสูจน์ความคงที่ของอุปกรณ์ด้วยการเปรียบเทียบกับระหว่าง PDMS ที่ถูกยืดและไม่ถูกยืดในการดักเซลล์โดยผลการทดลองที่ได้คือ PDMS ที่ถูกยืดนั้นสามารถดักได้ $99.5\pm 0.3\%$ แต่ PDMS ที่ไม่ถูกยืดออกดักเซลล์ได้เพียง $68.9\pm 18.6\%$ ดังนั้นอุปกรณ์นี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักเซลล์ได้มากขึ้นและสามารถดักจับได้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย

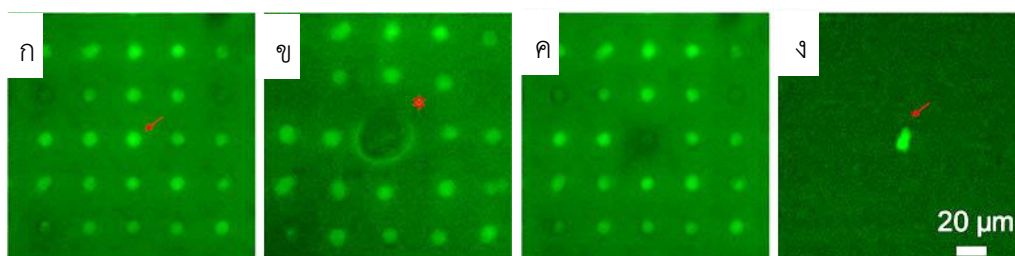


(ก)



(ข)

รูปที่ 2.4 หลุมขนาดจุลภาคแบบยืดหยุ่น ก) หลุมขนาดเล็กที่สามารถยืดหยุ่นได้ ข) ท่อสำหรับใส่สารละลายและทำหน้าที่เป็นตัวขยายหลุมให้มีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกดด้วยแรง [24]



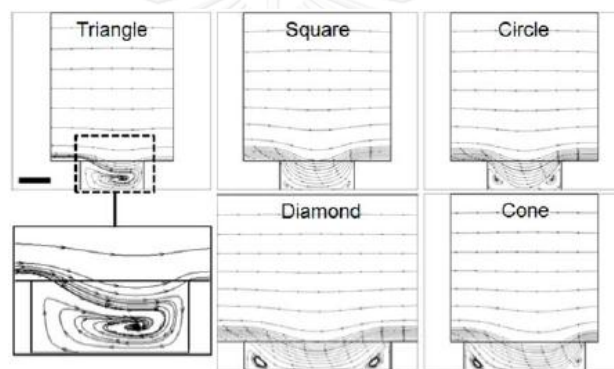
รูปที่ 2.5 แสดงการดักเซลล์และนำเซลล์ออกจากหลุมขนาดเล็ก [24]

จากนั้นในปี 2015 M. Kawai et al. [25] ได้เสนอวิธีการสร้างอุปกรณ์การดักเซลล์ด้วยวิธีการประกอบตัวของโมเลกุลให้วางเป็นระเบียบ (self-assembly) โดยกระบวนการสร้างอุปกรณ์นี้จะใช้การวางตัวของ Polystyrene particles ขนาด $3\ \mu\text{m}$ หลังจากนั้นจะใช้วิธีการกัดกร่อนให้เกิดเป็นหลุมตามการวางตัวของอนุภาคโดยจะเริ่มการกัดกร่อนเป็นเวลา 170 วินาทีแล้วจะทำให้มีขนาดของอนุภาคเล็กลงเหลือ $2.4\ \mu\text{m}$ และจากนั้นปล่อยให้กัดกร่อนต่อไปเป็นเวลา 190 วินาทีขนาดของอนุภาคจะเล็กลงเหลือ $2.2\ \mu\text{m}$ โดยการกัดกร่อนเหล่านี้จะใช้เป็นการพิจารณาของหลุมที่จะใช้ดักเซลล์ด้วย หลังจากที่ทำกรกัดกร่อนแบบเรียบร้อยแล้วจะทำการใส่ PDMS เหลวลงไปบนหลุมที่เราได้ทำการสร้างไว้ตอนต้นและเมื่อทำการกัดกร่อนเป็นเวลา 170 และ 190 วินาที พบว่าหลุมที่ได้มีขนาด 2.2 และ $2.5\ \mu\text{m}$ และมีความลึกจะเป็น 0.80 และ $1.47\ \mu\text{m}$ ตามลำดับ จากการสร้างหลุมขนาดเล็กนี้พบว่ากรกัดกร่อนที่เวลา 170 วินาทีจะได้ผลที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดตั้งต้นซึ่งเป็นผลมาจาก PDMS ไม่ได้ซึมเข้าไปที่ช่องว่างของอนุภาคที่เรียงตัวกันแบบ HCP นั้นเอง แต่ในทางกลับกันการกัดกร่อนที่เวลา 190 วินาทีจะมีขนาดของหลุมใหญ่กว่าขนาดตั้งต้นเล็กน้อยทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากการยึดออกของ PDMS ระหว่างการดึงออกมาจากแม่แบบเพราะว่าช่องว่างระหว่างอนุภาคมีขนาดใหญ่

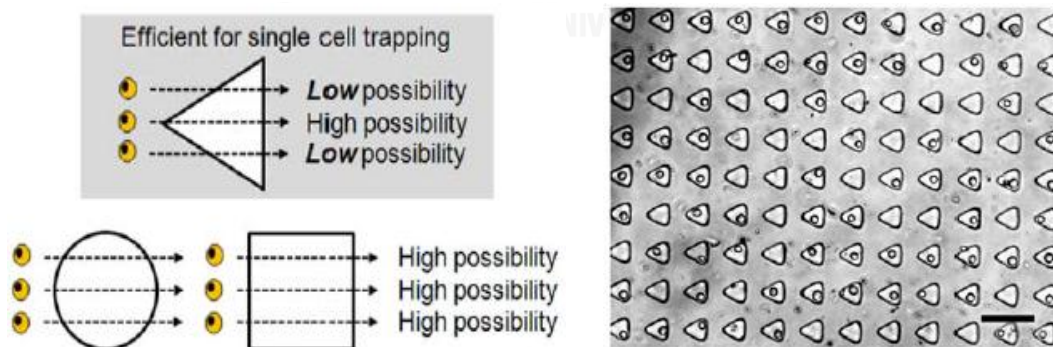
หลังจากที่ได้อุปกรณ์สำหรับการดักเซลล์ไปทำการปรับปรุงคุณสมบัติให้ไวต่อน้ำเพื่อนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์ถึงผลกระทบของเซลล์ที่มีต่อพื้นผิวโดยเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะใช้เป็นเซลล์แบคทีเรียที่มีขนาด $1.9\text{-}3\ \mu\text{m}$ ที่ความเข้มข้น 2.1×10^8 cells/ml จากนั้นทำการบ้อนสารละลายเข้าสู่อุปกรณ์ด้วยการหยดบนอุปกรณ์ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่าหลุมขนาด $2.2\ \mu\text{m}$ สามารถดักเซลล์ได้ 47.6% และขนาดของหลุม $2.5\ \mu\text{m}$ สามารถดักเซลล์ได้ 46%

J. Y. Park et al. [14] อธิบายถึงวิธีการใช้การไหลมาทำให้เกิดการดักจับเซลล์ในหลุมขนาดเล็ก โดยในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะดักเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยการออกแบบอุปกรณ์ที่มีรูปรังเป็นสี่เหลี่ยมและมีหลุมวางอยู่ที่พื้นของสี่เหลี่ยมนั้นโดยจะมีรูปร่างของหลุมที่ต่างกัน 5 แบบคือ

สามเหลี่ยม สี่เหลี่ยม วงกลม ข้ามหลามตัด และรูปกรวย ซึ่งก่อนที่จะทำการทดลองจริงได้มีการใช้โปรแกรมจำลองการไหลเพื่อดูประสิทธิภาพของการดักจับซึ่งจากผลการจำลองการไหลพบว่ารูปสามเหลี่ยมมีโอกาสที่จะดักเซลล์ได้มากกว่ารูปทรงอื่นๆ เนื่องจากภายในของหลุมสามเหลี่ยมนั้นเกิดลักษณะการไหลหมุนวนที่มีขนาดใหญ่กว่ารูปทรงอื่น อีกทั้งยังมีโอกาสดักได้เป็นเซลล์เดี่ยวได้มากกว่าด้วย ดังรูปที่ 2.6 (ก และ ข) ในรายงานนี้ได้ทำการทดลองการดักจับเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและเม็ดอนุภาคโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายอยู่ที่ 1.5×10^6 cell/ml ซึ่งสารละลายนี้จะถูกป้อนเข้าด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 0.18 ml/h อุปกรณ์นี้สามารถดักจับเซลล์ได้ $62 \pm 10\%$ ซึ่งในแต่ละการทดลองนั้นได้ทำการสุ่มพื้นที่จำนวนสามพื้นที่จากช่องการไหล ดังรูปที่ 2.6 (ค) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบหลายอย่างมากเมื่อเทียบกับรายงานอื่นๆ ซึ่งใช้ประโยชน์ของ microfluidic ได้อย่างสะดวก และสามารถดักเซลล์มีความรวมถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้เนื่องจากหลุมขนาดเล็กยังคงมีพื้นที่ว่างพอที่จะทำให้เซลล์เติบโตต่อได้ ซึ่งสามารถสรุปรายละเอียดของงานวิจัยในอดีตไว้ ดังตารางที่ 2.1



จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก) วิทยาลัย



(ข)

(ค)

รูปที่ 2.6 ตัวอย่างการดักจับอนุภาคด้วยหลุมขนาดจุลภาค ก) ผลของการไหลหมุนวนภายในหลุมรูปทรงต่างๆ ข) ความเป็นไปได้สำหรับการดักเซลล์เดี่ยว ค) การดักจับเซลล์ที่ได้จากอุปกรณ์ [14]

ตารางที่ 2.1 วิธีการดักจับเซลล์ด้วยเทคนิคต่างๆ

Author	Adam Winkleman, Katherine L. Gudiksen, Declan Ryan, George M. Whitesides	Hannes-Christian Moeller, Matthew K. Mian, Shamit Shrivastava, Bong Geun Chung, Ali Khademhosseini	Sara Lindstrom, Kiichiroh Mori, Toshiro Ohashi, Helene Andersson- Svahn
Name	A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer	A microwell array system for stem cell culture	A microwell array device with integrated microfluidic components for enhanced single-cell analysis
Years	2004	2007	2009
Shape of well	-	Circle	Rectangle
Type of particle	polystyrene bead	Embryonic stem (ES) cells	Calcein AM Cell
Materials	-	polyethylene glycol	PDMS
Efficiency	-	60%	-
Cell Suspension	$2.8 \times 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{mol}$	$4 \times 10^2 \text{ cells/mm}^2$	-
Feed technique	Drop Cell	Drop cell	Micro pump
Flow rate	-	-	1.3 ml/h
Target	Single	Multiple	Multiple

ตารางที่ 2.1 วิธีการดักจับเซลล์ด้วยเทคนิคต่างๆ (ต่อ)

Author	Joong Yull Park, Mina Morgan, Aaron N. Sachs, Julia Samorezov, Ryan Teller, Ye Shen Kenneth J. Pienta, Shuichi Takayama	Jaehoon Chung, Young-Ji Kim, and Euisik Yoon	Nicholas Ferrell, Daniel Gallego-Perez, Natalia Higuera-Castro, Randall T. Butler, Rashmeet K. Reen, Keith J. Gooch, and Derek J. Hansford
Name	Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation	Highly-efficient single-cell capture in micro-fluidic array chips using differential hydrodynamic guiding structures	Vacuum-Assisted Cell Seeding in a Microwell Cell Culture System
Years	2010	2010	2010
Shape of well	Triangle	-	Circles, Squares, Hexagons
Type of particle	Human PC3 prostate	PC3 cells and Polystyrene bead	NIH 3T3 cells, THP-1 cells, PANC-1 cell
Materials	PDMS	PDMS	PDMS
Efficiency	62±10%	>80%	95%
Cell suspension	1.5x10 ⁶ cell/ml	5x10 ⁴ cell/ml 1.8x10 ⁵ bead/ml	100-600 cell/mm ²
Feed technique	Pump	Syringe pump	Vacuum
Flow rate	0.18 ml/h	1.5 µl/min	0.8-4 nL/min
Target	Single	Single	Single, multiple

ตารางที่ 2.1 วิธีการดักจับเซลล์ด้วยเทคนิคต่างๆ (ต่อ)

Author	Yuli Wang, Pavak Shan, Colleen Phillips & Christopher E. Sims & Nancy L. Allbritton	Yuki Yoshimura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, and Tomoyuki Yasukawa	Miho Kawai, Teppei Nogami, Kyohei Takano, Akinori Okumura, Katsuyoshi Nakazato, Masahiko Ikeuchi & Sachiko Matsushita
Name	Trapping cells on a stretchable microwell array for single-cell analysis	Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectro-phoresis	Single-cell Trapping Using Microwell Arrays Fabricated from Self-assembled Particle Monolayers
Years	2012	2014	2014
Shape of well	Circle	Rectangles	Circle
Type of particle	Ba/F3 cells	Mouse myeloma cells	Bacteria cell
Materials	PDMS	p-DEP	PDMS
Efficiency	65.3±7.6%	65-85%	44-64%
Cell suspension	1.25×10^6 cells/cm ²	4×10^7 cell/ml	2.1×10^8 cells/ml
Feed technique	Drop Cell	Drop cell	Drop Cell
Flow rate	-	-	-
Target	Single	Single	Single

ตารางที่ 2.1 วิธีการดักจับเซลล์ด้วยเทคนิคต่างๆ (ต่อ)

Author	Olivier Frey, Fabian Rudolf, Gregor W. Schmidt, Andreas Hierlemann	J. Pivetal, D. Royet, G. Ciuta, M. F. Robin, N. Haddour, N. M. Dempsey, F.Dumas-Bouchiat, P. Simonet
Name	A versatile, simple-to-use microfluidic cell-culturing chip for long-term, high-resolution time-lapse imaging	Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning
Years	2015	2015
Shape of well	Hexagonal	-
Type of particle	<i>S. cerevisiae</i> cells	bacterial cells
Materials	PDMS	Micro-magnet
Efficiency	-	-
Cell suspension	5×10^7 cell/ml	10^9 bacteria/mL
Feed technique	Drop Cell	Drop Cell
Flow rate	>1 μ l/min	-
Target	Multiple	Multiple

2.3 สรุป

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดักจับเซลล์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว เพื่อนำเซลล์ที่ดักจับได้ไปทำการเพาะเลี้ยงและศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพในงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งอุปกรณ์และวิธีการดักจับเซลล์ในปัจจุบันมีมากมายหลายวิธีทำให้เราสามารถเลือกนำวิธีการต่างๆ มาประยุกต์ใช้กับงานให้เกิดความเหมาะสมได้ ซึ่งการดักจับเซลล์นี้จะมีสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ไม่ใช้แรงภายนอกมาดักจับเซลล์ จะเป็นการอาศัยการไหลของของไหลเพื่อใช้ดักจับเซลล์ และอีกกลุ่มคือใช้แรงภายนอกเข้ามาดักจับไม่ว่าจะเป็นแรงทางไฟฟ้า แรงทางแม่เหล็ก เป็นต้น แต่ในงานวิจัยนี้คำนึงถึงคุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์เป็นหลักดังนั้นเราจึงเลือกหลักการการดักจับเซลล์โดยไม่ใช้แรงภายนอกเข้ามาดักจับเซลล์เนื่องจากหากมีแรงภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้องอาจจะส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์ที่ดักจับได้

จากการศึกษาวิจัยในอดีตระหว่างปี 2004 ถึง 2015 ของอุปกรณ์การดักจับเซลล์พบว่ามีการใช้งานเพื่อดักจับอนุภาค เซลล์แบคทีเรีย เซลล์มะเร็ง เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาจะมีทั้งการป้อนเซลล์ด้วยการหยดสารละลายจากปิเปตเข้าที่ตัวอุปกรณ์โดยตรงซึ่งการป้อนด้วยการหยดสารละลายนี้จะเป็นระบบเปิด แต่ถ้าเป็นการใช้ปั๊มเพื่อป้อนสารละลายนั้นจะเป็นระบบปิดซึ่งสามารถที่จะรวมอุปกรณ์เข้าเป็นอุปกรณ์เดี่ยวได้โดยที่สารละลายที่ใช้สำหรับการป้อนเข้าอุปกรณ์นี้จะอยู่ในช่วง 1.8×10^5 ถึง 10^9 cell/ml ทั้งนี้วัสดุที่นำมาใช้จะเป็น PDMS เนื่องจาก PDMS เป็นโพลิเมอร์ที่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของเซลล์ไม่มากนักและยังสามารถหาได้ง่ายและราคาไม่สูงมาก

นอกจากนี้การดักจับเซลล์มีทั้งการดักจับที่เป็นเซลล์เดี่ยวและดักจับให้ได้หลายเซลล์ขึ้นอยู่กับความต้องการของแต่ละงานว่าต้องการศึกษาประเภทใด ถ้าหากต้องการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ก็ต้องทำการดักจับเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวและการดักจับเซลล์ที่เป็นแบบหลายเซลล์จะเป็นการศึกษาผลที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์เหล่านั้น ซึ่งอุปกรณ์สำหรับดักจับเซลล์นั้นมีมากมายหลายรูปแบบส่วนมากจะออกแบบให้มีลักษณะเป็นหลุมขนาดเล็ก ซึ่งในแต่ละงานวิจัยจะมีการออกแบบที่ไม่เหมือนกัน เช่น วงกลม สี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม และสามเหลี่ยม โดยส่วนใหญ่เน้นการทดลองจะใช้อัตราการไหลสำหรับดักจับตั้งแต่ 0.18 ml/h ขึ้นไป อย่างไรก็ตามการดักจับเซลล์ของงานวิจัยที่ผ่านมามีประสิทธิภาพของการดักจับประมาณ 40 ถึง 90%

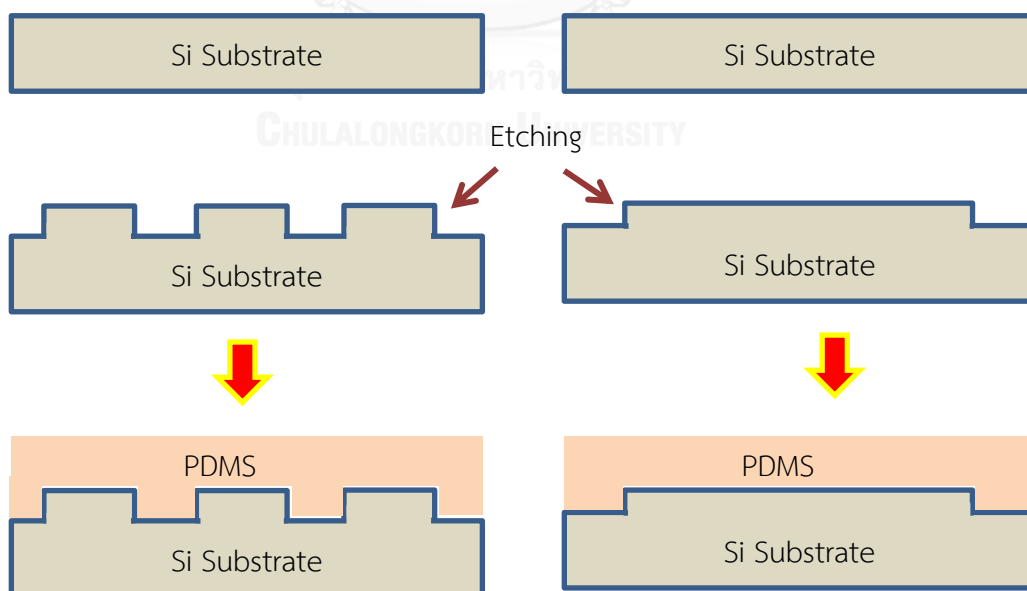
บทที่ 3

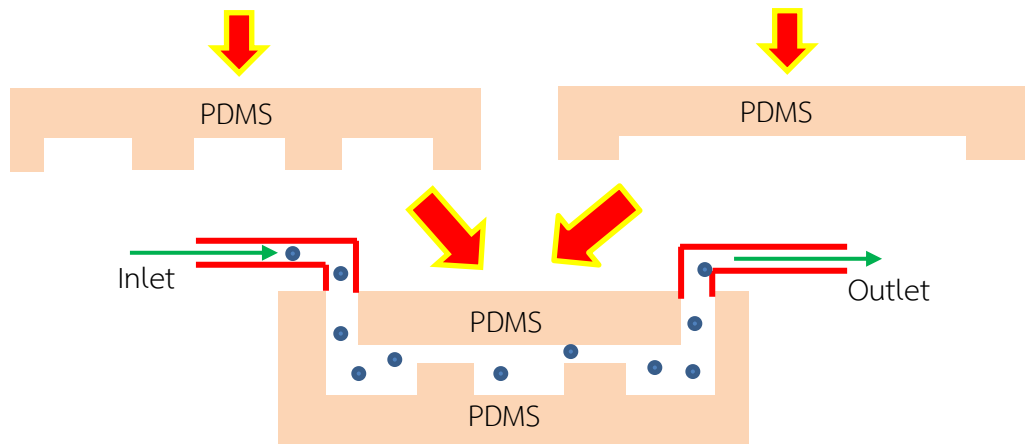
การศึกษาเบื้องต้น

ในบทนี้จะกล่าวถึงกระบวนการสร้างระบบของไหลขนาดเล็ก ขั้นตอนการทดลองของอุปกรณ์สำหรับดักอนุภาคที่อัตราการไหลต่างๆ และการรวบรวมผลการทดลองในเบื้องต้น

3.1 กระบวนการสร้างระบบของไหลขนาดเล็ก

วิธีการสร้างระบบของไหลขนาดเล็กในปัจจุบันจะใช้วิธีที่เรียกว่า ซอฟลิโทกราฟี (Soft Lithography) ซึ่งกระบวนการสร้างจะเริ่มจากการนำฐานรองซิลิกอนมากัดด้วยสารละลาย HF (Hydrofluoric acid) เพื่อทำให้เป็นรูปร่างที่ได้ออกแบบไว้ เมื่อกัดจนได้รูปร่างแล้วให้ล้างออกด้วยสารละลาย IPA (Isopropyl alcohol) ตามด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นลำดับสุดท้าย หลังจากนั้นนำไปเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ขั้นตอนถัดไปคือการเทโพลิเมอร์เหลว PDMS (poly-dimethylsiloxane) ลงแม่พิมพ์ซิลิกอนที่ได้สร้างไว้แล้ว เมื่อสังเกตเห็นว่าโพลิเมอร์กระจายเต็มแม่พิมพ์แล้วให้นำไปอุ่นด้วยความร้อนเพื่อให้โพลิเมอร์นี้แข็งตัว หลังจากนั้นนำโพลิเมอร์ออกจากแม่พิมพ์เพื่อทำการตกแต่ง ก่อนที่จะนำไปประกบกับโพลิเมอร์ [26] อีกชั้นเพื่อสร้างเป็นช่องการไหลด้วยวิธีออกซิเจนพลาสมา (Oxygen Plasma) โดยขั้นตอนจะเป็นไปตามรูปที่ 3.1



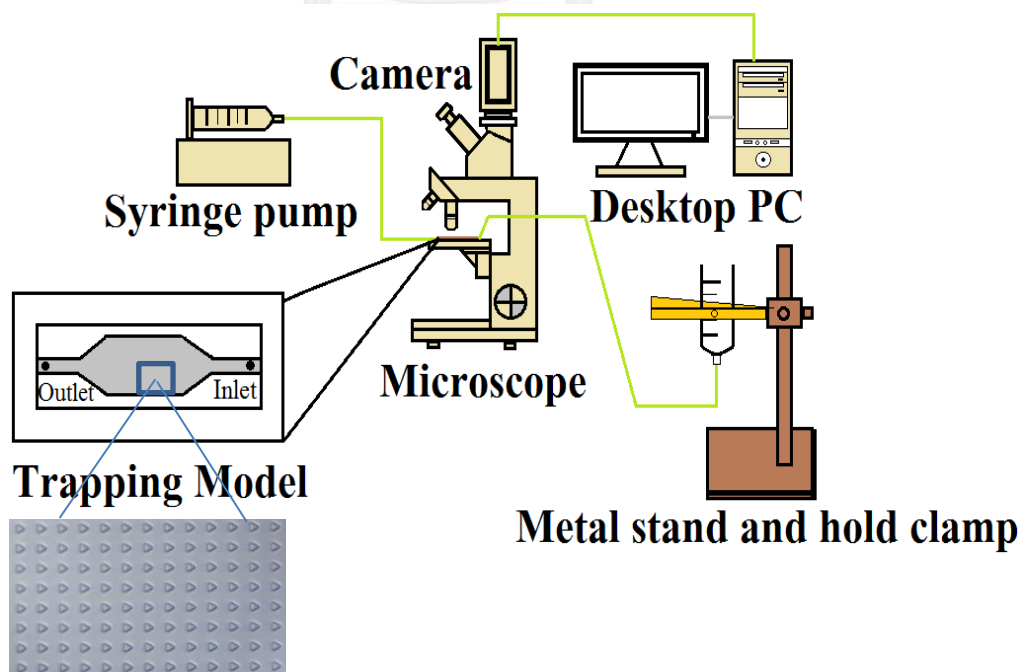


รูปที่ 3.1 กระบวนการสร้างระบบของไหลขนาดเล็ก

3.2 ขั้นตอนการเตรียมการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์ประกอบไปด้วยท่อที่มีความกว้าง 500 ไมโครเมตร ความสูง 160 ไมโครเมตร และความยาว 15 มิลลิเมตร มีช่องทางเข้าสำหรับสารละลายพอลิเมอร์และช่องทางออกสำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งที่ด้านล่างของช่องการไหลจะมีหลุมสามเหลี่ยมด้านเท่าขนาด 40 ไมโครเมตร ลึก 30 ไมโครเมตรวางอยู่ โดยจำนวนหลุมมีทั้งหมด 4,760 หลุม



รูปที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.2 ชุดทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยคอมพิวเตอร์ กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพและบันทึกภาพ อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่มีสายยางต่อที่ท่อทางเข้าและท่อทางออก หลอดฉีดยา และเข็มฉีดยา ขาดังและที่จับหลอดทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.2 สำหรับการทดลองนี้จะใช้เม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 μm เพื่อจำลองเป็นเซลล์

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

เริ่มต้นด้วยการประกอบชุดทดลองเข้าด้วยกัน โดยนำอุปกรณ์สำหรับดักเซลล์มาต่อเข้ากับท่อสายยางที่ช่องทางเข้าและช่องทางออก โดยปลายอีกด้านหนึ่งของท่อสายยางทางเข้านั้นจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาสองหลอดโดยหลอดแรกบรรจุสารละลายผสมเม็ดโพลีเมอร์และหลอดที่สองบรรจุน้ำที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิวซึ่งถูกติดตั้งไว้กับขาดังสำหรับจับหลอดทดลอง และสำหรับปลายท่อสายยางด้านทางออกต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำอยู่เพื่อเป็นการลดฟองอากาศ

การควบคุมอัตราการไหลในการทดลองจะนำกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำต่อเข้ากับ syringe pump โดยทำการตั้งค่าของ syringe pump ให้ทำงานแบบไหลย้อนกลับ (แบบดูด) แล้วจับ syringe pump ตั้งเอียงให้ด้านปลายกระบอกฉีดยาคว่าหน้าลง เพื่อให้ฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในกระบอกฉีดยาลอยขึ้นมาที่ด้านบนเป็นการลดความดันที่เกิดจากฟองอากาศระหว่างทำการทดลองสามารถบันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านซึ่งมีการติดตั้งกล้องบันทึกภาพร่วมกับคอมพิวเตอร์ ในการทดลองใช้กล้องที่มีความละเอียด 3 ล้านพิกเซลและความไว 30 เฟรมต่อวินาที จากนั้นปรับระยะโฟกัสของภาพและกำลังขยายให้เหมาะสม

โดยปกติ ภายในชิ้นงานจะมีอากาศอยู่จึงจำเป็นต้องไล่อากาศโดยการนำอุปกรณ์สำหรับดักเซลล์ไปแช่น้ำแล้วนำไปเข้าระบบสุญญากาศเพื่อกำจัดฟองอากาศออกเป็นเวลา 20 นาที และนำมาประกอบกับชุดทดลอง จากนั้นจึงเริ่มการทดลองและบันทึกภาพ

ในการทดลองนี้ใช้เม็ดโพลีเมอร์ขนาด 10 μm และใช้อัตราการไหลของสารละลายผสมเม็ดโพลีเมอร์ 0.3 และ 0.1 mL/h สำหรับบ่อนอนุภาคให้เข้าไปในอุปกรณ์ และใช้อัตราการไหลของสารทำความสะอาด 0.5 mL/h เพื่อให้อนุภาคที่ตกค้างอยู่หลุดออกจากอุปกรณ์

ในการทดลองของแต่ละอัตราการไหลนั้นจะต้องเริ่มจากฉีดสารละลายโพลีเมอร์เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/h จนสังเกตได้ว่าสารละลายไหลมาเกินครึ่งของสายยางทางเข้าจึงทำการ

ปรับอัตราการไหลให้ลดลงเหลือ 0.1 mL/h (เพื่อลดเวลาในการทดลอง) ซึ่งต้องทำการกวนหลอดฉีดยาที่บรรจุสารละลายโพลิเมอร์ทุก 1 นาที เพื่อไม่ให้สารละลายนั้นเกิดการตกตะกอน

การบันทึกผลจะเริ่มจากการบันทึกวิดีโอเมื่ออนุภาคเคลื่อนที่ผ่านเฟรมที่ตั้งไว้เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาตามกำหนดให้เปลี่ยนจากการฉีดสารละลายโพลิเมอร์มาเป็นสารทำความสะอาดด้วยสวิตช์สามทางและเพิ่มอัตราการไหลให้เป็น 0.5 mL/h เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดอนุภาคที่ไม่อยู่ในหลุมให้ไหลออกจากอุปกรณ์ทำให้ง่ายต่อการนับอนุภาคที่ลงหลุม หลังจากนั้นจึงปิด syringe pump และทำการบันทึกภาพนิ่งที่บริเวณด้านหน้าทางเข้าของอุปกรณ์เพื่อใช้เปรียบเทียบกับการทดลองอื่น

หากมีการทดลองซ้ำกับอุปกรณ์ชุดเดิมจะต้องเริ่มจากการฉีดสารทำความสะอาดเข้าไปภายในอุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/h เพื่อเป็นการล้างทำความสะอาดอนุภาคที่ตกค้างจากการทดลองที่อัตราการไหลอื่นๆ อีกทั้งยังเป็นการช่วยไล่ฟองอากาศ และเพิ่มขั้นตอนการบันทึกภาพนิ่งก่อนเริ่มการทดลองเพื่อใช้เป็นการเปรียบเทียบผลการทดลอง สำหรับอัตราการไหล 0.3 mL/h จะทำการทดลองคล้ายกับอัตราการไหล 0.1 mL/h

3.4 ผลการทดลอง

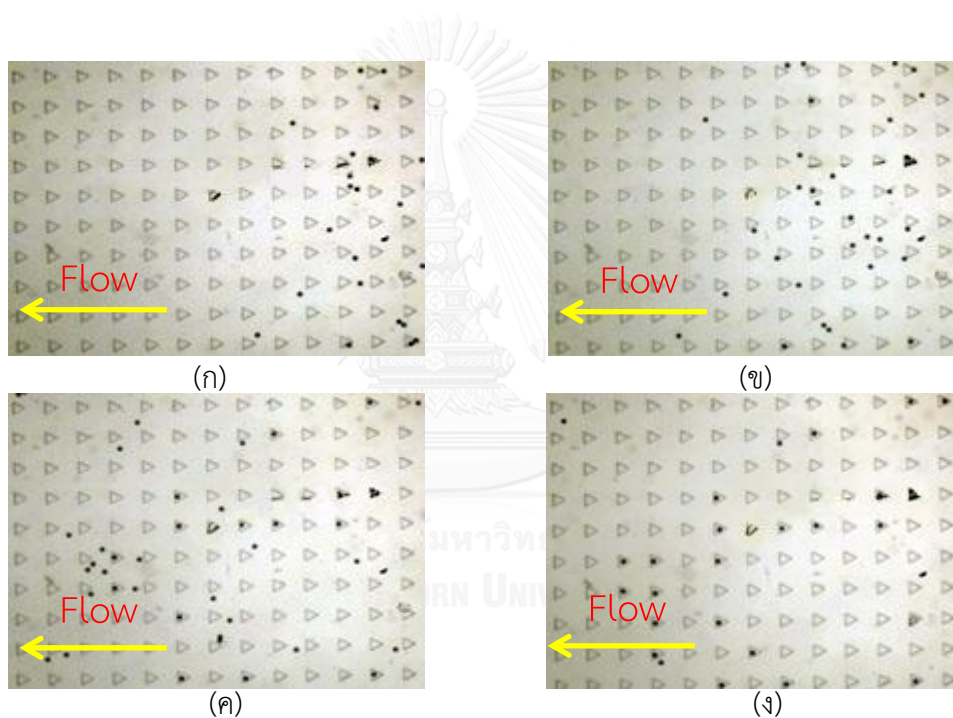
ในส่วนนี้จะอธิบายถึงการวิเคราะห์ผลจากภาพนิ่งและวิดีโอที่ได้จากการทดลอง เริ่มจากการนับจำนวนอนุภาคที่ลงหลุมและคำนวณหาความเร็วของอนุภาคที่ลงหลุมโดยการจับเวลาและระยะเวลาเคลื่อนที่ของอนุภาค

3.4.1 การทดลอง

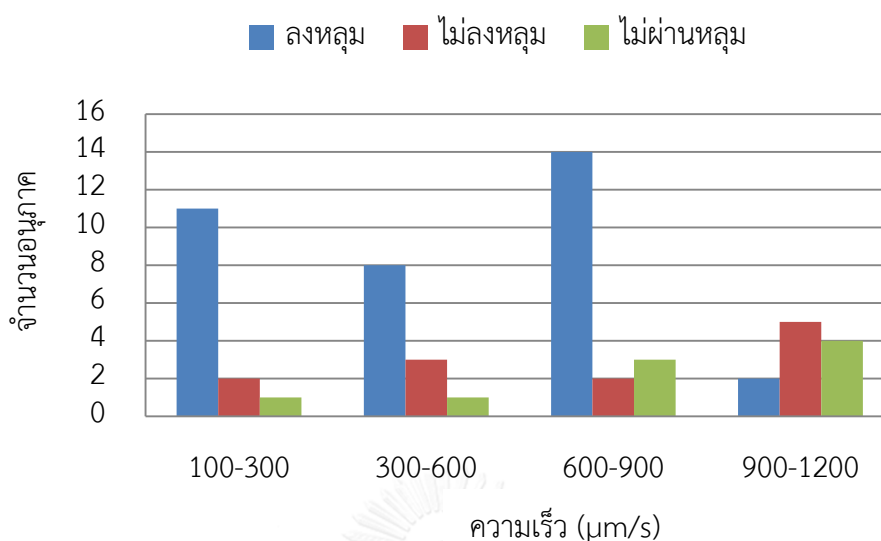
การทดลองจะทำการป้อนสารละลายโพลิเมอร์เข้ามาด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/h เมื่อสังเกตเห็นว่าสารละลายเคลื่อนที่มาเกินครึ่งของสายยางจึงทำการปรับเป็นอัตราการไหลที่ต้องการจะทดลองทั้งนี้เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการทดลองให้สั้นลงเมื่ออนุภาคเข้ามาในระบบแล้วจะทำการบันทึกภาพและวิดีโอเพื่อใช้ในการวัดประสิทธิภาพ โดยจะทำการนับอนุภาคทุกอนุภาคที่ไหลเข้ามาในระยะเวลาที่กล้องสามารถบันทึกได้หลังจากนั้นจะทำการนับอนุภาคที่ลงหลุมและวัดความเร็วซึ่งจะวัดความเร็วจากวิดีโอและดูว่าอนุภาคเคลื่อนที่ไปได้เท่าใดและใช้เวลาเท่าใด โดยจะคำนวณจากความเร็วเฉลี่ยจากอัตราส่วนของระยะทางต่อเวลา

3.4.2 ผลการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 mL/h

การทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์นี้สามารถดักอนุภาคได้ 35 อนุภาคและมีอนุภาคที่ไม่หลงหลุมทั้งหมด 12 อนุภาคจากทั้งหมด 56 อนุภาคคิดเป็นประสิทธิภาพ 62.5 และ 21.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการนับอนุภาคจะนับจากจำนวนของอนุภาคที่ไหลเข้ามาในจุดที่เราตั้งกล้องเตรียมเอาไว้ดังรูปที่ 3.3 โดยความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้อนุภาคลงหลุมได้คือ 540 ไมโครเมตรต่อวินาที ซึ่งความเร็วต่ำสุดและสูงสุดที่ทำให้อนุภาคลงหลุมได้คือ 178 และ 1,085 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และช่วงความเร็วที่ทำอนุภาคลงหลุมและไม่หลงหลุมคือช่วง 600-900 และ 900-1200 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.3 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 mL/h ก) ณ เวลาเริ่มต้น ข) เมื่อเวลาผ่านไป 33 วินาที ค) เมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที่ ง) สิ้นสุดการทดลอง

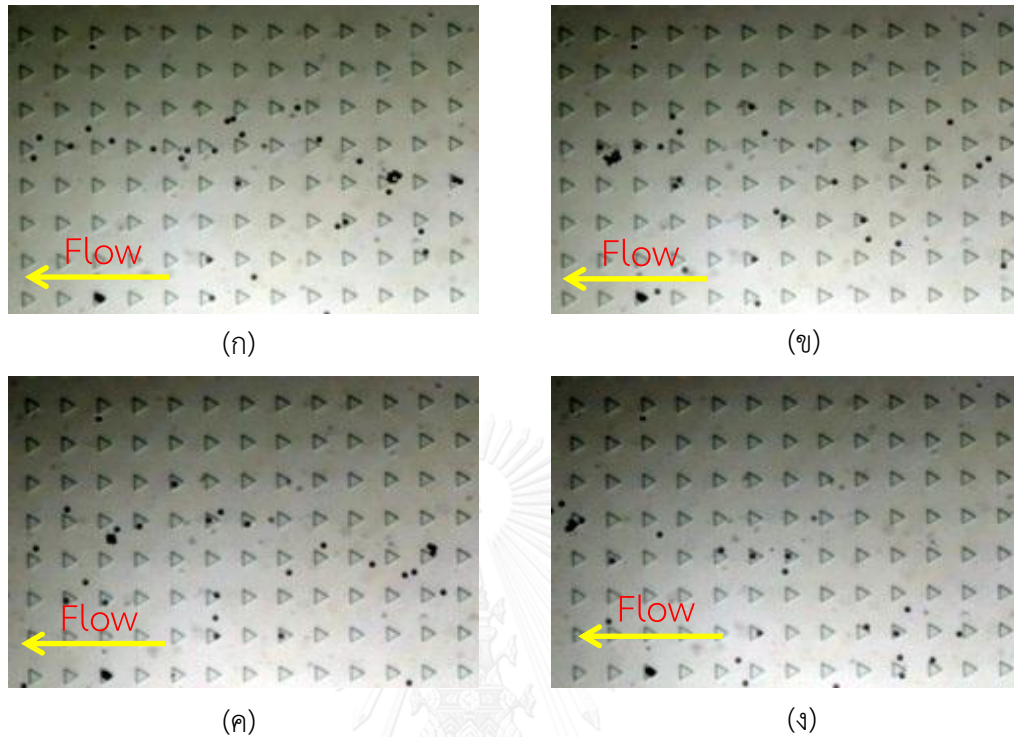


รูปที่ 3.4 กราฟแสดงช่วงความเร็วในการดักอนุภาคที่อัตราการไหล 0.1 mL/h (ความเร็วเฉลี่ยของไหล 540 μm/s)

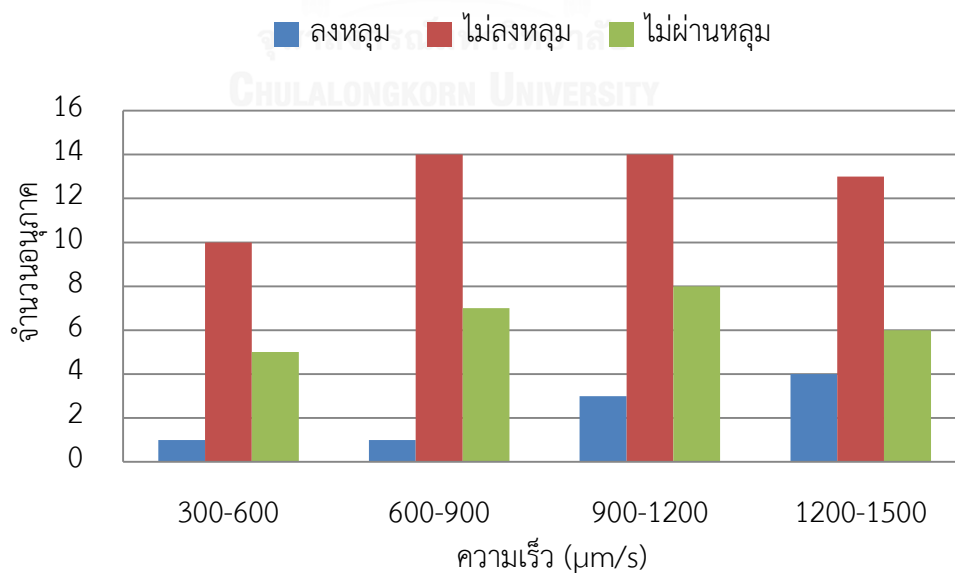
3.4.3 ผลการทดลองที่อัตราการไหล 0.3 mL/h

การทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์นี้สามารถดักอนุภาคได้ 9 อนุภาคและมีอนุภาคที่ไม่ลงหลุมทั้งหมด 51 อนุภาคจากทั้งหมด 77 อนุภาคคิดเป็นประสิทธิภาพ 11.7 และ 66.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.5 โดยความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้อนุภาคลงหลุมได้คือ 836 ไมโครเมตรต่อวินาที ซึ่งความเร็วต่ำสุดและสูงสุดที่ทำให้อนุภาคลงหลุมได้คือ 432 และ 1,423 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และช่วงความเร็วที่ทำอนุภาคลงหลุมและไม่ลงหลุมคือช่วง 1200-1500 และ 600-1200 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับดังรูป 3.6 ทั้งนี้ที่ความเร็วต่ำกว่า 900 ไมโครเมตรต่อวินาที ไม่ลงหลุมนั้นเนื่องจากอนุภาคที่เข้ามาไม่มากและความเร็วที่ต่ำกว่า 900 ไมโครเมตรต่อวินาที ส่วนใหญ่จะไม่ผ่านหลุม (ไหลบน PDMS)

เมื่อเปรียบเทียบจากทั้งสองอัตราการไหลพบว่าที่อัตราการไหล 0.3 mL/h มีช่วงความเร็วที่ทำให้อนุภาคลงหลุมอยู่ในช่วงที่สูงกว่าอัตราการไหล 0.1 mL/h แต่ก็จะมีจำนวนการดักจับที่น้อยเนื่องจากความเร็วที่วัดได้ค่อนข้างสูง อีกทั้งความเร็วที่ทำให้อนุภาคไม่ลงหลุมนั้นอยู่ในช่วงกว้างอีกด้วย ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าหากมีความเร็วที่มากกว่าช่วง 900 μm/s ขึ้นไปจะทำให้อนุภาคนั้นข้ามผ่านหลุมไปหรือมีอนุภาคที่ลงหลุมน้อยและถ้าหากมีความเร็วที่ต่ำกว่า 100 μm/s ลงไปก็จะส่งผลให้อนุภาคนั้นเกาะติดกับพื้นผิวของ PDMS ได้



รูปที่ 3.5 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.3 ml/h (ก) ณ เวลาเริ่มต้น, (ข) เมื่อเวลาผ่านไป 15 วินาที, (ค) เมื่อเวลาผ่านไป 50 วินาที, (ง) สิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 3.6 กราฟแสดงช่วงความเร็วในการดักอนุภาคที่อัตราการไหล 0.3 ml/h (ความเร็วเฉลี่ยของของไหล 960 μm/s)

3.5 สรุปผล

จากการทดลองเบื้องต้นของอุปกรณ์ดักเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาคกับอนุภาคพบว่าที่อัตราการไหล 0.1 mL/h สามารถดักจับอนุภาคได้มากกว่าอัตราการไหล 0.3 mL/h เนื่องจากมีความเร็วของของไหลอยู่ในช่วง 600- 900 $\mu\text{m/s}$ ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการดักจับเซลล์เนื่องจากความเร็วมีผลต่อการดักอนุภาคโดยตรงยิ่งมีค่าน้อยจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักอนุภาคได้มากขึ้น เพราะว่าถ้าหากมีความเร็วที่ต่ำจะส่งผลให้อนุภาคติดอยู่ที่พื้นของช่องการไหลทำให้อนุภาคไม่สามารถเคลื่อนที่ไปลงหลุมได้และถ้ามีความเร็วที่สูงจะส่งผลให้อนุภาคไหลข้ามหลุมและหลุดออกจากหลุมได้ ทั้งนี้ในการทดลองควรควบคุมความเร็วให้มีค่าที่เหมาะสม ซึ่งประสิทธิภาพของการดักอนุภาคคิดเป็น 62.5 และ 11.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนต่อไปจะนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการไหลภายในท่อที่อัตราการไหลเท่ากันแต่ความลึกของหลุม ความสูงของท่อแตกต่างกันและการวางตัวของหลุมที่ต่างจากเดิมเพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพว่าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเพียงใด



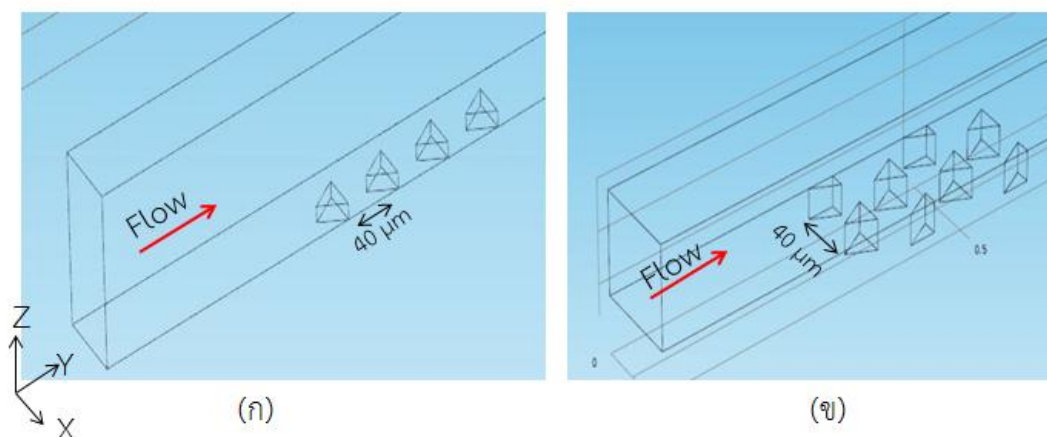
บทที่ 4

การจำลองการไหลเบื้องต้น

จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้ทราบถึงอัตราการไหล 0.1 ml/h มีการดักจับอนุภาคได้ดี เนื่องจากมีความเร็วอยู่ในช่วงที่เหมาะสมทำให้มีความสนใจในการจำลองการไหลเบื้องต้นเพื่อศึกษาและสังเกตถึงผลกระทบของ Streamline ที่ใกล้กับหลุมขนาดจุลภาคอีกทั้งยังแสดงผลลักษณะทั่วไปของความเร็วและลักษณะการหมุนที่อยู่ภายในหลุม จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์พร้อมกับการทดลองจริง โดยในการจำลองการไหลจะบอกถึงวิธีการกำหนดเงื่อนไขและการกำหนดคุณสมบัติต่างๆ รวมถึงผลของการจำลองการไหลด้วยโปรแกรม COMSOL

4.1 การวาดรูปทรงเรขาคณิต

งานวิจัยนี้แบ่งการจำลองการไหลออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จะเป็นการจำลองการไหลโดยทำการวางหลุมจุลภาคให้มีลักษณะของหลุมถูกวางอยู่ในแนวเดียวกันโดยการสร้างรูปร่างของจำลองการไหลสำหรับในงานส่วนแรกจะสร้างเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมโดยมีด้านกว้าง 0.08 มิลลิเมตร ด้านยาว 1 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร และส่วนที่สองจะทำการวางหลุมจุลภาคให้มีลักษณะของหลุมเป็นแบบสลับฟันปลา (Zigzag) ซึ่งรูปร่างของส่วนที่สองนี้จะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมที่มีขนาดด้านกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ด้านยาว 1 มิลลิเมตร และสูง 70 ไมโครเมตรโดยที่บริเวณด้านล่างของรูปสี่เหลี่ยมทั้งสองส่วนจะประกอบไปด้วยหลุมรูปสามเหลี่ยมที่ที่แตกต่างกันสามรูปร่างโดยมีขนาดของหลุมจุลภาคเป็น 40, 60 และ 80 ไมโครเมตรซึ่งแต่ละขนาดจะมีความลึกของหลุมจุลภาคขนาด 15, 30 และ 45 ไมโครเมตร ดังรูป 4.1 ทั้งนี้สามารถทำการวาดรูปจากโปรแกรมอื่นได้เช่น Solid Work, Auto CAD จากนั้นทำการ Import ข้อมูล



รูปที่ 4.1 รูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับทดลองการจำลองการไหล (ก) แนวแถวเดียว (ข) สลับฟันปลา

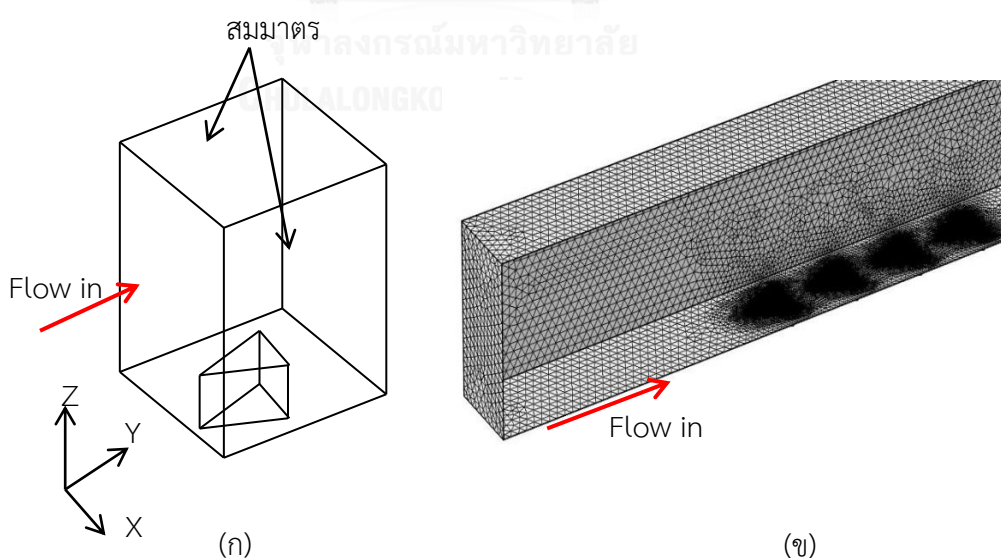
4.2 การกำหนดคุณสมบัติ

เมื่อได้รูปร่างที่เราต้องการแล้ว ในส่วนถัดไปคือการกำหนดคุณสมบัติถือว่าเป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งโดยต้องเลือกคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งจะทำให้การสมมติการทำงาน ของระบบนี้เป็นน้ำบริสุทธิ์ (ความหนาแน่น 998.2 kg/m^3 , ความหนืด 0.001 kg/m s) [12] และ กำหนดให้การไหลเป็นแบบราบเรียบ

4.3 การกำหนดเงื่อนไขต่าง ๆ

สำหรับที่ทางเข้าและทางออกจะกำหนดให้เป็นเงื่อนไขที่สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยกำหนด ความเร็วที่ทางเข้าเป็น $540 \text{ ไมโครเมตรต่อวินาที}$ เพราะจากผลทดลองพบว่าความเร็วดังกล่าวพบ ว่าความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้อนุภาคลงหลุมโดยเทียบเป็นอัตราการไหล $0.1 \text{ มิลลิลิตรต่อชั่วโมง}$ และ เงื่อนไขด้านข้างของรูปสี่เหลี่ยมจะกำหนดเป็นแบบสมมาตร ซึ่งการกำหนดด้านข้างให้เป็นแบบ สมมาตรนั้นเพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการคำนวณและจะส่งผลให้มีความแม่นยำในการคำนวณอีก ด้วยสำหรับด้านบนและด้านล่างจะกำหนดให้ไม่มีการเคลื่อนที่ของช่องการไหล

การกำหนด mesh นั้นจะทำการกำหนดจำนวน mesh ที่บริเวณหลุมให้มีความละเอียดกว่า บริเวณอื่น ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการคำนวณแต่ยังคงประสิทธิภาพให้มีความแม่นยำอยู่ และผ่านการทำตรวจสอบ mesh แล้วว่าถ้าเพิ่มจำนวน mesh ขึ้นไปมากกว่าที่ทำการจำลองนี้จะทำ ให้ผลที่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยถึงไม่เปลี่ยนแปลงเลย ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 โดเมนและสภาวะขอบเขตในการคำนวณ ก) เงื่อนไขของรูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับการทดลอง จำลองการไหล ข) จำนวน mesh

4.4 ผลของการจำลอง

ในการทดลองจะเลือกแสดงผลของเส้นการเคลื่อนที่ของของไหล (Streamline) การกระจายตัวของความเร็วและการกระจายตัวของลักษณะการหมุนของของไหลเป็นหลัก โดย เส้นการเคลื่อนที่ของของไหลจะแสดงผล ณ ตำแหน่งต่างๆ ของช่องการไหลและการกระจายตัวของความเร็วและลักษณะการหมุนของของไหลจะแสดงผลภายในหลุมที่ระยะต่างๆ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลการทดลองว่าเหตุใดอนุภาคถึงมีการเคลื่อนที่ลงหรือไม่ลงหลุม

4.4.1 เส้นการเคลื่อนที่ของของไหลที่ตำแหน่งความสูงต่างกัน

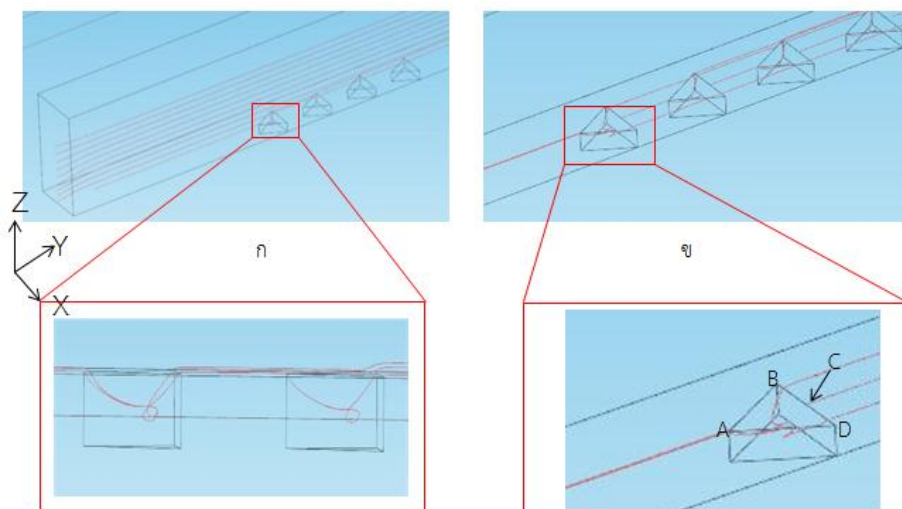
จากการจำลองการไหลพบว่าตำแหน่งเส้นการเคลื่อนที่ของของไหลที่บริเวณด้านล่างของช่องการไหลมีโอกาสตักอนุภาคได้มากกว่าตำแหน่งอื่น เนื่องจากเกิดการไหลในลักษณะการไหลวนเข้าไปในหลุมรูปสามเหลี่ยมเป็นเหตุให้อนุภาคที่ไหลตามเส้นทางการไหลดังกล่าวถูกดักไว้ในหลุม แต่หากอนุภาคไม่เกิดการไหลในลักษณะดังกล่าวก็จะส่งผลให้อนุภาคนั้นไม่สามารถลงหลุมได้ยกเว้นหาวิธีที่สามารถทำให้อนุภาคนั้นเคลื่อนลงมาอยู่ในเส้นทางการไหลที่เกิดการไหลวน ทั้งนี้ทางผู้วิจัยได้แสดงผลของเส้นทางการไหลทั้งหมด 10 เส้น โดยแต่ละเส้นมีระยะห่างจากกัน 1 ไมโครเมตรตามแนวแกน Z และห่างจากแกน Y 40 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ก

อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการจำลองการไหลมีความสอดคล้องกับการทดลองจริงที่ว่าบริเวณด้านล่างจะสามารถตักอนุภาคได้ดีกว่าตำแหน่งอื่นแต่ก็จะมีบางอนุภาคที่หลุดออกจากหลุมได้ ทำให้เกิดความสนใจที่จะจำลองการไหลบริเวณด้านล่างของช่องการไหลว่าเป็นเพราะเหตุผลใดอนุภาคถึงหลุดออกจากหลุม

4.4.2 เส้นการเคลื่อนที่ของของไหลที่ตำแหน่งพื้นของช่องการไหล

การแสดงผลของตำแหน่งนี้จะเลือกแสดงผลกระจายตามแนวแกน Y ทั้งหมด 100 จุดและสูงขึ้นจากแนวแกน Z เป็นระยะ 15 ไมโครเมตร เพื่อดูเส้นทางการไหลที่เกิดขึ้นภายในหลุมและบริเวณรอบๆ หลุม ผลปรากฏว่าเมื่อหากมีอนุภาคไหลมาตามเส้นทางการไหลตำแหน่ง A อนุภาคจะถูกการไหลวนดักไว้แต่ถ้าหากการไหลวนเกิดไม่มากพออาจจะส่งผลให้อนุภาคหลุดออกจากหลุมได้ตามเส้นทางการไหลที่ตำแหน่ง B, C และ D อย่างไรก็ตามหากอนุภาคไหลตามเส้นทางการไหลที่ตำแหน่ง B และ C ตั้งแต่เริ่มจะทำให้ไม่สามารถตักอนุภาคที่ไหลได้ ดังรูป 4.3 ข

จากการจำลองการไหลเบื้องต้นพบว่าบริเวณตำแหน่งที่ติดพื้นของช่องการไหลมีโอกาสเกิดการตักได้มากกว่าที่ตำแหน่งอื่นๆ เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวเกิดการไหลในลักษณะการไหลวนขึ้นทั้งนี้อนุภาคอาจเกิดการหลุดออกจากหลุมได้หากตำแหน่งดังกล่าวเกิดการไหลวนไม่มากพอที่จะตักอนุภาคเอาไว้



รูปที่ 4.3 ลักษณะเส้นการเคลื่อนที่ของของไหล (ก) ผลของการจำลองการไหลที่ตำแหน่งความสูงต่างๆ (ข) ผลของการจำลองการไหลที่ตำแหน่งพื้นของช่องการไหล

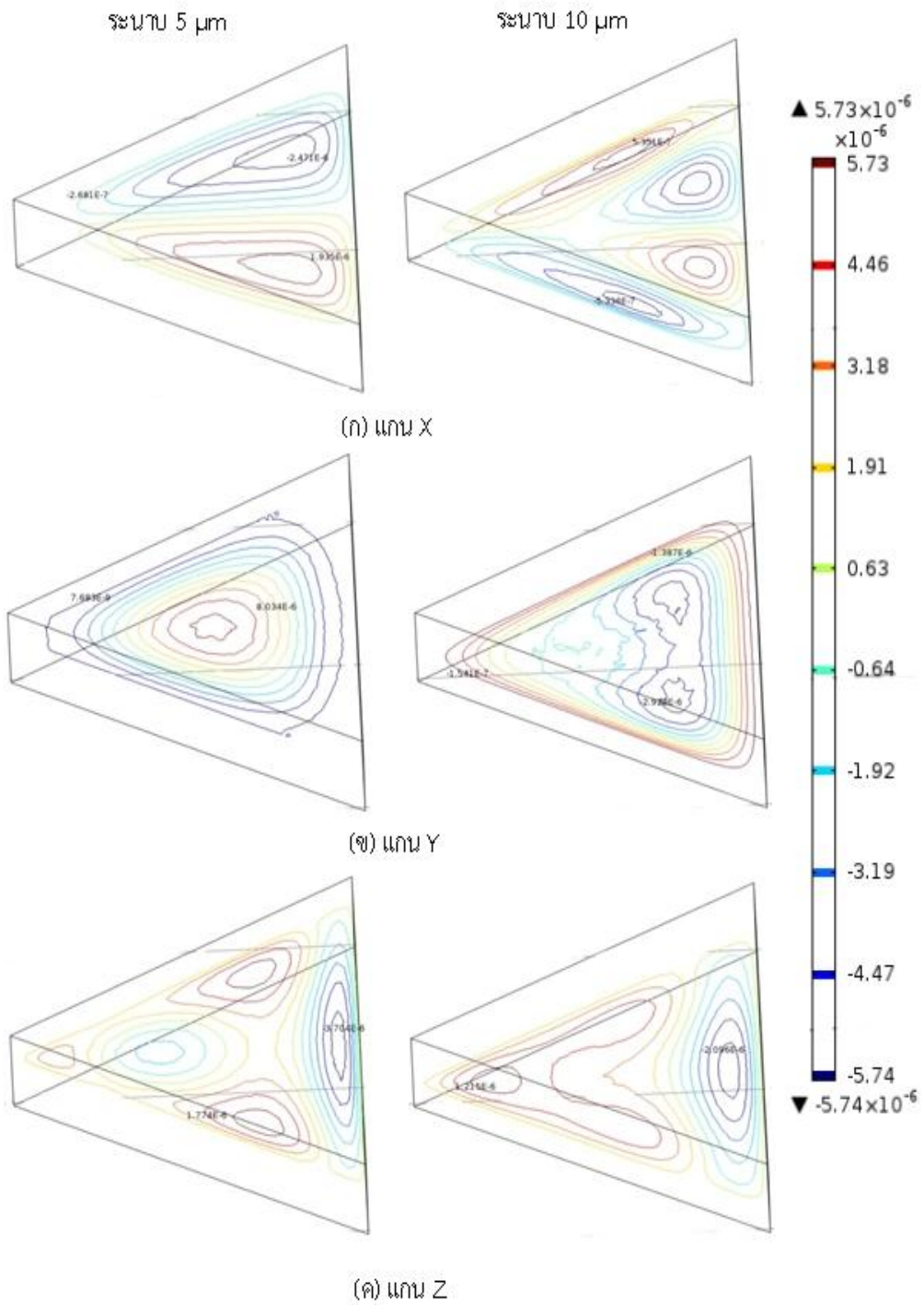
4.4.3 การกระจายตัวของความเร็วภายในหลุมจุลภาค

การแสดงผลการกระจายตัวของความเร็วนี้จะแบ่งการแสดงผลออกมาเป็นสามแนวแกน คือ แกน X Y และ Z โดยจะแสดงผลเป็นระนาบความลึก 5, 10 และ 15 ไมโครเมตรซึ่งจะวัดจากบริเวณปากหลุมจุลภาคลงมาเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ในการเลือกพารามิเตอร์ด้านความลึกของหลุมที่เหมาะสมสำหรับดักจับอนุภาคโดยมีผลการจำลองการไหลดังนี้

- หลุมจุลภาคขนาด 40 ที่มีความลึก 15 ไมโครเมตร

แกน X: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรจะสังเกตเห็นว่าของไหลจะมีทิศทางการเคลื่อนที่จากบริเวณกลางหลุมพุ่งเข้าหาผนังของหลุมทั้งสองข้างและที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรความเร็วของของไหลเริ่มเกิดความไม่สม่ำเสมอขึ้นเนื่องจากมีความเร็วทั้งสองทิศทาง (เคลื่อนที่เข้าผนังและจากนั้นเข้าสู่ตรงกลาง) ดังแสดงในรูป 4.4 (ก) ทั้งนี้เหตุการณ์ดังกล่าวเป็นผลมาจากการหมุนไหลวน

แกน Y: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ของของไหลส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่จากปลายไปสู่ด้านท้ายของหลุมจุลภาคและความเร็วที่บริเวณใกล้กับผนังจะมีความเร็วบางส่วนไหลย้อนกลับและที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร ความเร็วบริเวณตรงกลางจะมีความเร็วที่ไม่สม่ำเสมอและมีทิศทางย้อนกลับเนื่องจากเกิดการชนกับด้านท้ายของหลุมทำให้ความเร็วที่เกิดขึ้นมีความเร็วที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ข)



รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 15 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

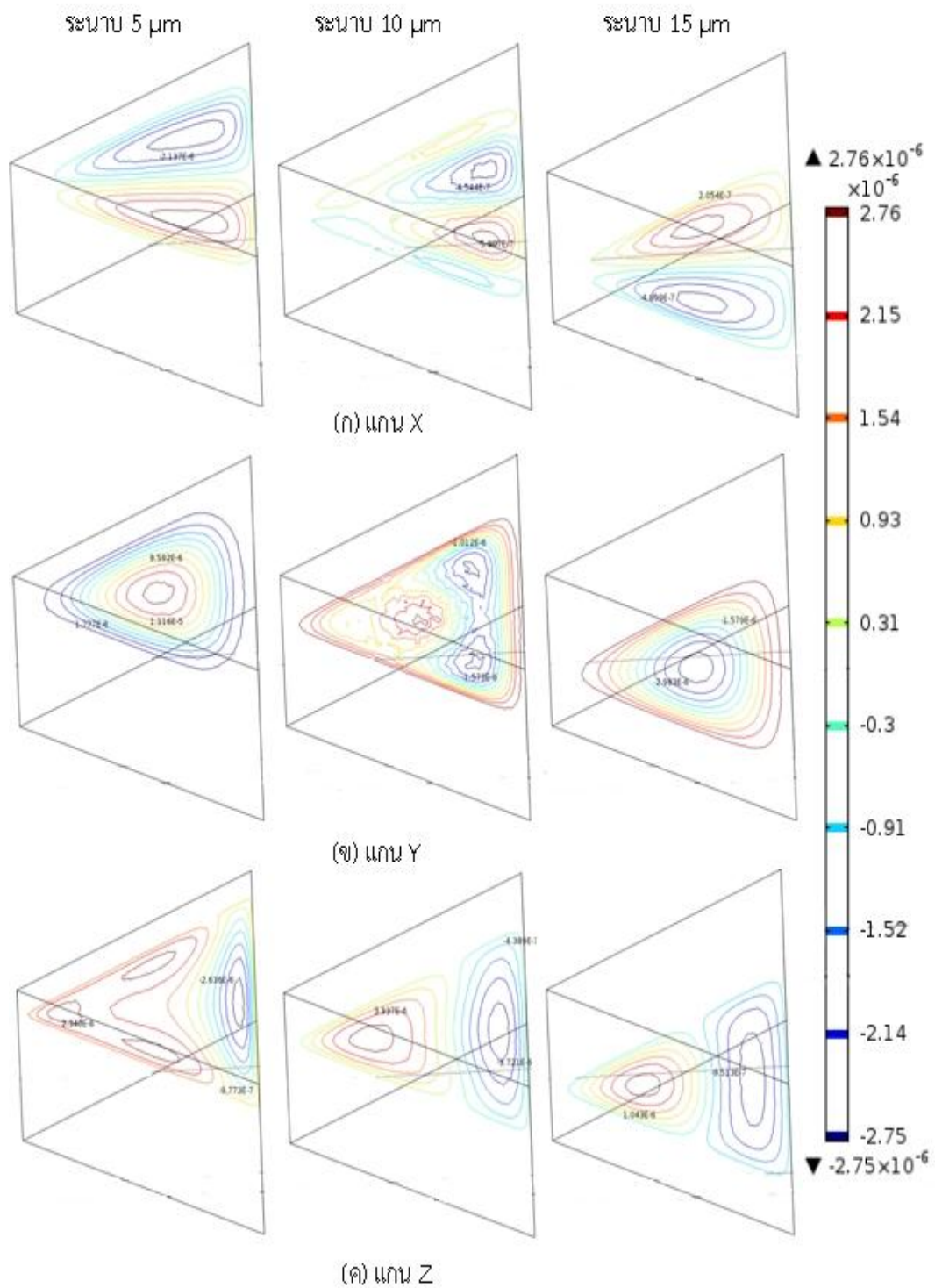
แกน Z: เมื่อมีของไหลเข้ามาในอุปกรณ์ความเร็วส่วนหนึ่งจะไหลเข้าไปในหลุมและอีกส่วนหนึ่งจะไหลผ่านหลุมไปทำให้ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร ทิศทางของความเร็วที่ด้านท้ายของหลุมจะมีทิศทางพุ่งลงส่วนที่บริเวณปลายและกลางหลุมจะมีทิศพุ่งขึ้นแต่มีบางส่วนพุ่งขึ้นเนื่องจากเกิดการไหลหลุมวนที่บริเวณดังกล่าว ในขณะที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร บริเวณด้านท้ายจะมีขนาดเพิ่มขึ้นและมีบริเวณของการกระจายมากขึ้นซึ่งบริเวณกลางหลุมจะเกิดทิศพุ่งขึ้นทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ค)

- หลุมจุลภาคนาโน 40 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

แกน X: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรสังเกตเห็นว่าของไหลจะมีทิศทางการเคลื่อนที่จากบริเวณกลางหลุมพุ่งเข้าหาที่ผนังของหลุมทั้งสองข้างแต่มีความเร็วขนาดน้อยกว่าที่หลุมขนาด 40 ลึก 15 ไมโครเมตร (ความลึก 15 ไมโครเมตรมีขนาดของความเร็ว 2.6×10^{-6} m/s แต่ความลึก 30 ไมโครเมตรมีขนาดของความเร็ว 2.1×10^{-6} m/s) ที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร ความเร็วของของไหลเริ่มที่จะเกิดความไม่สม่ำเสมอของความเร็วเนื่องจากเกิดความเร็วทั้งสองทิศทางและที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร ทิศทางของความเร็วจะมีทิศทางพุ่งจากผนังทั้งสองข้างไปสู่บริเวณตรงกลางหลุมดังแสดงในรูป 4.5 (ก) ทั้งนี้เหตุการณ์จากการเปลี่ยนทิศทางดังกล่าวเป็นผลมาจากการหมุนไหลวน

แกน Y: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่การเคลื่อนที่ของของไหลจะเคลื่อนที่ทางด้านหน้าไปยังด้านท้ายของหลุมและจะมีทิศทางย้อนกลับบางส่วนที่บริเวณใกล้ผนังของหลุมซึ่งบริเวณตรงกลางหลุมนั้นจะมีขนาดของความเร็วมากที่สุด ส่วนที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรจะมีความเร็วไม่สม่ำเสมอและมีทิศทางไปและกลับทั้งนี้การชนกับผนังนั้นจะทำให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวขึ้นทำให้ที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตรทิศทางของความเร็วนั้นจะมีทิศทางย้อนกลับอย่างสมบูรณ์ซึ่งการเกิดการย้อนกลับของทิศทางความเร็วนี้จะช่วยทำให้อนุภาคไหลไปอยู่ที่บริเวณกลางและปลายของหลุมได้ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 (ข)

แกน Z: เมื่อมีของไหลไหลเข้ามาแล้วไปชนที่ผนังด้านท้ายของหลุมจะทำให้มีความเร็วส่วนหนึ่งไหลเข้าไปในหลุมและอีกส่วนหนึ่งไหลผ่านหลุมไปซึ่งที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรนั้นแสดงให้เห็นว่าที่ด้านท้ายของหลุมจะมีความเร็วในทิศพุ่งลงสู่ด้านล่างหลุมและที่ด้านหน้าของหลุมจะมีทิศพุ่งขึ้นจากด้านล่างหลุมซึ่งผลที่ได้นี้จะมีลักษณะคล้ายกับที่ระนาบความลึก 10 และ 15 ไมโครเมตรแต่จะมีความเร็วของของไหลนั้นลดลงเรื่อยๆ โดยที่ขนาดความเร็ว 5.1×10^{-6} , 4.8×10^{-6} และ 1.3×10^{-6} m/s ตามลำดับระนาบความลึก ดังรูปที่ 4.5 (ค)



รูปที่ 4.5 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 10 และ 15 μm ภายในหลอดขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

- หลุมจุลภาคขนาด 40 ที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร

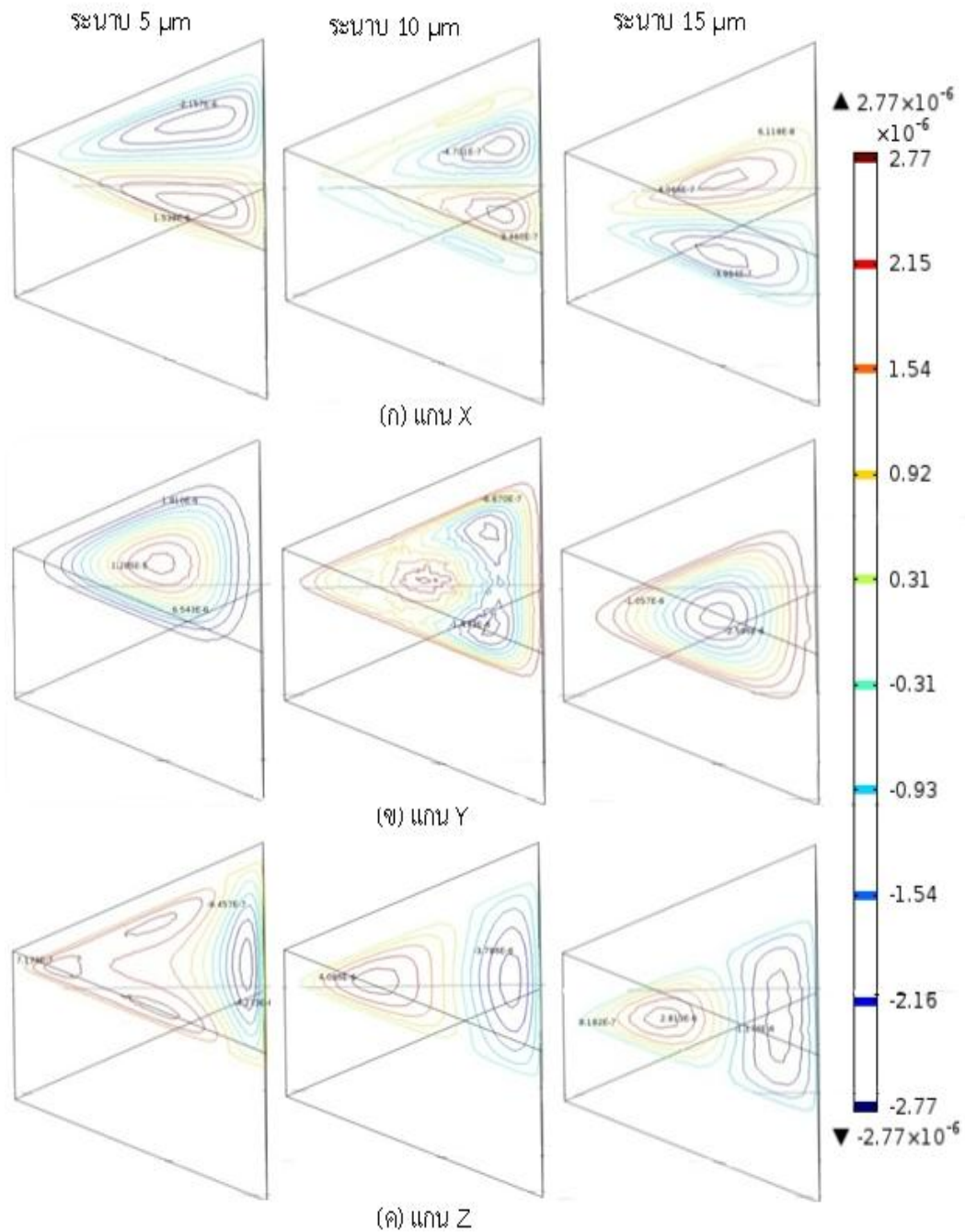
แกน X: สังเกตที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ของของไหลจะมีทิศทางพุ่งจากบริเวณตรงกลางไปสู่ผนังของหลุมทั้งสองข้างแต่เมื่อสังเกตที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรก็จะเกิดความเร็วไม่สม่ำเสมอที่บริเวณตรงกลางหลุมและที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร ความเร็วดังกล่าวนั้นจะกลับมาสม่ำเสมอและมีทิศทางพุ่งออกจากผนังไปสู่บริเวณตรงกลางซึ่งขนาดของความเร็วที่เกิดขึ้นนี้จะมีค่าน้อยกว่าขนาดความเร็วของหลุมขนาด 40 ลึก 30 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.6 (ก)

แกน Y: การเคลื่อนที่ของของไหลที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรจะมีทิศทางของความเร็วพุ่งจากปลายหลุมไปสู่ด้านท้ายของหลุมแต่ที่บริเวณด้านท้ายใกล้เคียงกับผนังนั้นจะมีความเร็วบางส่วนเกิดทิศทางย้อนกลับเนื่องจากความเร็วเข้าไปชนผนังซึ่งเมื่อเราสังเกตที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรความเร็วจะไม่สม่ำเสมอโดยที่บริเวณตรงกลางของหลุมนั้นจะมีขนาดของความเร็วต่ำเป็นบริเวณกว้างกว่าขนาดหลุม 40 ลึก 30 ไมโครเมตร และที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร ความเร็วจะกลับมาสม่ำเสมอและคงที่อีกครั้งแต่จะมีทิศทางย้อนกลับโดยบริเวณตรงกลางของหลุมจะมีความเร็วที่มีค่าน้อยที่สุดดังรูปที่ 4.6 (ข)

แกน Z: ของไหลที่ไหลเข้ามาชนผนังที่ด้านท้ายของหลุมแล้วจากนั้นจะมีส่วนหนึ่งพุ่งลงเข้าไปในหลุมซึ่งที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร จะมีความเร็วในทิศทางพุ่งลงที่บริเวณด้านท้ายของหลุมและทิศพุ่งขึ้นที่บริเวณตรงกลางและปลายของหลุมซึ่งขนาดของความเร็วที่ระนาบลึกลงไปจะมีขนาดความเร็วลดลงแต่ยังคงมีทิศทางเหมือนเดิมกับตอนแรกดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ค)

จากผลการกระจายตัวของความเร็วที่หลุมขนาด 40 ที่ความลึกแตกต่างกันพบว่าลักษณะการกระจายตัวของความเร็วในแต่ละแกนของแต่ละความลึกนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันแต่มีสิ่งที่แตกต่างกันออกไปก็คือขนาดของความเร็ว กล่าวคือถ้ายังมีความลึกมากขึ้นขนาดของความเร็วนั้นก็ยิ่งลดน้อยลงไปด้วย ทั้งนี้หากพิจารณาถึงผลที่เกิดขึ้นในหลุมของแต่ละความลึกนั้นความลึกขนาด 15 ไมโครเมตรจะเกิดการไหลหมุนวนที่มีความรุนแรงสูงเนื่องจากที่ระนาบ 10 ไมโครเมตร นั้นจะเกิดความไม่สม่ำเสมอของความเร็วซึ่งจะส่งผลทำให้อนุภาคนั้นไม่สามารถเข้าไปอยู่ในหลุมหรือไหลข้ามผ่านหลุมออกไป แต่ถ้าหากเป็นความลึกขนาด 30 ไมโครเมตร ลักษณะการเกิดการกระจายความเร็ว นั้นจะคล้ายกับความลึก 15 ไมโครเมตร ซึ่งที่ระนาบ 15 ไมโครเมตร นั้นความเร็วจะกลับมามีความสม่ำเสมอและมีทิศทางตรงข้ามกับทิศทางเริ่มต้นทำให้เหตุการณ์ดังกล่าวทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวปกคลุมอนุภาคให้อยู่ภายในหลุมนี้ได้ และสุดท้ายหลุมที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร จะเกิดปรากฏการณ์ของการกระจายตัวของความเร็วเหมือนกับหลุมที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร แต่จะมีขนาดของ

ความเร็วที่ต่ำกว่าทำให้เกิดแรงไม่เพียงพอที่จะผลักให้อนุภาคนั้นหลุดออกจากหลุมได้ แต่ก็เพิ่มโอกาสในการดักจับอนุภาคได้มากกว่าเซลล์เดี่ยว



รูปที่ 4.6 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

- หลุมจุลภาคขนาด 60 ที่มีความลึก 15 ไมโครเมตร

แกน X: ทิศทางของความเร็วในระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรนั้นจะเคลื่อนที่ออกจากบริเวณตรงกลางเข้าหาผนังของหลุมทั้งสองด้านซึ่งที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรมีความแตกต่างจากผลการกระจายตัวความเร็วของขนาดหลุม 40 ที่มีความลึก 15 ไมโครเมตรเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของความเร็วแล้ว ทั้งนี้ขนาดของหลุมมีผลทำให้เกิดเป็นปรากฏการณ์ดังกล่าวขึ้น ดังแสดงในรูป 4.7 (ก)

แกน Y: ความเร็วของของไหลจะมีทิศทางเคลื่อนที่จากปลายไปยังด้านท้ายของหลุมโดยที่บริเวณตรงกลางจะมีขนาดของแรงมากที่สุดที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร ซึ่งเมื่อพิจารณาระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรผลปรากฏว่าที่ด้านท้ายของหลุมจะมีทิศทางของความเร็วย้อนกลับแต่ที่บริเวณตรงกลางยังคงมีทิศทางเหมือนตอนเริ่มแรกอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ข)

แกน Z: เมื่อของไหลไหลเข้ามาในอุปกรณ์จะมีส่วนหนึ่งไหลเข้ามาในหลุมทำให้ที่ด้านหลังของหลุมนั้นเกิดทิศทางของความเร็วพุ่งลงไปไหลแล้วมีทิศทางพุ่งขึ้นที่บริเวณตรงกลางเนื่องจากเกิดการไหลหมุนวนจึงทำให้เกิดลักษณะดังกล่าวที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร แต่ที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรบริเวณด้านท้ายของหลุมที่มีทิศพุ่งลงจะมีบริเวณที่เพิ่มมากขึ้นจากเดิมและตำแหน่งด้านหน้าจะมีบริเวณลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ค)

- หลุมจุลภาคขนาด 60 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

แกน X: ที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรจะมีทิศทางความเร็วที่เหมือนกันคือมีทิศทางพุ่งออกจากบริเวณตรงกลางเข้าหาผนังทั้งสองข้างซึ่งที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรนั้นจะมีขนาดของความเร็วที่น้อยกว่า จากนั้นที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตรจะมีการกระจายของความเร็วไม่สม่ำเสมอและความเร็วดังกล่าวนั้นจะกลับมามีความสม่ำเสมออีกครั้งที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร เป็นผลมาจากการหมุนไหลวนของของไหลที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ก)

แกน Y: ที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรทิศทางของความเร็วจะเคลื่อนที่จากปลายไปสู่ด้านท้ายของหลุมโดยที่บริเวณตรงกลางนั้นจะมีขนาดของความเร็วมากกว่าบริเวณอื่นๆ ความลึก 10 μm จนกระทั่งความเร็วบริเวณตรงกลางนั้นจะเริ่มมีความเร็วที่ไม่สม่ำเสมอแต่ที่บริเวณใกล้กับผนังของหลุมนั้นจะมีทิศทางย้อนกลับจากผนังไปสู่ปลายหลุมที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร หลังจากนั้นทิศทางของของไหลจะไหลจากด้านท้ายไปยังปลายหลุมอย่างสมบูรณ์ซึ่งความเร็วที่ตำแหน่งตรงกลางจะมีขนาดของความเร็วที่น้อยที่สุดที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.8 (ข)

แกน Z: ทิศทางการไหลของของไหลที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรจะมีทิศพุ่งลงที่ด้านหน้า และท้ายของหลุมแต่ที่บริเวณตรงกลางจะมีทิศทางพุ่งขึ้น ต่อมาเมื่อสังเกตต่อไปที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรนั้นทิศทางของความเร็วจะเริ่มมีทิศทางพุ่งขึ้นที่ตำแหน่งปลายจนถึงกลางหลุมและทิศทางพุ่งลงที่ด้านท้ายจะมีบริเวณที่กว้างขึ้นหลังจากนั้นที่ระนาบความลึก 15 และ 20 ไมโครเมตรจะมีลักษณะการกระจายตัวที่คล้ายกับระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรแต่จะมีขนาดของความเร็วลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงในรูป 4.8 (ค)

- หลุมจุลภาคขนาด 60 ที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร

แกน X: การเคลื่อนที่ของของไหลที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรนั้นจะมีทิศทางการเคลื่อนที่ออกจากบริเวณตรงกลางพุ่งเข้าหาผนังทั้งสองข้างโดยบริเวณที่ใกล้กับผนังนั้นจะมีขนาดของความเร็วน้อยกว่าบริเวณตรงกลางซึ่งต่อมาเมื่อพิจารณาที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตรจะสังเกตได้ว่าที่บริเวณใกล้กับผนังจะบริเวณที่มีทิศทางของความเร็วตรงกันข้ามกับที่ได้กล่าวมาข้างต้นแต่ก็ยังมีบริเวณที่ไม่กว้างมากนักและเมื่อพิจารณาที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตรทิศทางของความเร็วนั้นจะกลับมาเป็นทิศทางเดียวกันเหมือนก่อนแต่จะมีทิศทางพุ่งออกจากผนังเข้าหาบริเวณตรงกลางของหลุมซึ่งจะเห็นว่าทิศทางความเร็วที่ได้กล่าวมานั้นจะกลับมาสมดุลอีกครั้งเมื่อมีระยะของความลึกต่ำกว่าขนาดหลุม 40 ที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.9 (ก)

แกน Y: ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตร ของไหลจะมีทิศทางของความเร็วจากปลายไปยังด้านท้ายของหลุมซึ่งที่บริเวณตรงกลางนั้นจะมีขนาดของความเร็วมากกว่าบริเวณอื่นและที่ระนาบ 10 ไมโครเมตรนั้นจะมีบริเวณของความเร็วไม่กว้างเท่าระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรหลังจากนั้นความเร็วดังกล่าวจะเริ่มเกิดความไม่สม่ำเสมอขึ้นที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร โดยที่บริเวณตรงกลางนั้นจะมีทิศทางเหมือนเดิมแต่บริเวณอื่นๆจะเป็นทิศทางตรงกันข้ามเนื่องจากมีความเร็ววิ่งเข้าชนกับผนังทำให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวขึ้น ต่อมาที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตรความเร็วจะกลับมาสม่ำเสมออีกครั้งและจะเกิดเป็นทิศทางตรงกันข้ามกับตอนแรก ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (จ)

แกน Z: ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร เมื่อมีของไหลเข้ามาแล้วส่วนหนึ่งจะไปชนกับด้านท้ายของหลุมทำให้บริเวณด้านท้ายและตำแหน่งปลายของหลุมจะมีทิศทางพุ่งและส่งผลให้บริเวณตรงกลางนั้นมีทิศพุ่งขึ้นเนื่องจากเกิดการไหลหมุนวนขึ้นและหลังจากนั้นที่บริเวณด้านท้ายของหลุมจะเริ่มมีบริเวณของการกระจายตัวของความเร็วเพิ่มมากขึ้นทำให้เป็นผลทำให้ตำแหน่งตรงกลางถึงด้านหน้าของหลุมมีทิศทางของความเร็วเป็นทิศพุ่งขึ้นที่ระนาบ 10 ไมโครเมตร และยังคงคงลักษณะการเกิดทิศทางของความเร็วแบบนี้ต่อไปที่ระนาบ 15 และ 20 ไมโครเมตรแต่จะมีขนาดของความเร็วลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ค)

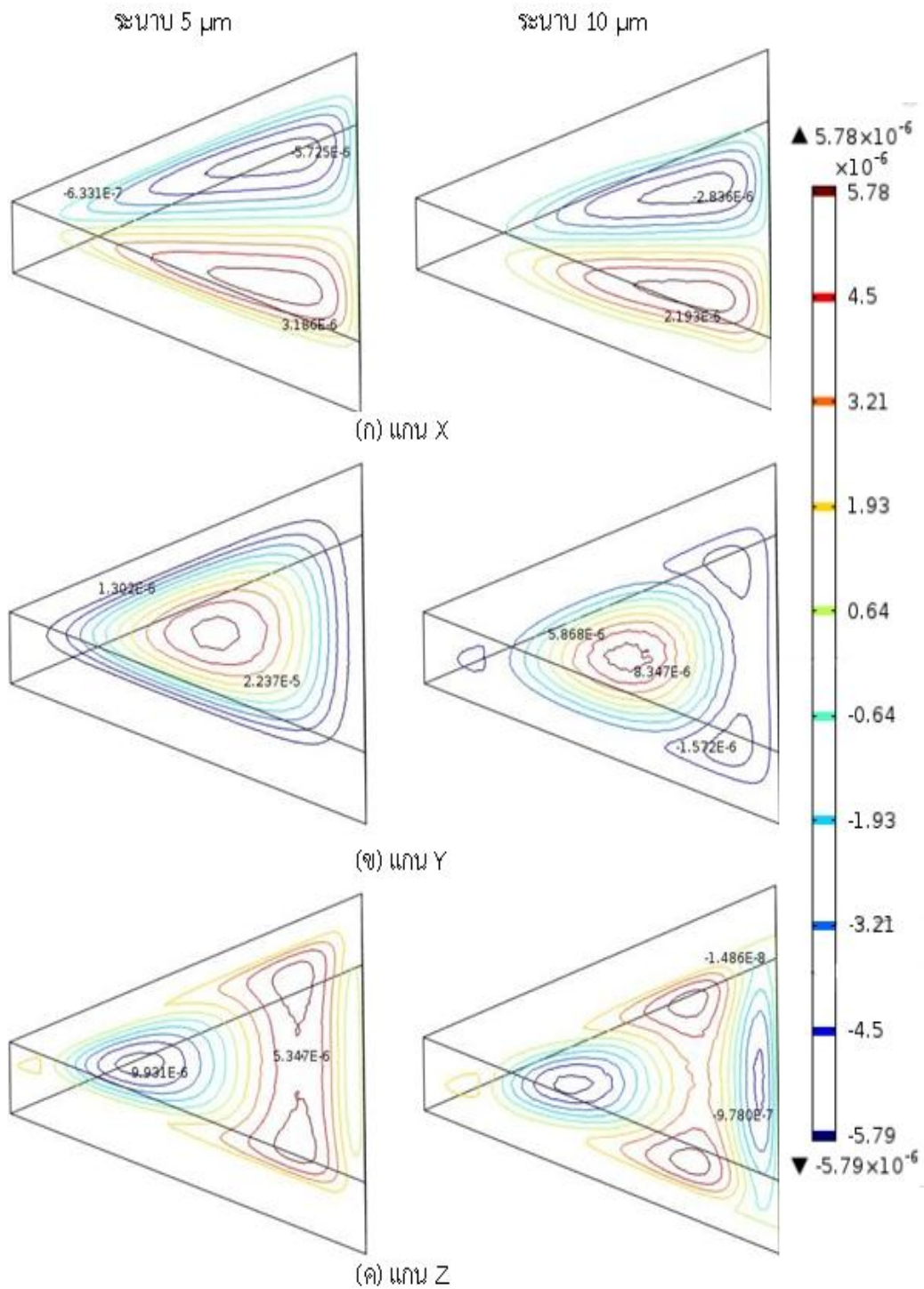
จากผลการกระจายตัวของความเร็วที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร ที่มีความลึกแตกต่างกัน พบว่าลักษณะการกระจายตัวของความเร็วในแต่ละแกนของแต่ละความลึกล้วนมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน แต่มีสิ่งที่แตกต่างกันออกไปก็คือขนาดของความเร็ว ทั้งนี้หากมีความลึกเพิ่มขึ้นขนาดของความเร็วก็จะลดน้อยลงด้วยเช่นกัน และเมื่อพิจารณาถึงผลการกระจายตัวของความเร็วของหลุมที่มีความลึก 15 ไมโครเมตรจะยังคงมีลักษณะการกระจายตัวของความเร็วเหมือนกันทั้งระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตร ต่อมาความเร็วของหลุมที่มีความลึก 30 และ 45 ไมโครเมตรที่แกน X และ Y จะเกิดความเร็วที่ไม่สม่ำเสมอขึ้นที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร และจะกลับมาสม่ำเสมออีกครั้งที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร ซึ่งการกระจายตัวของความเร็วนี้จะต่างจากขนาดหลุม 40 ไมโครเมตร ที่มีความลึก 15 ไมโครเมตร จะมีความไม่สม่ำเสมอของความเร็วที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร แต่ที่ขนาดหลุม 60 ไมโครเมตร กลับมีการกระจายตัวของความเร็วที่เหมือนกัน ทั้งนี้ที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร ที่ความลึก 30 และ 45 ไมโครเมตร จะเกิดการกระจายตัวของความเร็วที่ไม่สม่ำเสมอต่ำกว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร อยู่ 1 ระนาบความลึก ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้บ่งบอกว่าที่ระนาบความลึกที่มีความเร็วไม่สม่ำเสมอนั้นจะทำหน้าที่คล้ายกับตัวค้ำกันไม่ให้อนุภาคที่อยู่ในหลุมเกิดหลุดออกจากหลุมได้ โดยหลุมขนาด 60 ไมโครเมตร ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร นี้จะเหมาะสมกับการดักอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของการกระจายตัวของความเร็วเกิดขึ้นที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร

- หลุมจุลภาคขนาด 80 ที่มีความลึก 15 ไมโครเมตร

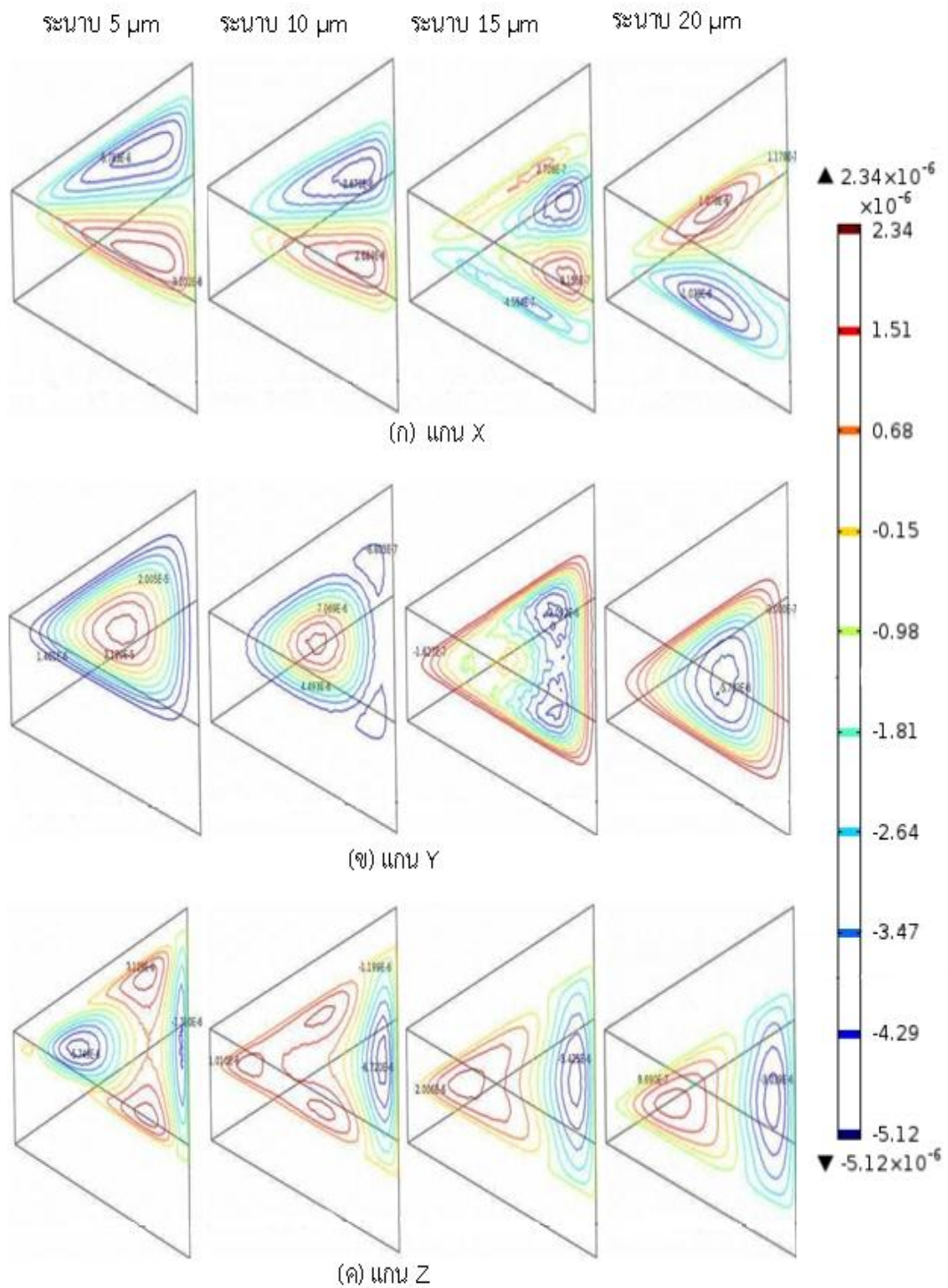
แกน X: การเคลื่อนที่ของของไหลนี้จะมีทิศทางพุ่งออกจากบริเวณตรงกลางเข้าหาผนังของหลุมทั้งสองด้านของระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตร ซึ่งการกระจายตัวของความเร็วนี้จะคล้ายกับขนาดหลุม 60 ไมโครเมตร แต่จะมีขนาดของความเร็วจะน้อยกว่า ดังรูปที่ 4.10 (ก)

แกน Y: ที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรจะมีทิศทางของความเร็วเคลื่อนจากตำแหน่งด้านหน้าไปยังตำแหน่งท้ายของหลุมซึ่งที่ตำแหน่งตรงกลางของหลุมจะมีขนาดของความเร็วมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ โดยที่ตำแหน่งท้ายของหลุมที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตรนั้นจะมีขนาดของความเร็วต่ำสุด ดังรูปที่ 4.10 (ข)

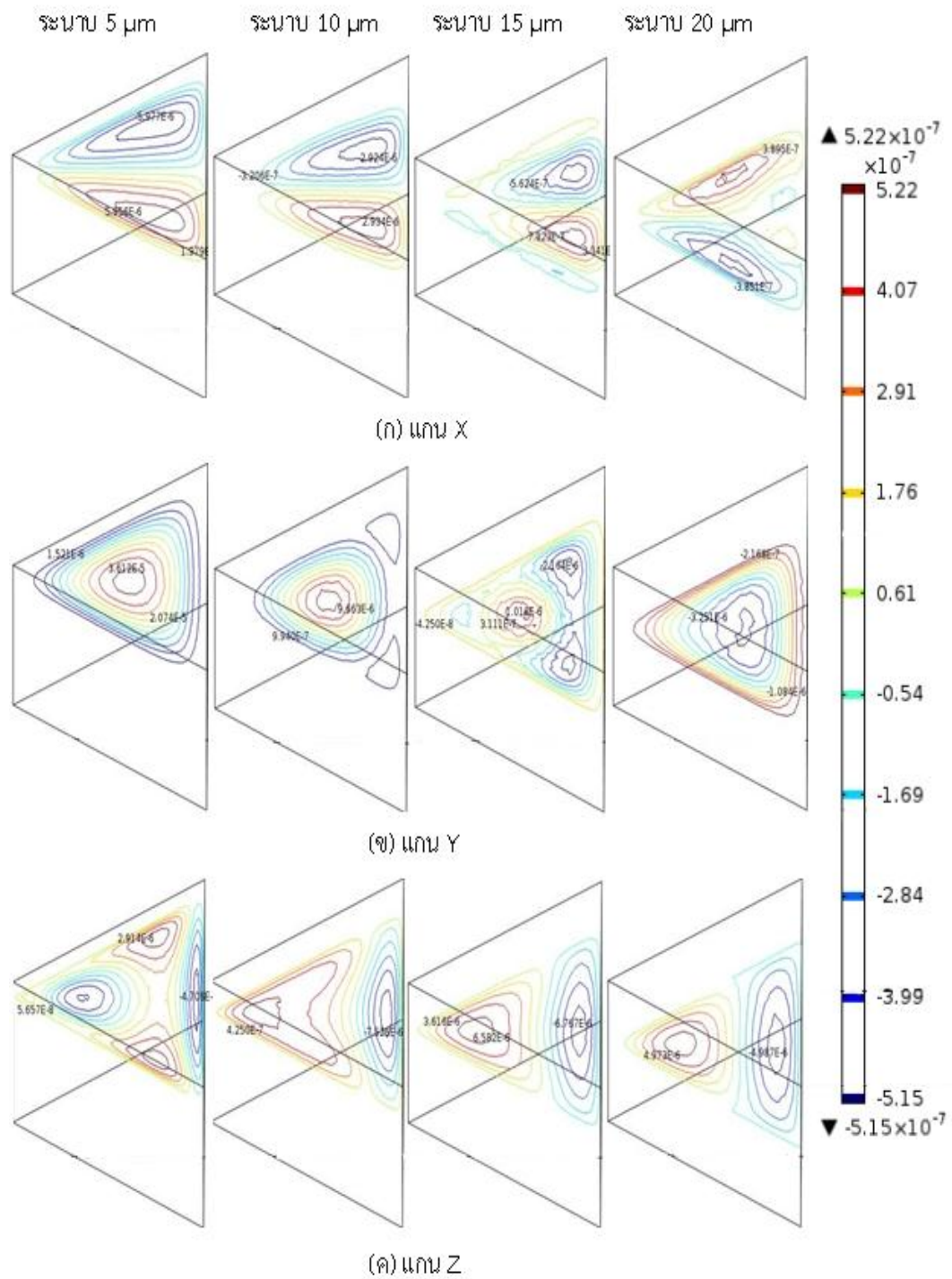
แกน Z: การเคลื่อนที่ของของไหลที่ไหลเข้ามาในหลุมจึงทำให้ทิศทางของความเร็วมีทิศพุ่งลงที่ตำแหน่งด้านหน้ามีทิศพุ่งขึ้นที่ตำแหน่งตรงกลางของระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรจากนั้นที่ตำแหน่งท้ายของหลุมจะเริ่มมีบริเวณของทิศพุ่งลงเพิ่มมากขึ้นแต่ที่ตำแหน่งตรงกลางและด้านหน้ายังคงมีลักษณะการเกิดทิศทางของความเร็วเหมือนเดิมในระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.10 (ค)



รูปที่ 4.7 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 15 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z



รูปที่ 4.8 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z



รูปที่ 4.9 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

- หลุมจุลภาคขนาด 80 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

แกน X: จากการสังเกตผลของการกระจายความเร็วพบว่าที่ระนาบความลึก 5 10 และ 15 ไมโครเมตรจะมีลักษณะการเกิดการกระจายตัวที่คล้ายกับหลุมขนาด 40 และ 60 ไมโครเมตร โดยที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร จะมีความเร็วไม่สม่ำเสมอเหมือนกับระนาบความลึกที่ผ่านมาซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมขนาด 60 ไมโครเมตร ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตรจะเห็นว่าความเร็วที่ไม่สม่ำเสมอนั้นจะเกิดขึ้นกับระนาบความลึกที่ต่ำกว่า ทั้งนี้ความเร็วดังกล่าวเกิดจากผลของการหมุนไหลวนดังรูปที่ 4.11 (ก)

แกน Y: ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตร ทิศทางของความเร็วจะเคลื่อนที่จากด้านหน้าไปยังด้านหลังของหลุม และที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร จะมีลักษณะคล้ายกับหลุมขนาด 60 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.11 (ข)

แกน Z: ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรจะมีความเร็วส่วนหนึ่งไหลเข้ามาในหลุมจนทำให้ที่บริเวณด้านหน้าและท้ายหลุมมีทิศทางพุ่งลงแต่ที่บริเวณตรงกลางจะมีทิศทางพุ่งขึ้นเนื่องจากของไหลส่วนที่ไปชนกับผนังแล้วจะทำให้เกิดการหมุนไหลวนขึ้น และที่ระนาบ 10 และ 15 ไมโครเมตร จะเริ่มมีความเร็วที่ตำแหน่งท้ายหลุมเพิ่มมากขึ้นแต่ขนาดของความเร็วจะลดลงจนกระทั่งบริเวณตรงกลางและด้านหน้าของหลุมมีทิศทางพุ่งขึ้นในระนาบความลึกที่ 20 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.11 (ค)

- หลุมจุลภาคขนาด 80 ที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร

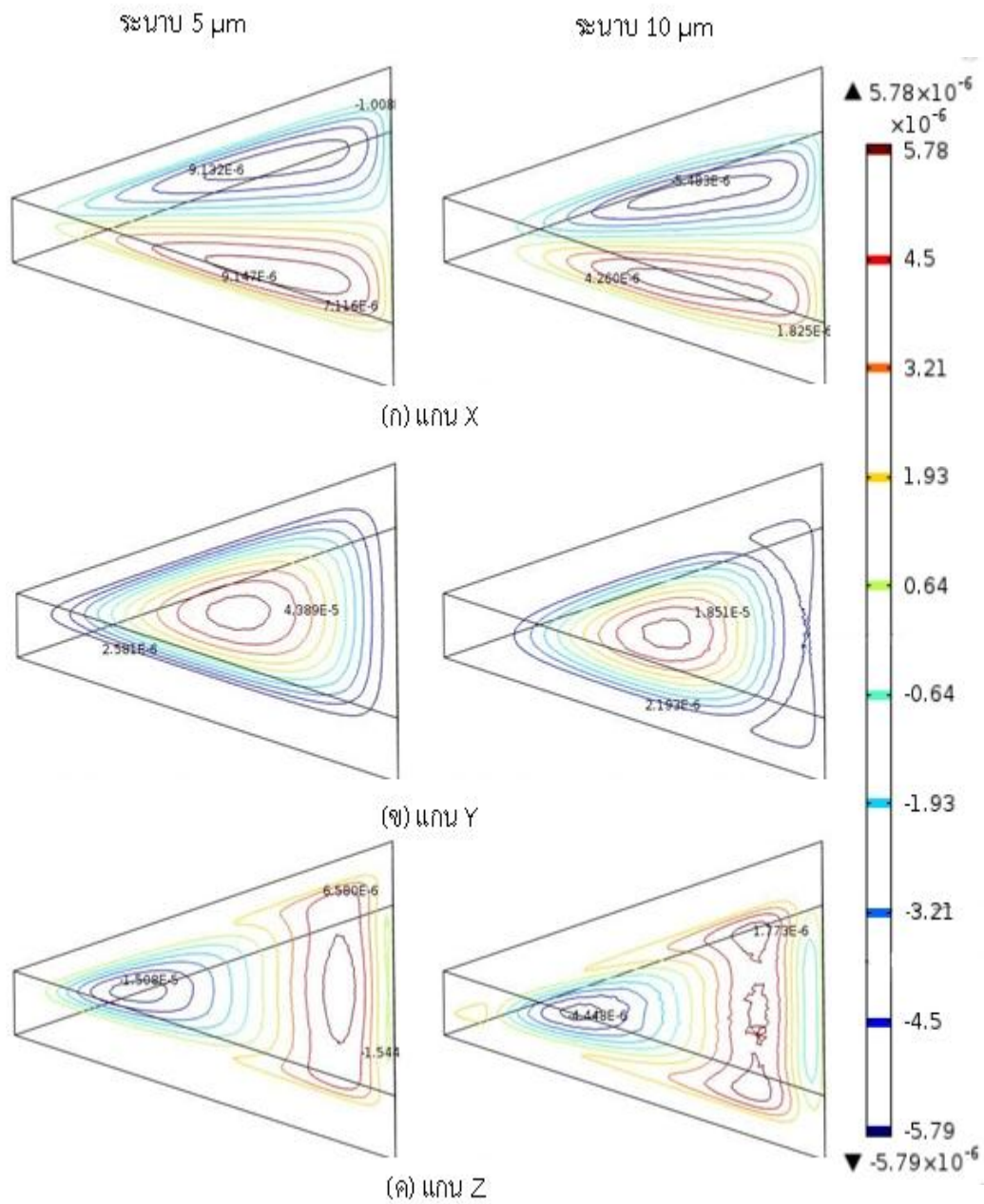
แกน X: การกระจายตัวของความเร็วทั้งสี่ระนาบความลึกคือ 5, 10, 15 และ 20 ไมโครเมตร จะมีทิศทางการเคลื่อนที่คล้ายกับขนาดหลุม 80 ลึก 30 ไมโครเมตร แต่ขนาดของความเร็วจะน้อยกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (ก)

แกน Y: การเคลื่อนที่ของความเร็วในระนาบความลึก 5, 10 และ 15 ไมโครเมตร จะมีทิศทางความเร็วคล้ายขนาดหลุม 80 ลึก 30 ไมโครเมตรเช่นกัน แต่ที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร จะมีขนาดที่แตกต่างกันคือที่ความลึก 30 และ 45 ไมโครเมตรมีขนาดความเร็ว 4.1×10^{-6} และ 1.1×10^{-6} m/s ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (ข)

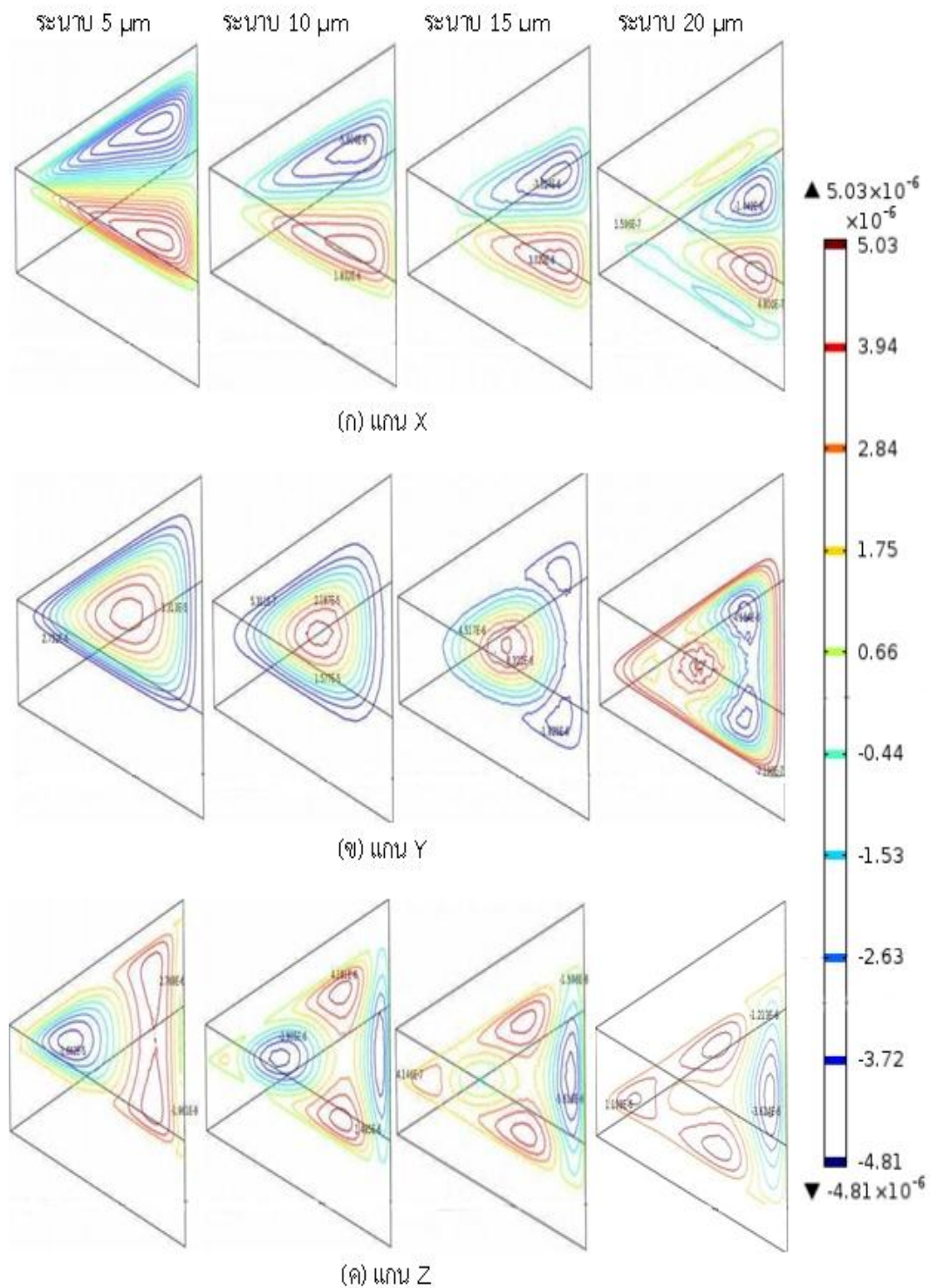
แกน Z: มีลักษณะการกระจายตัวของความเร็วคล้ายกับขนาดหลุม 80 ลึก 30 ไมโครเมตร แต่จะมีขนาดที่ต่างกันไม่มากนัก ดังรูปที่ 4.12 (ค)

จากผลการกระจายตัวของความเร็วที่หลุมขนาด 80 ไมโครเมตร ที่มีความลึกแตกต่างกัน พบว่าลักษณะการกระจายตัวของความเร็วในแต่ละแกนของแต่ละความลึกลักษณะที่คล้ายคลึงกัน แต่หากมีความลึกเพิ่มขึ้นขนาดของความเร็วก็จะลดน้อยลงด้วยเช่นกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของความเร็วในแต่ละแนวแกนนั้นพบว่าในแนวแกน X และ Y จะมีลักษณะของการเคลื่อนที่ของความเร็วที่คล้ายคลึงกันทั้งสามความลึกและจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งเดียวกันด้วยคือระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงทิศทางเกิดจากการไหลหมุนวนของของไหลนั่นเอง ต่อมาในแนวแกน Z นั้นก็จะเกิดทิศทางคล้ายกันทั้งสามความลึกอีกเช่นกัน แต่การเปลี่ยนแปลงของแกนนี้จะไม่เหมือนกัน โดยที่หลุมที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร จะกลับมามีความสม่ำเสมอซ้ำกว่าหลุมที่มีความลึก 45 ไมโครเมตร (ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร) ซึ่งการเกิดเหตุการณ์ดังกล่าวนี้จะมีผลแตกต่างกับขนาดหลุม 60 ไมโครเมตร เพราะว่าที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตร ก็เกิดการเปลี่ยนแปลงของความเร็วแล้ว โดยระนาบที่มีความเร็วไม่สม่ำเสมอนั้นจะทำหน้าที่เป็นตัวปกคลุมสำหรับดักจับอนุภาคหรือป้องกันไม่ให้อนุภาคหลุดออกได้ง่าย ทั้งนี้ขนาดหลุม 80 ไมโครเมตร นี้จะเหมาะกับการดักจับอนุภาคที่มีขนาด 15-20 ไมโครเมตร เพราะว่าการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอจะเกิดที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร แต่อาจจะเป็นเซลล์เดี่ยวเนื่องจากขนาดของหลุมมีขนาดค่อนข้างใหญ่

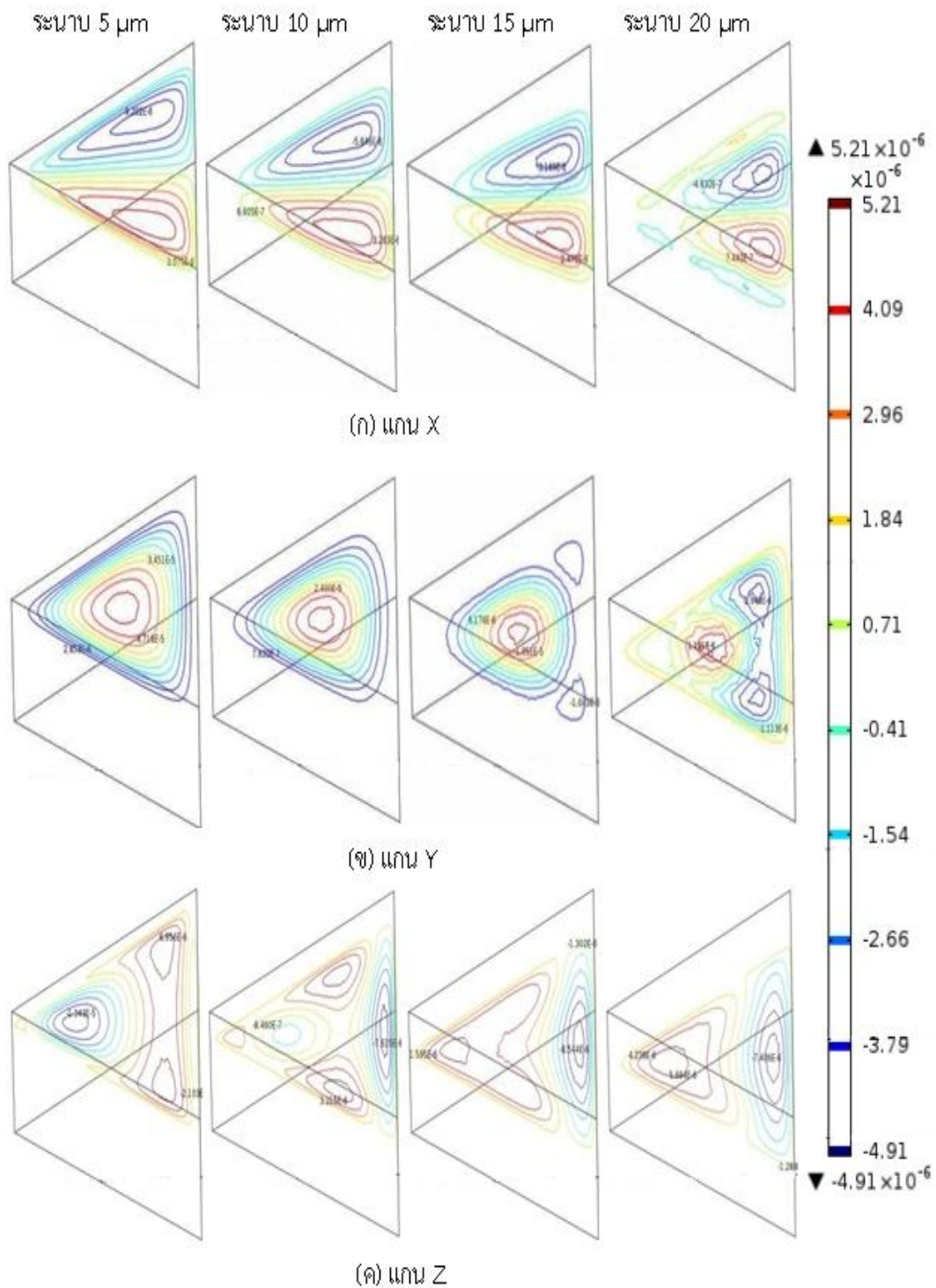
จากผลของการกระจายตัวความเร็วของหลุมขนาดจุลภาคทั้งหมดสามขนาดนั้นสามารถสังเกตได้ว่าลักษณะของการกระจายตัวมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันทั้งสามขนาดทั้งนี้หลุมที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร นั้นมีความเหมาะสมสำหรับดักจับอนุภาคขนาด 10-20 ไมโครเมตร ได้ดีกว่าหลุมที่มีความลึกขนาด 15 และ 45 ไมโครเมตร เนื่องจากที่ระยะความลึก 30 ไมโครเมตรนั้นเกิดลักษณะการไหลหมุนวนทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวปกคลุมอนุภาคให้อยู่ภายในหลุมนี้ได้ และระยะความลึกมีความเหมาะสมและมีโอกาสในการดักจับอนุภาคเป็นอนุภาคเดี่ยวได้ ซึ่งในหัวข้อต่อไปจะกล่าวถึงการกระจายตัวของหลุมสำหรับหลุมขนาด 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร โดยหลุมแต่ละขนาดจะมีความลึก 30 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.10 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5 และ 10 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 15 μm (ก) แกน X (ข) แกน Y (ค) แกน Z



รูปที่ 4.11 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z



รูปที่ 4.12 การกระจายตัวของความเร็ว (m/s) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 45 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

4.4.4 การกระจายตัวของการหมุน (Vorticity) ภายในหลุมจุลภาค

การแสดงผลการกระจายตัวของการหมุนนั้นจะแบ่งการแสดงผลออกมาเป็นสามแนวแกน คือ แกน X Y และ Z โดยจะแสดงผลเป็นระนาบความลึก 5, 10 และ 15 ไมโครเมตรสำหรับกรณีขนาดของหลุม 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร ที่ความลึก 30 ไมโครเมตร ซึ่งจะวัดจากบริเวณปากหลุมจุลภาคลงมาเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ในการเลือกพารามิเตอร์ด้านความกว้างของหลุมที่เหมาะสมสำหรับดักจับอนุภาคโดยมีผลการจำลองการไหลดังนี้

- หลุมจุลภาคขนาด 40 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

แกน X: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตร ณ ตำแหน่งด้านท้ายของหลุมนั้นจะมีลักษณะของการหมุนขนานกับผนังด้านท้ายของหลุมเป็นแบบตามเข็มนาฬิกา ซึ่งจะมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับบริเวณตรงกลางที่มีลักษณะการหมุนขนานกับผนังด้านท้ายของหลุมเป็นแบบทวนเข็มนาฬิกาโดยขนาดของการหมุนนั้นที่บริเวณใกล้กับผนังด้านข้างของหลุมมีขนาด 3.4 s^{-1} ซึ่งจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงบริเวณตรงกลางจะมีขนาดของการหมุนน้อยที่สุด (2.2 s^{-1}) ซึ่งที่ระนาบความลึก 10 และ 15 ไมโครเมตรจะเกิดลักษณะการหมุนคล้ายกันแต่ความรุนแรงของการหมุนจะต่ำกว่าแต่บริเวณตรงกลางของหลุมจะเกิดลักษณะการหมุนในทิศสวนทางกับบริเวณด้านหน้าแล้วด้านท้ายของหลุมซึ่งที่ด้านหน้าและท้ายของหลุมจะเกิดบริเวณกว้างมากขึ้น ดังรูปที่ 4.13 (ก)

แกน Y: ลักษณะการหมุนของของไหลที่ระนาบ 5 ไมโครเมตรจะมีลักษณะการหมุนจากด้านล่างมีวนเข้าหาผนังด้านข้างทั้งสองด้านของหลุมโดยขนาดการหมุนของของไหลนั้นจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ เมื่อระยะเริ่มไกลจากผนังนอกจากนี้ที่บริเวณด้านท้ายของหลุมที่ระนาบความลึก 10 และ 15 ไมโครเมตรนั้นจะมีลักษณะการหมุนออกจากผนังมีวนลงด้านล่างของหลุมแต่มีบริเวณที่กว้างไม่มาก ทั้งนี้บริเวณที่เกิดการหมุนภายในหลุมจะมีบริเวณกว้างกว่าระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรเล็กน้อย ดังแสดงในรูป 4.13 (ข)

แกน Z: ที่ระนาบความลึก 5 ไมโครเมตรลักษณะการหมุนของของไหลนั้นจะเป็นการหมุนเข้าหาผนังของหลุมในลักษณะทวนเข็มนาฬิกาในบริเวณที่เป็นสีแดงและหมุนตามเข็มนาฬิกาในบริเวณสีน้ำเงิน โดยที่บริเวณใกล้ผนังที่ตำแหน่งปลายจะเกิดการหมุนสูงกว่าตำแหน่งท้ายหลุมและที่บริเวณตรงกลางจะมีค่าลดลง แต่เมื่อพิจารณาที่ระนาบความลึก 10 ไมโครเมตร ลักษณะการหมุนจะเกิดไม่คงที่ขึ้นที่บริเวณตรงกลางของหลุมแต่ความรุนแรงจะน้อยไม่รุนแรงเท่ากับผนังด้านข้างของหลุม ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเกิดการไหลหมุนวนจึงทำให้เกิดการหมุนของของไหลเป็นลักษณะดังกล่าว และที่ระนาบความลึก 15 ไมโครเมตรลักษณะการหมุนจะเกิดการสลับทิศทางกับตอนแรกและยังมีบริเวณ

ของการหมุนน้อยกว่าด้วยทั้งนี้การเกิดการหมุนเปลี่ยนทิศทางการหมุนไหลดวนของของไหล และสังเกตได้ว่าที่บริเวณตรงกลางของหลุมจะเกิดการหมุนที่มีความรุนแรงน้อย ดังรูปที่ 4.13 (ค)

- หลุมจุลภาคขนาด 60 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

แกน X: การหมุนที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรนั้นจะเกิดลักษณะการหมุนที่คล้ายกันแต่ขนาดของการหมุนจะต่างกันโดยที่การหมุนที่บริเวณด้านท้ายของหลุมจะหมุนขนานกับผนังในทิศตามเข็มนาฬิกาซึ่งบริเวณขอบผนังทั้งสองด้านของหลุมนั้นจะมีความขนาดลดลงเรื่อยๆ เมื่อระยะเข้าสู่บริเวณกลางหลุม และที่ระนาบความลึก 15 และ 20 ที่บริเวณด้านหน้าและท้ายของหลุมจะมีบริเวณของการหมุนมากขึ้นกว่าสองระนาบที่กล่าวมาแต่ขนาดความรุนแรงจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.14 (ก)

แกน Y: ลักษณะการหมุนที่ระนาบ 5 ไมโครเมตร จะเกิดค่ามากที่สุดที่บริเวณใกล้กับผนังที่ตำแหน่งเกือบถึงท้ายหลุมโดยลักษณะการหมุนในระนาบความลึก 10, 15 และ 20 ไมโครเมตรนั้นจะมีลักษณะของการหมุนที่คล้ายกันโดยขนาดของการหมุนที่บริเวณผนังของหลุมจะมีขนาดมากที่สุดและจะลดลงเมื่ออยู่ที่บริเวณตรงกลางหลุม โดยทิศทางการหมุนของสีแดงจะมีทิศทางพุ่งขึ้นจากด้านล่างและม้วนเข้าหาผนังด้านใกล้ และสีน้ำเงินจะมีทิศพุ่งขึ้นจากด้านล่างแล้วม้วนเข้าหาผนังด้านใกล้ดังแสดงในรูปที่ 4.14 (ข)

แกน Z: ที่ตำแหน่งใกล้กับผนังที่ระนาบความลึก 5 และ 10 ไมโครเมตรนั้นจะมีขนาดของการหมุนที่รุนแรงกว่าตำแหน่งอื่นๆ โดยสีแดงและน้ำเงินจะมีทิศของการหมุนจากด้านหน้าไปด้านหลังของหลุมและม้วนเข้าหาผนัง โดยที่บริเวณสีแดงจะหมุนขึ้นส่วนสีน้ำเงินจะหมุนลงด้านล่างของหลุม อย่างไรก็ตามขนาดของการหมุนจะลดลงเมื่อระยะห่างออกมากจากผนัง และที่ความลึก 15 ไมโครเมตรจะเกิดการหมุนไม่คงที่ขึ้นที่บริเวณตรงกลางของหลุมแต่ความรุนแรงจะน้อยไม่รุนแรงเท่ากับผนังด้านข้างของหลุม และสุดท้ายที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตร ทิศทางการหมุนจะเกิดการสวนทางกับระนาบด้านบนซึ่งเป็นผลมาจากการไหลหมุนวน ดังรูปที่ 4.14 (ค)

- หลุมจุลภาคขนาด 80 ที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร

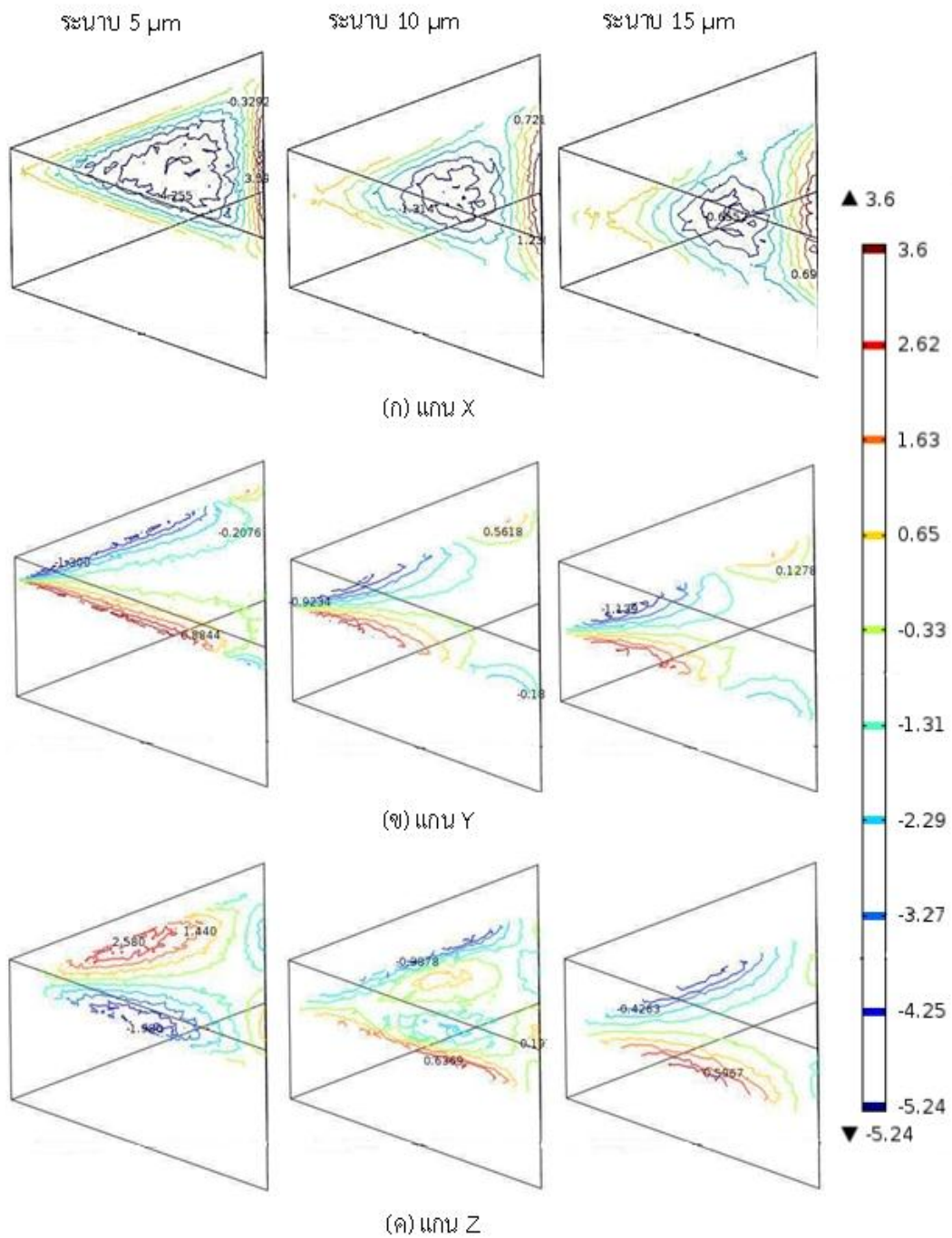
แกน X: ที่ระนาบความลึก 5, 10 และ 15 ไมโครเมตรจะมีลักษณะของการหมุนที่คล้ายกันคือจะมีบริเวณที่เป็นสีแดงและสีส้มอยู่บริเวณขอบของหลุมซึ่งจะมีลักษณะการหมุนในทิศทางพุ่งเข้าหาด้านท้ายของผนังและม้วนขึ้นด้านบนแต่บริเวณสีน้ำเงินจะมีทิศทางตรงข้ามกันและจะมีขนาดของการหมุนน้อยกว่าด้วย (ขนาดของการหมุน 3.6, 2.2 และ 1.1 s^{-1} ตามลำดับ) และต่อมาที่ระนาบความลึก 20 ไมโครเมตรจะเริ่มมีบริเวณสีแดงและสีส้มเพิ่มมากขึ้นแต่ขนาดของการหมุนจะน้อยกว่าระนาบความลึกอื่นๆ ดังรูปที่ 4.15 (ก)

แกน Y: ลักษณะการหมุนทั้ง 4 ระบายความลึกจะเกิดการหมุนในลักษณะที่คล้ายกันแต่จะมีขนาดที่ลดลงเมื่อระบายความลึกมากขึ้นโดยบริเวณสีแดงจะมีทิศทางการหมุนในรูปแบบที่หมุนขึ้นจากด้านล่างและม้วนเข้าหาผนังซึ่งบริเวณสีน้ำเงินก็จะหมุนในลักษณะเดียวกัน อย่างไรก็ตามการหมุนในแนวแกนนี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อการดักเซลล์มากถ้าเซลล์หรืออนุภาคอยู่บริเวณตรงกลางของหลุม ดังแสดงในรูปที่ 4.15 (ข)

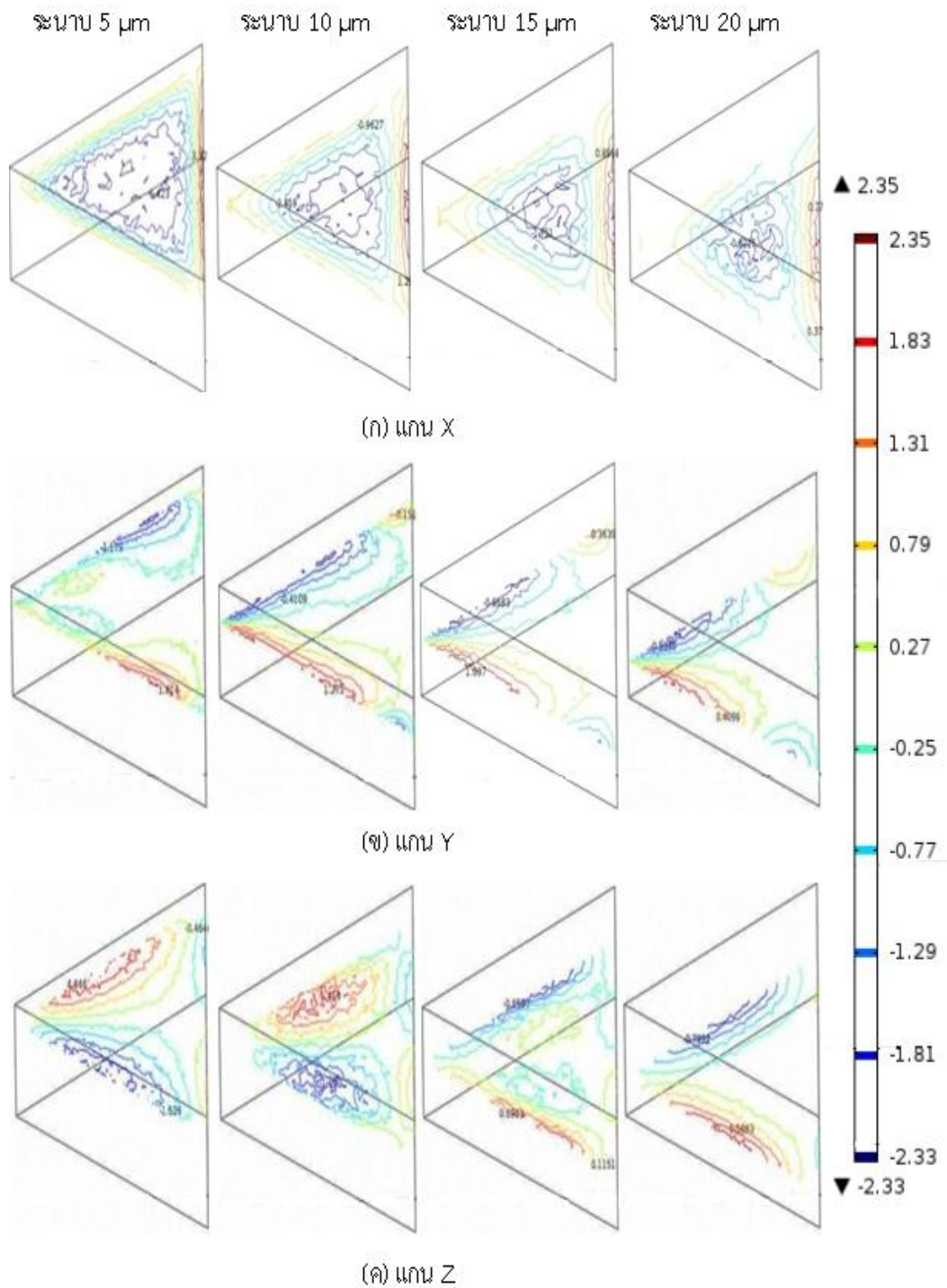
แกน Z: การหมุนที่ระบาย 5, 10 และ 15 ไมโครเมตรจะมีลักษณะการหมุนที่คล้ายกัน แต่เมื่อมีความลึกลงไปบริเวณการกระจายตัวของการหมุนจะเริ่มเพิ่มบริเวณมากขึ้นแต่ขนาดของการหมุนจะลดลง โดยในบริเวณที่เป็นสีแดงจะมีการหมุนในทิศม้วนตัวเข้าหาผนังและหมุนขึ้นด้านบนและสีน้ำเงินจะมีลักษณะการหมุนที่เหมือนกันแต่จะหมุนลงด้านล่าง ซึ่งหากมีอนุภาคหรือเซลล์เข้าไปอยู่บริเวณการหมุนดังกล่าวจะทำให้เซลล์นั้นมีโอกาสหลุดออกจากหลุมได้ และที่ระบายความลึก 20 ไมโครเมตร บริเวณสีแดงนั้นจะเกิดการสลับตำแหน่งกับระบายความลึกก่อนหน้าและมีขนาดการหมุนลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.15 (ค)

จากผลของการแสดงการกระจายของการหมุนพบว่าหลุมทั้งสามขนาดจะเกิดการกระจายตัวที่คล้ายกันโดยทั้งสามแนวนั้นจะมีขนาดของการหมุนที่บริเวณตรงกลางน้อยที่สุด ซึ่งถ้าหากมีอนุภาคเคลื่อนที่ไปบริเวณตรงกลางของการหมุนนี้ก็ส่งผลให้อนุภาคหลุดออกจากหลุมได้ แต่ถ้าอนุภาคเคลื่อนที่ไปตำแหน่งอื่นๆ ที่ไม่ใช่ตรงกลางก็อาจจะก่อให้เกิดการหลุดออกจากหลุมของอนุภาคได้ เนื่องจากที่บริเวณขอบของหลุมนั้นจะมีการหมุนที่มีขนาดรุนแรงกว่า ทั้งนี้ขนาดของหลุม 40 ไมโครเมตรนั้นมีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการดักจับเซลล์เดี่ยวหรืออนุภาค 10-20 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดหลุม 60 และ 80 ไมโครเมตรนั้นจะมีโอกาสดักเซลล์ที่มีขนาดดังกล่าวได้หลายเซลล์ในหลุมเดียวกันเนื่องจากหลุมมีขนาดที่ใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ เพราะว่าขนาดของหลุม 40 ไมโครเมตร มีการกระจายตัวของการหมุนเป็นบริเวณไม่กว้างเท่ากับขนาดหลุม 60 และ 80 ไมโครเมตร จึงทำให้ขนาดหลุม 60 และ 80 ไมโครเมตร นั้นมีพื้นที่ว่างที่ไม่มีการกระจายมากกว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร ซึ่งพื้นที่ว่างดังกล่าวทำให้อนุภาคเข้าไปอยู่ได้มากขึ้นเพราะว่าไม่มีแรงหรือการหมุนมากระทำให้อนุภาคให้หลุดออกจากหลุมได้

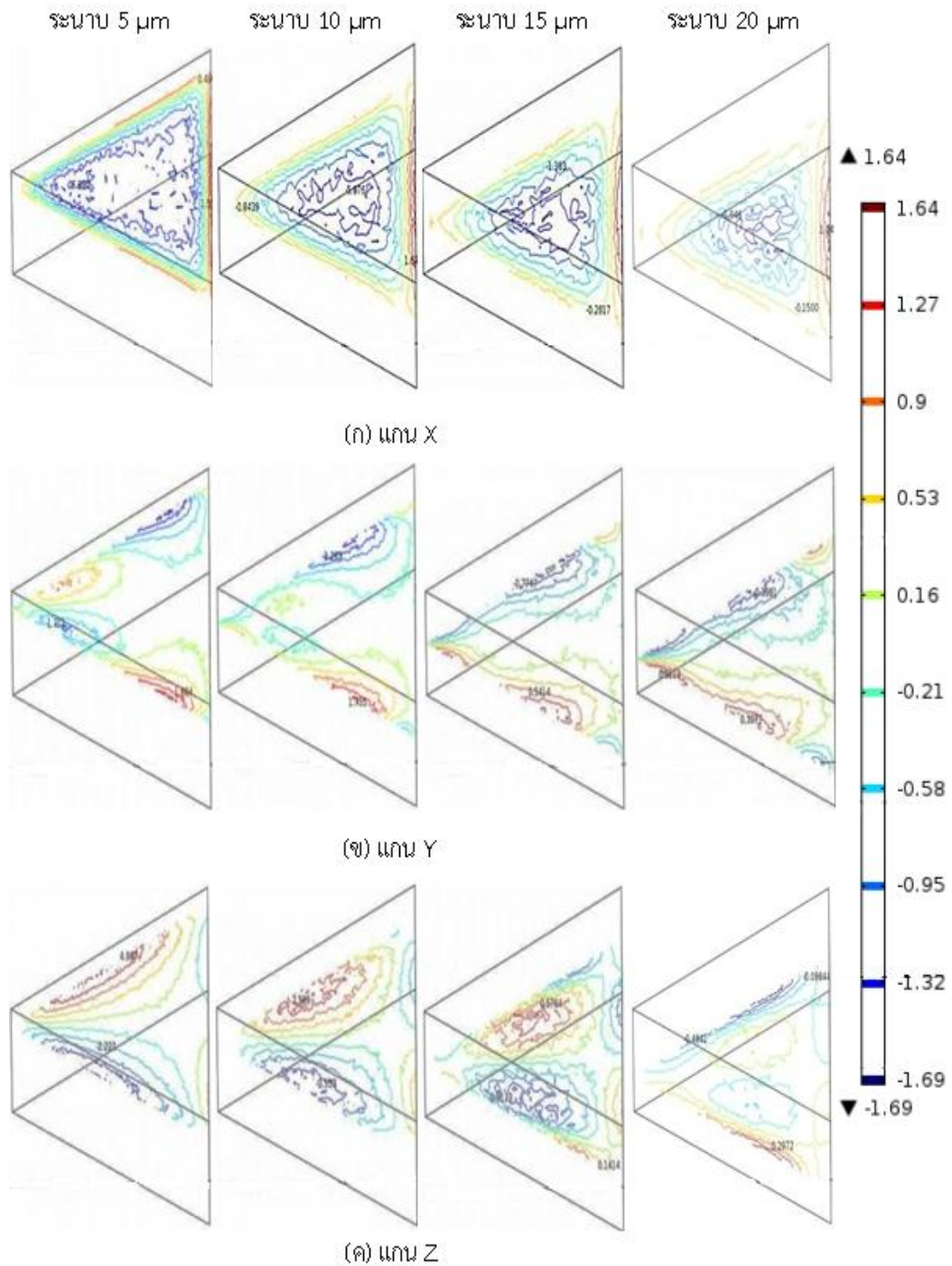
ดังนั้นจากผลของการกระจายตัวของความเร็วและการหมุนทำให้สามารถหาข้อสรุปในเรื่องของขนาดและความลึกของหลุมสำหรับการสร้างอุปกรณ์ตัวใหม่ขึ้นมา โดยหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรที่มีความลึก 30 ไมโครเมตร นี้มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้ดักจับอนุภาคที่เป็นอนุภาคเดี่ยวขนาด 10 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.13 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z



รูปที่ 4.14 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 60 μm ลึก 30 μm (ก) แนวกแกน X (ข) แนวกแกน Y (ค) แนวกแกน Z

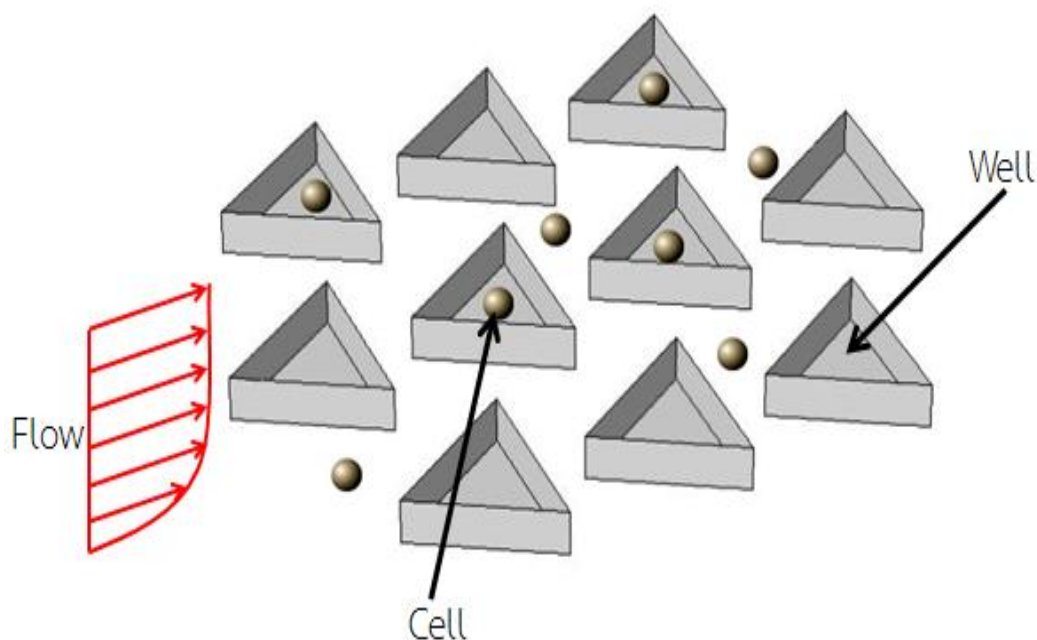


รูปที่ 4.15 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระดับความลึก 5, 10, 15 และ 20 μm ภายในหลุมขนาด 80 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

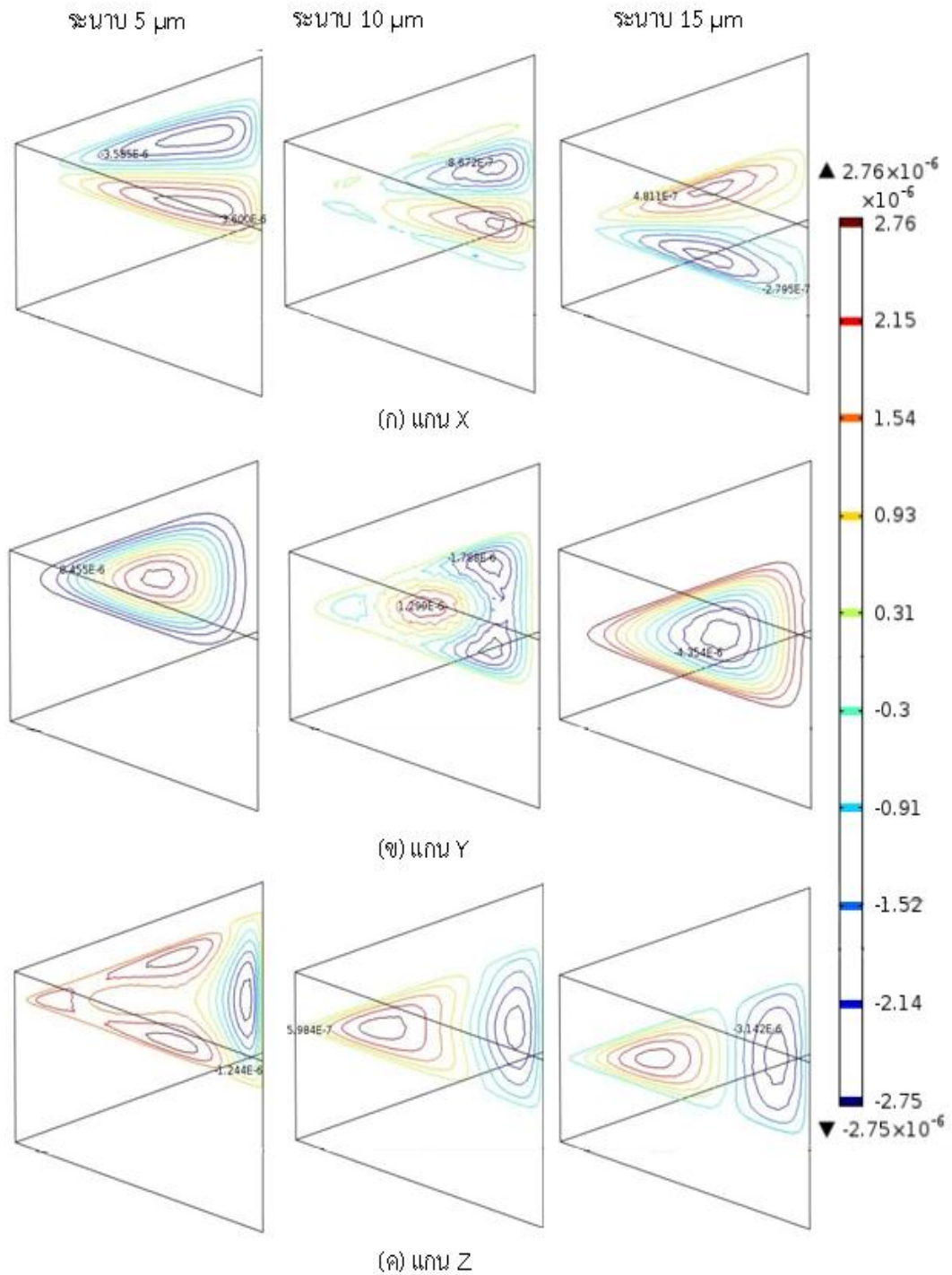
4.4.5 การกระจายตัวของหลุมขนาดเล็กแบบสลับฟันปลา (Zigzag)

โดยในหัวข้อนี้จะแสดงถึงผลการจำลองการไหลของความเร็วและลักษณะของการหมุนที่หลุมขนาด 40 ลีท 30 ไมโครเมตร เนื่องจากเราได้ข้อสรุปขนาดและความลึกจากการจำลองการไหลข้างต้นมาแล้วพบว่าขนาดดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับดักจับเซลล์เดี่ยวได้มากกว่า ซึ่งผลจากการแสดงการกระจายตัวของความเร็วและลักษณะการหมุนของการวางหลุมแบบสลับฟันปลา ซึ่งระยะห่างระหว่างหลุมจะอยู่ที่ 40 ไมโครเมตรและวางเอียงกันจากปลายด้านท้ายถึงยอดด้านหน้าของรูปสามเหลี่ยม 10 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ซึ่งการจำลองครั้งนี้ทำเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าการจัดเรียงตัวแบบสลับฟันปลานั้นมีผลต่อการไหลในหลุมเหมือนหรือต่างกับการจัดเรียงแบบแถวเดี่ยว

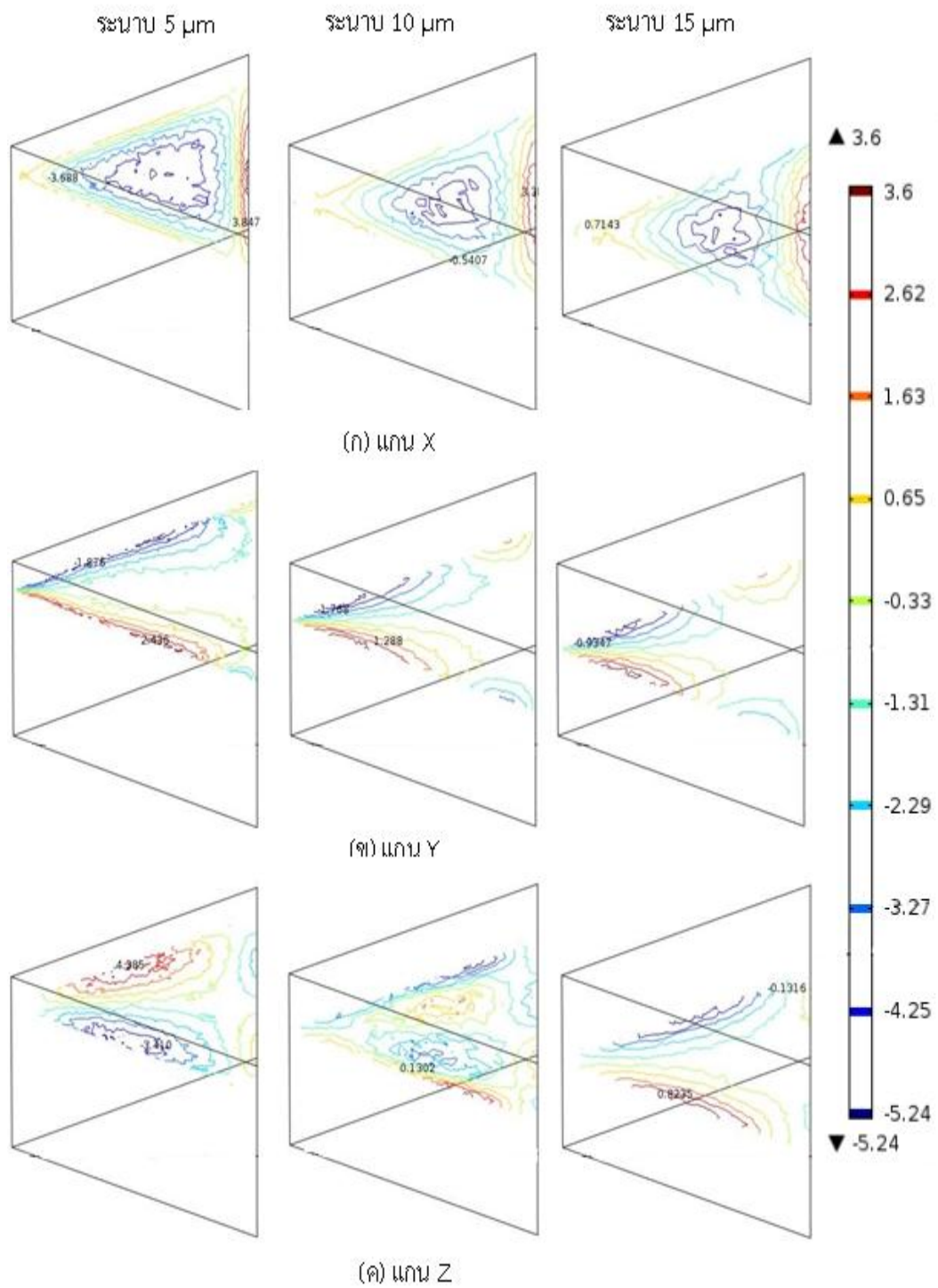
ผลจากการจำลองการกระจายตัวของความเร็วและการหมุนพบว่า มีลักษณะคล้ายกับข้อมูลของหลุมขนาด 40 ลีท 30 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.17 และ 4.18 (เทียบกับรูปที่ 4.5 และ 4.13) จึงทำให้ได้สรุปว่าการกระจายตัวของของไหลภายในหลุมจะไม่มีผลต่อการจัดเรียงตัวของหลุม ซึ่งการจัดเรียงตัวเป็นแบบสลับฟันปลานี้จะส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์ได้มากยิ่งขึ้น เนื่องจากช่องการไหลมีพื้นที่ว่างที่เป็น PDMS น้อยกว่าแบบการวางเรียงตัวเป็นแถว



รูปที่ 4.16 การวางเรียงตัวของหลุมในรูปแบบสลับฟันปลา



รูปที่ 4.17 การกระจายตัวของความเร็ว (s^{-1}) ที่ระนาบความถี่ 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z



รูปที่ 4.18 การกระจายตัวของการหมุน (s^{-1}) ที่ระนาบความลึก 5, 10 และ 15 μm ภายในหลุมขนาด 40 μm ลึก 30 μm (ก) แนวแกน X (ข) แนวแกน Y (ค) แนวแกน Z

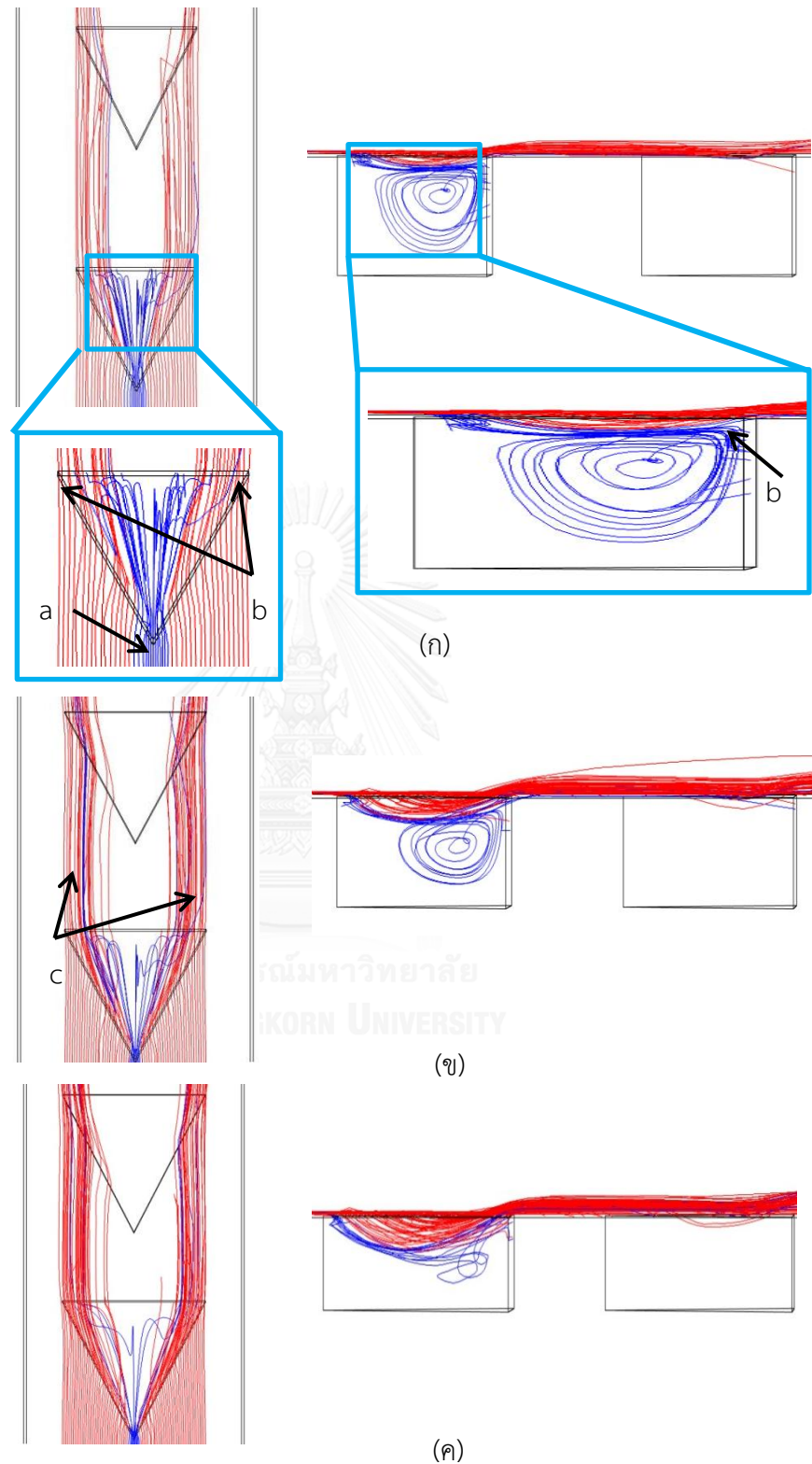
4.4.6 การเคลื่อนที่แบบ 3 มิติ ของของไหลภายในหลุม

หลังจากที่ได้ผลของการกระจายตัวของความเร็วและการหมุนมาแล้วในหัวข้อนี้จะแสดงถึงการเคลื่อนที่ของไหลดังกล่าวว่ามีการเคลื่อนที่ไปในทิศทางใดเมื่อนำการกระจายตัวทั้งสองมารวมกัน ซึ่งจะแสดงทั้งหมด 3 กรณี คือ หลุมขนาด 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร ที่ความลึก 30 ไมโครเมตร

เมื่อทำการพิจารณาการเคลื่อนที่ของของไหลที่ขนาดหลุม 40 ลึก 30 ไมโครเมตร พบว่าหากมีอนุภาคไหลมาพร้อมๆกับของไหลที่บริเวณ a ในรูปที่ 4.19 (ก ซ้าย) จะมีสองกรณีคือไหลผ่านข้ามหลุมไปและไหลเข้าไปในหลุม ซึ่งถ้าหากอนุภาคไหลเข้ามาในหลุมก็จะมีโอกาสเกิดการดักจับอนุภาคที่ไหลเข้ามาได้จากการไหลหมุนวน โดยการไหลหมุนวนนั้นจะส่งอนุภาคให้ลงไปอยู่ด้านล่างของหลุมดังรูปที่ 4.19 (ก ขวา) ทั้งนี้การไหลหมุนวนจะทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวกอดเพื่อไม่ให้อนุภาคไหลกลับขึ้นมาอยู่ในทิศทางของการไหลดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตามหากอนุภาคเกิดถูกการไหลหมุนวนนำไปถึงตำแหน่ง b ในรูป 4.19 (ก ขวา) ก็จะส่งผลให้อนุภาคที่เข้ามาในหลุมแล้วเกิดการหลุดออกจากหลุมได้เนื่องจากเหตุการณ์ดังกล่าว

ถ้ามีอนุภาคไหลเข้ามาที่ตำแหน่ง a ในรูป 4.19 (ก ซ้าย) และไหลเข้าสู่หลุมแล้วจากนั้นถูกการไหลหมุนวนนำมาถึงตำแหน่ง b ในรูป 4.19 (ก ซ้าย) ก็จะส่งผลให้อนุภาคนั้นหลุดออกจากหลุมได้เช่นเดียวกันและเมื่อเทียบกับการเคลื่อนที่ของของไหลที่ขนาดหลุม 60 ไมโครเมตร พบว่าเกิดการเคลื่อนที่ของของไหลและการไหลหมุนวนที่มีลักษณะคล้ายกับขนาดหลุม 40 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.19 (ข) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นมาเล็กน้อยคือที่บริเวณ c จะเห็นว่ามีการเคลื่อนที่ของของไหลที่สามารถนำให้อนุภาคไหลออกจากหลุมได้

หลังจากนั้นเมื่อทำการสังเกตการเคลื่อนที่ของของไหลที่ขนาดหลุม 80 ไมโครเมตรพบว่ามีความแตกต่างกับขนาดของหลุม 40 และ 60 ไมโครเมตร อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งลักษณะการไหลหมุนวนของหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร นั้นจะเกิดการหมุนกระจายทั่วทั้งหลุมและการไหลหมุนวนอาจจะทำให้อนุภาคนั้นหลุดออกจากหลุมได้เนื่องจากเส้นการเคลื่อนที่ของของไหลเคลื่อนลงไปลึกถึงด้านล่างของหลุม ดังรูปที่ 4.19 (ค)



รูปที่ 4.19 การเคลื่อนที่ของของไหลภายในท่ลม ก) ขนาด 40 ลีท 30 ไมโครเมตร ข) ขนาด 60 ลีท 30 ไมโครเมตร ค) ขนาด 80 ลีท 30 ไมโครเมตร (ซ้าย) มุมมองด้านบน (Top view) (ขวา) มุมมองด้านข้าง (Cross section)

4.5 สรุปผล

การคำนวณทางคอมพิวเตอร์ของอุปกรณ์การดักจับเซลล์นี้ทำเพื่อนำมาใช้เป็นตัวช่วยในการตัดสินใจสำหรับการสร้างอุปกรณ์ชิ้นใหม่เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการดักจับได้ โดยการจำลองการไหลดังกล่าวจะทำการจำลองกับรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาด 80x1,000x160 ไมโครเมตร และที่บริเวณด้านล่างของรูปสี่เหลี่ยมจะมีหลุมทรงสามเหลี่ยมถูกวางอยู่ซึ่งขนาดของหลุมสามเหลี่ยมจะมีทั้งหมดสามขนาดคือ 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร และแต่ละขนาดจะมีสามความลึกคือ 15, 30 และ 45 ไมโครเมตร เมื่อทำการผลการจำลองการไหลและแสดงผลออกมาในรูปของการกระจายตัวของความเร็วและลักษณะการหมุนของของไหล พบว่าหลุมทั้งสามขนาดที่ได้กล่าวมานั้นมีลักษณะการเกิดที่อยู่ในลักษณะคล้ายคลึงกันแต่ที่ต่างออกไปจะเป็นในเรื่องของขนาดที่เกิดขึ้น โดยหลุมที่มีขนาดใหญ่จะมีขนาดของความเร็วและการหมุนที่ลดลง

จากการที่ได้ศึกษาพฤติกรรมของไหลและผลที่ได้จากการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ที่จะใช้สำหรับดักจับเซลล์หรืออนุภาค ทำให้เราสามารถสรุปการออกแบบอุปกรณ์การดักจับได้ดังนี้คือ หลุมสามเหลี่ยมที่ขนาดเหมาะสมที่สุดคือ 40 ไมโครเมตรและมีความลึกที่ 30 ไมโครเมตร เนื่องจากการกระจายตัวของความเร็วที่ระนาบ 15 ไมโครเมตร นั้นความเร็วจะกลับมามีความสม่ำเสมอและมีทิศทางตรงข้ามกับทิศทางเริ่มต้นทำให้เหตุการณ์ดังกล่าวทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวปกคลุมอนุภาคให้อยู่ภายในหลุมนี้ได้ และการกระจายตัวของการหมุนที่บริเวณตรงกลางของหลุมจะมีเกิดการหมุนที่รุนแรงน้อยกว่าขอบผนังของหลุม จึงส่งผลให้ขนาดหลุมดังกล่าวมีโอกาสดักจับเซลล์หรืออนุภาคได้เป็นเซลล์เดี่ยวมากกว่าขนาดหลุมอื่นๆ จากนั้นจึงทำการออกแบบให้หลุมมีการวางเรียงตัวในแนวสลับฟันปลาเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการดักจับเซลล์

บทที่ 5

ผลการทดลอง

ในบทนี้จะกล่าวถึงผลการทดลองของอุปกรณ์ที่ได้ทำการออกแบบมาใหม่ซึ่งกระบวนการทดลองและการติดตั้งอุปกรณ์จะใช้เหมือนกับการศึกษาเบื้องต้น (บทที่ 3) โดยอุปกรณ์ใหม่นี้จะประกอบไปด้วยช่องทางการไหล 3 ช่อง แต่ละช่องทางการไหลมีขนาด $5 \times 15 \times 0.07$ มิลลิเมตร และมีหลุมรูปสามเหลี่ยมวางอยู่ที่ด้านล่างของช่องการไหลดังกล่าว ซึ่งขนาดของรูปสามเหลี่ยมนั้นจะมีทั้งหมดสามขนาดคือ 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร และแต่ละขนาดนั้นจะมีความลึกของหลุม 30 ไมโครเมตร โดยการทดลองจะแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ 1) ทำการทดลองกับอนุภาคขนาด 5, 10, 15 และ 20 μm ที่มีความเข้มข้นของอนุภาค 1.8×10^5 bead/ml 2) ทำการทดลองกับเซลล์จริงด้วยความเข้มข้น 3×10^5 cells/ml ซึ่งวิธีการทดลองจะใช้เหมือนกับบทที่ 3 และกำหนดพารามิเตอร์ในการทดลองเป็นการใช้อัตราการไหล 0.1 ml/h

5.1 อุปกรณ์ดักจับเซลล์แบบใหม่

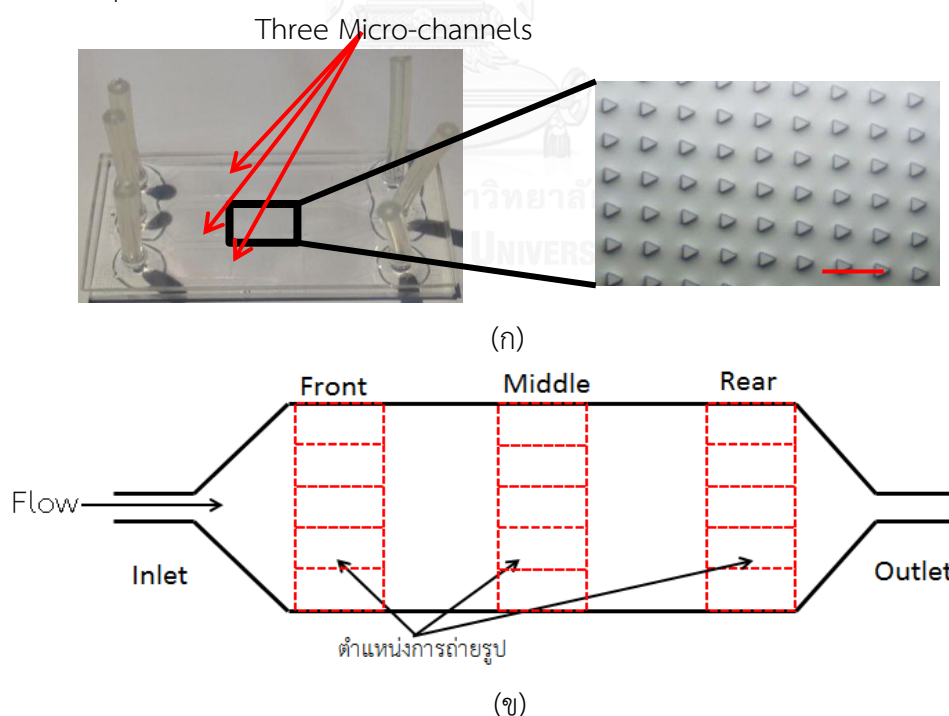
หลังจากได้ผ่านการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์มาแล้วสามารถสรุปพารามิเตอร์และรูปร่างของอุปกรณ์การดักจับเป็นดังรูปที่ 5.1 (ก) โดยช่องการไหลหลักจะมีขนาด 15×5 มิลลิเมตร และสูง 70 ไมโครเมตร ซึ่งบริเวณด้านล่างของช่องการไหลจะมีหลุมรูปสามเหลี่ยมวางเรียงตัวอยู่ในรูปแบบเยื้องกันโดยขนาดของหลุมจะมีสามขนาดคือ 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร (วัดขนาดจริงของหลุมได้ 32, 51 และ 69 ไมโครเมตร ตามลำดับ) ซึ่งมีความลึกเท่ากันคือ 30 ไมโครเมตร

ก่อนเริ่มการทดลองนั้นจะต้องนำอุปกรณ์ไปทำการไล่อากาศออกด้วยการทำ Vacuum เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถึงจะเริ่มทำการทดลอง ซึ่งระยะเวลาในการปล่อยให้ของไหลไหลนั้นจะเหมือนกับการทดลองเบื้องต้น (บทที่ 3) คือ 20 นาทีต่อหนึ่งการทดลอง โดยการทดลองของอุปกรณ์แต่ละขนาดจะทำการทดลองซ้ำอย่างละ 3 ครั้งแล้วนำผลที่ได้มานับเพื่อดูประสิทธิภาพของอุปกรณ์ การนับจำนวนอนุภาคของอุปกรณ์จะใช้วิธีนับจากภาพถ่ายที่ได้มาจากการทดลองโดยที่การทดลอง 1 ครั้งจะถ่ายภาพทั้งหมด 15 ภาพ (ภาพถ่ายอยู่ในภาคผนวก ก.1) ซึ่งจะแบ่งเป็นด้านหน้าจำนวน 5 ภาพ ตรงกลางจำนวน 5 ภาพ และด้านหลังจำนวน 5 ภาพ ดังแสดงในรูปที่ 5.1 (ข) ทั้งนี้ภาพถ่าย 1 ภาพนั้นจะประกอบไปด้วยจำนวนหลุม 220 หลุม จากจำนวนหลุมทั้งหมด 3,300 หลุม (คิดเป็น 30% ของทั้งหมด) ซึ่งหลักการนับนี้จะนับจากจำนวนอนุภาคที่มีอยู่ในหลุมโดยจะแบ่งการนับจำนวนอนุภาคเป็น เซลล์เดี่ยว สองเซลล์ สามเซลล์ และมากกว่าสามเซลล์ขึ้นไป เพื่อนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพของอุปกรณ์หลังจากที่ทดลองแล้ว

5.2 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร

การทดลองการดักจับอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร พบว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคได้สูงสุดและยังสามารถดักจับอนุภาคที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้สูงที่สุดอีกด้วย รองลงมาคือหลุมขนาด 60 และ 80 ไมโครเมตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามขนาดหลุม 60 และ 80 ไมโครเมตร จะมีโอกาสดักจับเซลล์ได้มากกว่าหนึ่งเซลล์ภายในหลุมเดียวกันเพิ่มขึ้นเช่นกัน เนื่องจากหลุมมีขนาดของพื้นที่เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการดักจับอนุภาคให้ได้เป็นเซลล์เดียวนั้นจะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมระหว่างขนาดของหลุมและขนาดของอนุภาค หากหลุมมีขนาดใหญ่กว่าขนาดอนุภาคมากก็จะส่งผลให้เซลล์ที่ดักได้เป็นหลายเซลล์ในหนึ่งหลุม

รูปที่ 5.2 แสดงผลการดักจับอนุภาคของหลุมทั้งสามขนาดนั้นพบว่าเกิดการกระจายตัวของอนุภาคไปทั่วทั้งอุปกรณ์เนื่องจากการดักจับอนุภาคที่เป็นเซลล์เดี่ยวที่บริเวณด้านหน้า ตรงกลางและด้านหลังมีแนวโน้มของการดักจับที่ใกล้เคียงกัน โดยประสิทธิภาพการดักจับอนุภาคของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรสามารถดักจับอนุภาคได้ 300, 319 และ 322 อนุภาค ตามลำดับ ต่อมาที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตรดักจับได้น้อยกว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร อยู่มากพอสมควรซึ่งการดักจับเฉลี่ยแล้วอยู่ที่ 100 อนุภาค และสุดท้ายหลุมขนาด 80 ไมโครเมตรดักจับอนุภาคได้น้อยสุดโดยเฉลี่ยทั้งสามบริเวณดักได้เพียง 50 อนุภาคเท่านั้น



รูปที่ 5.1 ก) อุปกรณ์การดักจับเซลล์ ข) ตำแหน่งการถ่ายรูปสำหรับการนับอนุภาค (Scale bar 120 μm)

5.3 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร

การทดลองการดักจับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร พบว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรสามารถดักจับอนุภาคได้สูงสุดและเป็นอนุภาคเดี่ยวสูงที่สุดด้วย รองลงมาคือขนาดหลุม 60 และ 80 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งให้ผลคล้ายกับการทดลองกับอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร แต่ปริมาณของการดักจับได้มากกว่า 1 อนุภาค มีจำนวนลดลงมากเนื่องจากขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งส่งผลให้พื้นที่ว่างภายในหลุมเหลือน้อยลง ทำให้โอกาสที่อนุภาคจะเข้ามาน้อยลงด้วย ดังรูปที่ 5.3

เมื่อทำการพิจารณากราฟที่ได้จากการดักจับอนุภาคของหลุมทั้งสามขนาดนั้นพบว่ามีความไวคล้ายกับการทดลองกับอนุภาค 5 ไมโครเมตร แต่มีอัตราการดักจับที่น้อยกว่าโดยประสิทธิภาพการดักจับอนุภาคของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรสามารถดักจับอนุภาคได้ 250, 235 และ 237 อนุภาค ตามลำดับ ต่อมาที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตรดักจับได้น้อยกว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรเฉลี่ยแล้วอยู่ที่ 200 อนุภาค และสุดท้ายหลุมขนาด 80 ไมโครเมตรดักจับอนุภาคได้น้อยสุดโดยเฉลี่ยทั้งสามบริเวณดักได้เพียง 143 อนุภาคเท่านั้น แต่เมื่อสังเกตการดักจับที่ได้มากกว่าสองเซลล์ขึ้นไปจะมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยความแตกต่างจะอยู่ในช่วง 20-30 อนุภาค ดังแสดงในรูปที่ 5.3

จากการดักจับอนุภาคของขนาด 5 และ 10 ไมโครเมตร พบว่าแนวโน้มของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคเดี่ยวได้มากที่สุด แต่อนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร นั้นจะมีอัตราการดักจับมากกว่า 1 อนุภาคได้น้อยกว่า เนื่องจากขนาดของอนุภาคและขนาดของหลุมมีความเหมาะสมซึ่งกันและกัน

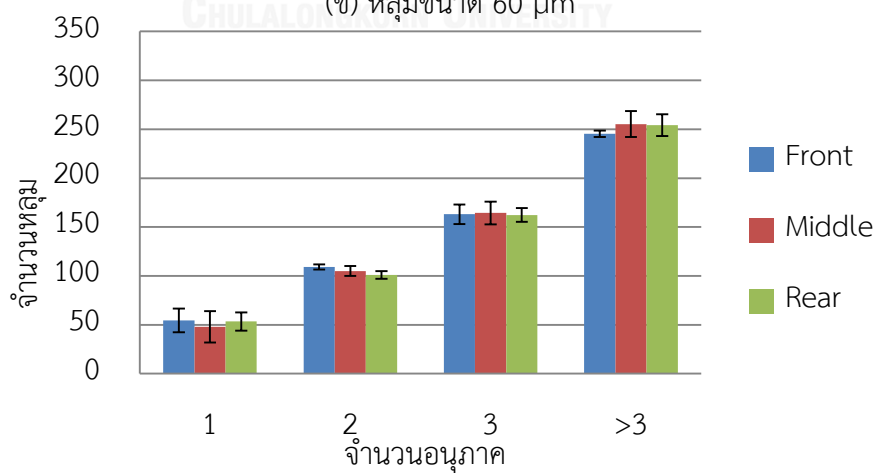
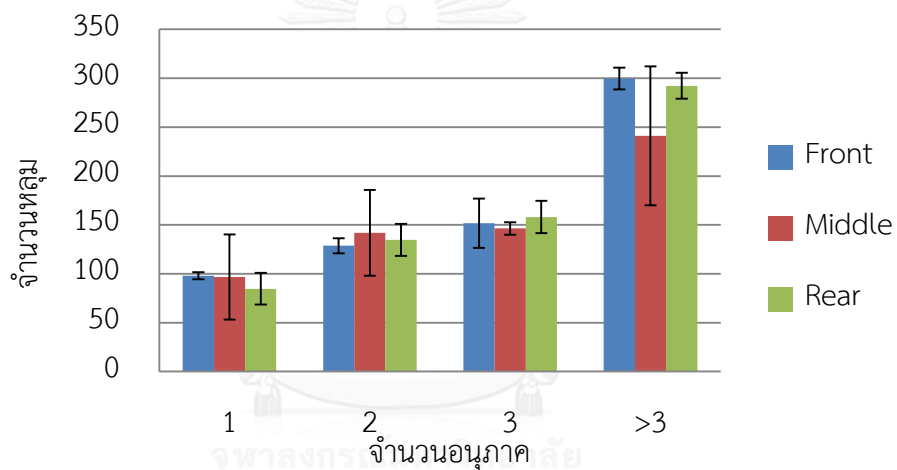
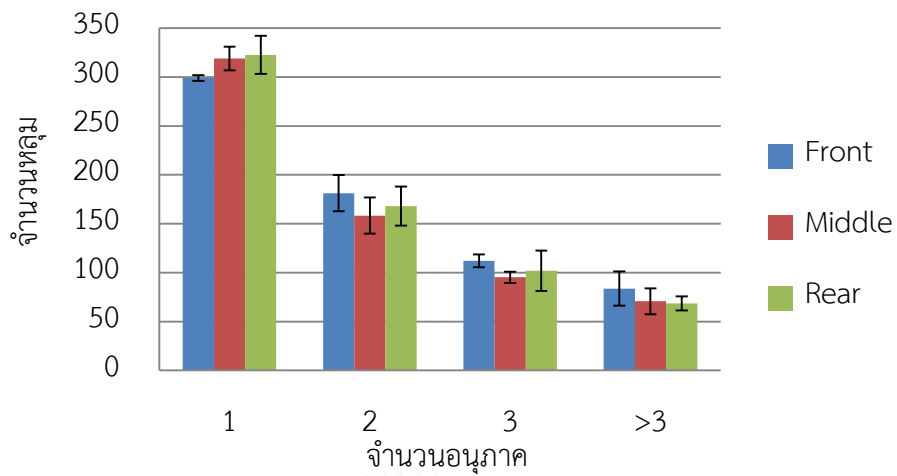
5.4 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร

การทดลองการดักจับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร พบว่าที่ขนาดหลุม 60 ไมโครเมตรสามารถดักจับอนุภาคได้สูงสุด อีกทั้งยังสามารถดักจับอนุภาคที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้สูงที่สุดด้วย รองลงมาคือขนาดหลุม 80 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้ที่ขนาดหลุม 40 ไมโครเมตร ดักจับได้น้อยกว่าการทดลองที่ผ่านมาเพราะว่าขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่เกือบเท่ากับขนาดของหลุมจึงส่งผลให้เกิดความไม่เหมาะสมต่อการดักจับได้ แต่อย่างไรก็ตามขนาดหลุม 80 ไมโครเมตร จะยังคงมีโอกาสดักได้มากกว่าเซลล์เดี่ยวเพิ่มขึ้นเช่นกันเนื่องจากหลุมมีขนาดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งต่อมาพิจารณาถึงการกระจายตัวของอนุภาคดังกล่าวพบว่าการกระจายตัวของอนุภาคไปทั่วทั้งอุปกรณ์คล้ายกับการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 5.4

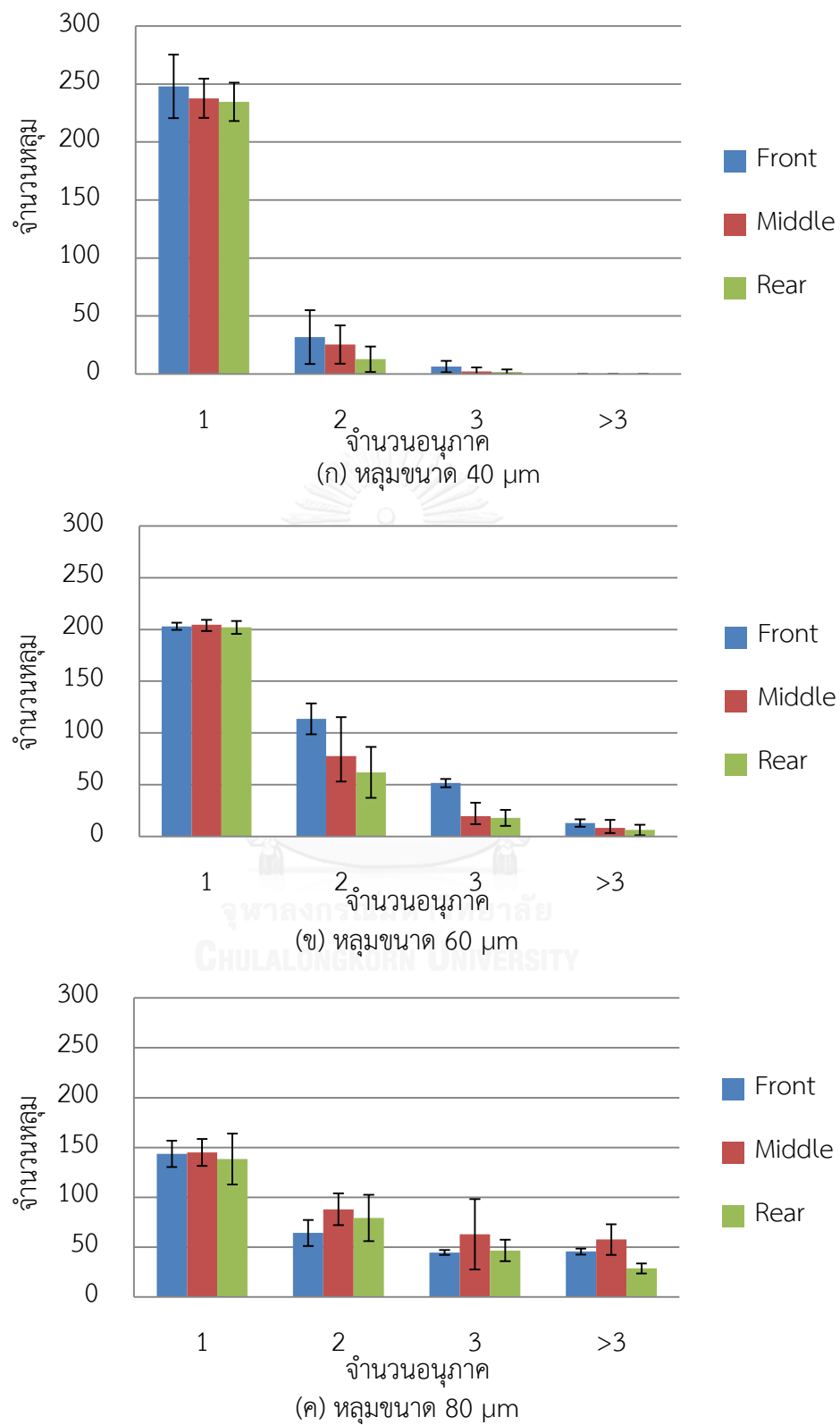
5.5 ผลการทดลองกับอนุภาคขนาด 20 ไมโครเมตร

การทดลองการดักจับอนุภาคขนาด 20 ไมโครเมตร พบว่าที่ขนาดหลุม 80 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคได้สูงสุดและดักจับอนุภาคเดี่ยวได้สูงสุดด้วย รองลงมาคือขนาดหลุม 60 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้ที่ขนาดหลุม 40 ไมโครเมตร ดักจับอนุภาคโดยเฉลี่ยได้เพียง 40 อนุภาคเนื่องจากขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่จึงส่งผลให้เกิดความไม่เหมาะสมต่อการดักจับได้ แต่อย่างไรก็ตามขนาดหลุม 80 ไมโครเมตร มีโอกาสดักได้มากกว่าอนุภาคเดี่ยวลดลงเช่นกันเนื่องจากหลุมมีขนาดที่เพิ่มขึ้น ต่อมาพิจารณาถึงการกระจายตัวของอนุภาคดังกล่าวพบว่ามีการกระจายตัวของอนุภาคไปแค่ด้านบนและด้านล่างของอุปกรณ์การดักจับเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ทำให้เส้นทางการไหลของของไหลเมื่อไหลเข้าสู่อุปกรณ์การไหลจะไหลไปด้านบนและล่างมากกว่าตรงกลาง ซึ่งในรูปที่ 5.5 แสดงจำนวนของอนุภาคที่ดักจับได้

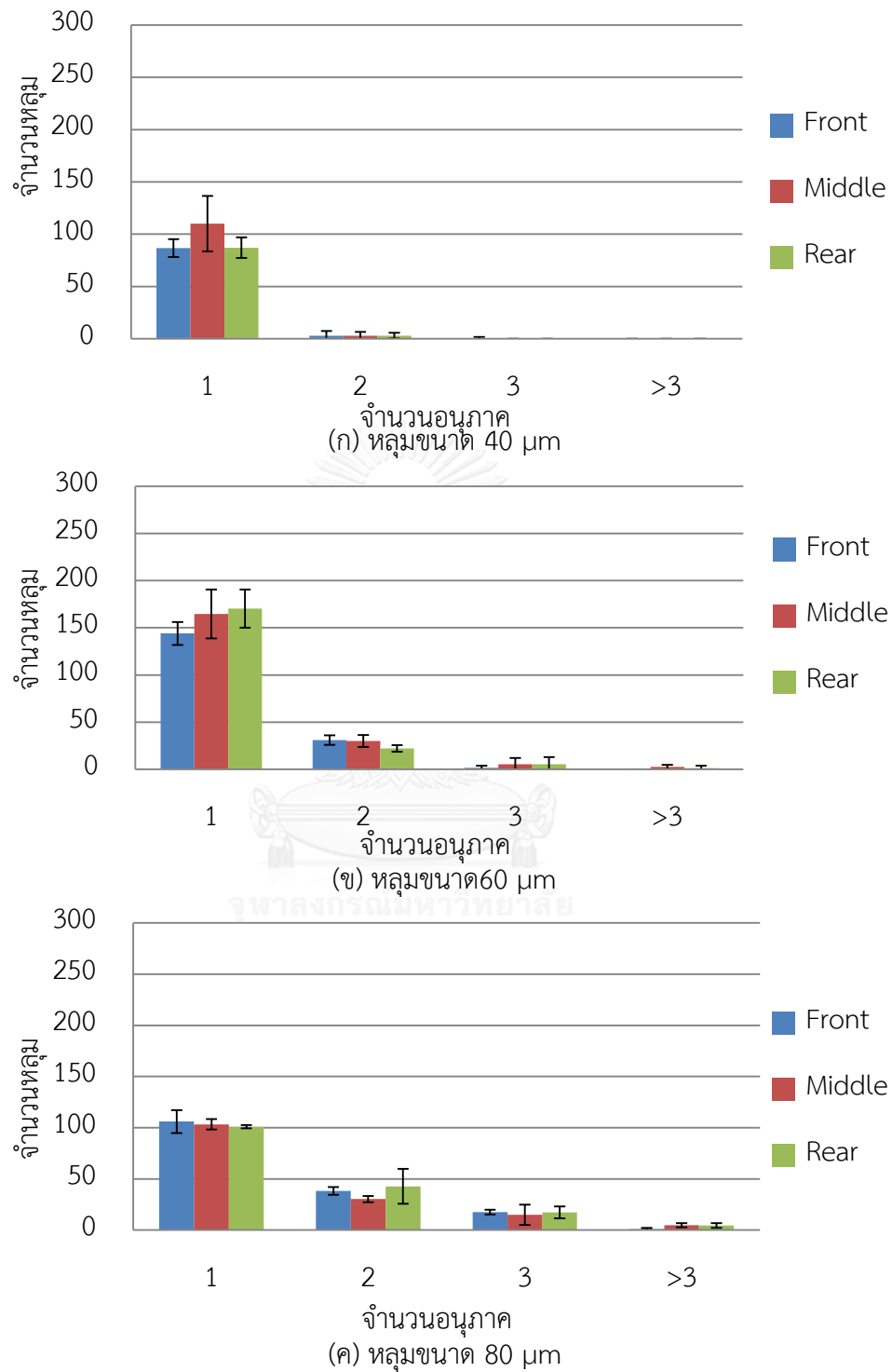
จากการทดลองกับอนุภาคขนาด 5, 10 และ 15 ไมโครเมตร พบว่ามีแนวโน้มของการดักจับอนุภาคได้ดีทั้งที่บริเวณด้านหน้า ตรงกลางและด้านหลัง ส่วนอนุภาคขนาด 20 ไมโครเมตร นั้นเกิดเส้นทางการไหลของอนุภาคไปด้านบนและล่างเป็นส่วนใหญ่ทำให้การกระจายตัวของอนุภาคไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งอุปกรณ์จึงส่งผลให้การทดลองที่ได้ อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ โดยการดักจับอนุภาคที่ขนาด 5 และ 10 ไมโครเมตร พบว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคที่เป็นอนุภาคเดี่ยวเฉลี่ย 310 และ 240 อนุภาคตามลำดับ แต่ในขณะที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคเฉลี่ยได้แค่ 90 และ 200 อนุภาคตามลำดับ และสุดท้ายที่หลุมขนาด 80 ไมโครเมตร ดักจับอนุภาคเฉลี่ยได้น้อยสุดคือ 50 และ 140 อนุภาคตามลำดับ จะเห็นได้ว่าหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักอนุภาคเดี่ยวได้ดีกว่าขนาด 60 และ 80 ไมโครเมตร เนื่องจากขนาดของหลุมและขนาดของอนุภาคมีความเหมาะสมและใกล้เคียงกัน แต่ในทางกลับกันการทดลองกับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร นั้นกลับพบว่าหลุมขนาด 60 ไมโครเมตรนั้นสามารถดักจับเซลล์เดี่ยวเฉลี่ย 160 อนุภาค และที่หลุมขนาด 40 และ 80 ไมโครเมตร ดักจับอนุภาคเดี่ยวเฉลี่ย 94 และ 100 ตามลำดับ สำหรับการดักจับอนุภาคขนาด 20 ไมโครเมตร พบว่าเกิดการดักจับอนุภาคได้น้อยมากเนื่องจากเหตุผลที่ได้กล่าวมาจากเบื้องต้น ซึ่งหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร สามารถดักจับอนุภาคเดี่ยวเฉลี่ย 90 อนุภาค รองลงมาคือหลุมขนาด 60 และ 40 ไมโครเมตร ดักจับอนุภาคเดี่ยวเฉลี่ย 60 และ 40 ตามลำดับ โดยจากการสังเกตผลทดลองพบว่าหากขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นขนาดของหลุมก็จะต้องมีขนาดที่ใหญ่และเหมาะสมกับขนาดอนุภาคนั้นด้วยจึงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพสำหรับการดักจับอนุภาคที่ดี



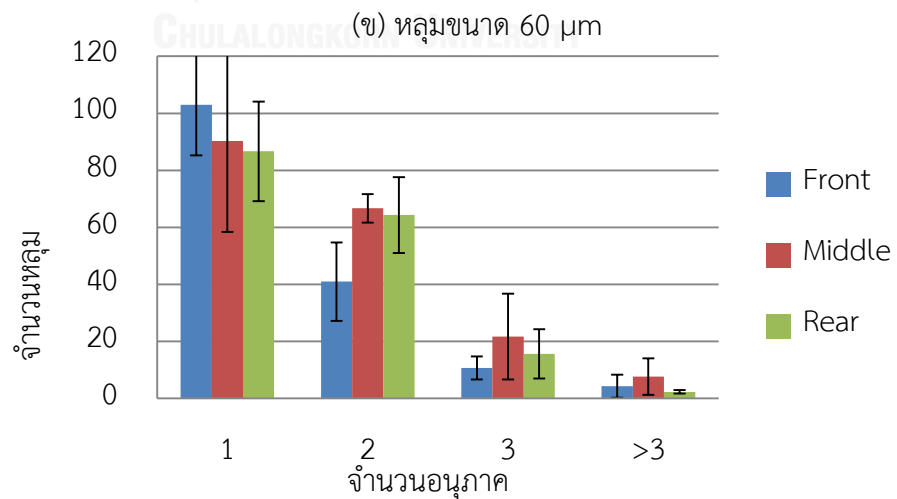
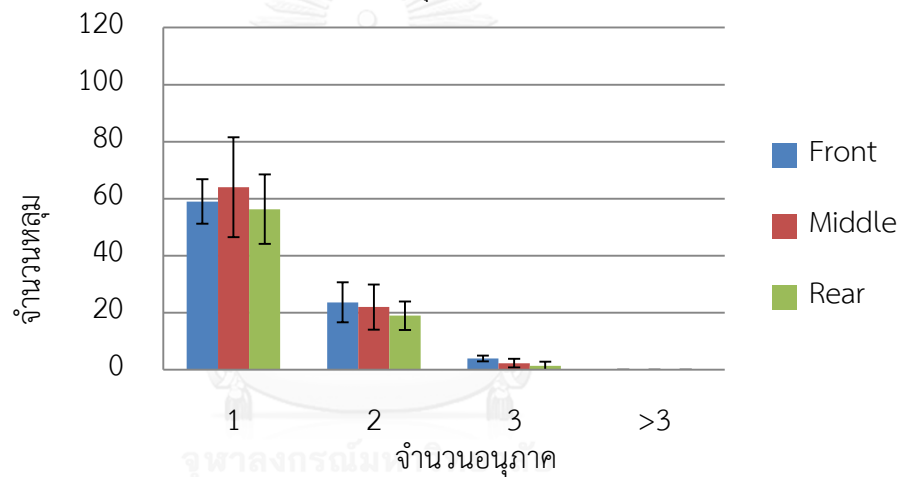
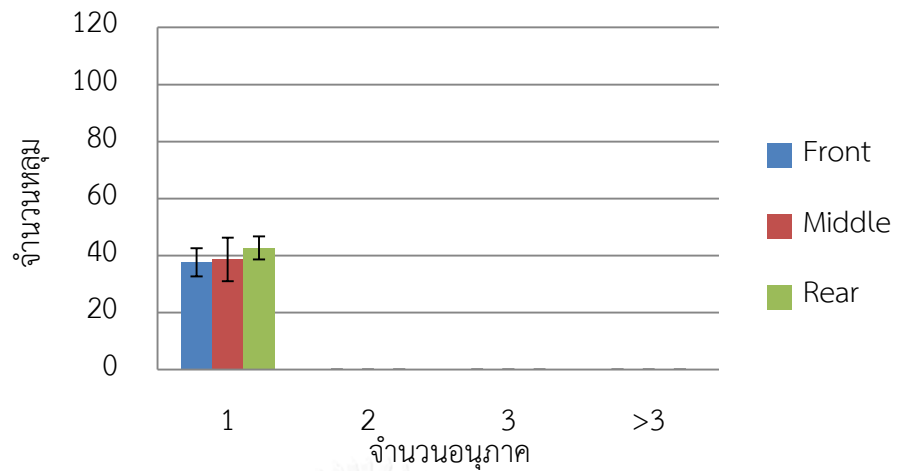
รูปที่ 5.2 จำนวนอนุภาคขนาด 5 µm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 µm ข) หลุมขนาด 60 µm ค) หลุมขนาด 80 µm



รูปที่ 5.3 จำนวนอนุภาคขนาด 10 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm



รูปที่ 5.4 จำนวนอนุภาคขนาด 15 μm ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm



รูปที่ 5.5 จำนวนอนุภาคขนาด 20 μm ที่ตักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm

ดังนั้นหากเราต้องการที่จะดักจับเซลล์เดี่ยวที่มีขนาด 5-10 ไมโครเมตรควรที่จะเลือกใช้หลุมขนาด 40 ไมโครเมตรและลึก 30 ไมโครเมตร และถ้าหากต้องการดักจับเซลล์เดี่ยวที่มีขนาด 15 ไมโครเมตร ก็ควรที่จะเลือกใช้หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร เนื่องจากขนาดและความลึกของหลุมมีความเหมาะสมและมีความสอดคล้องกับผลของการจำลองการไหล ซึ่งจากการจำลองการไหลเบื้องต้นพบว่า การเคลื่อนที่ของของไหลนั้นจะเกิดเป็นลักษณะการไหลหมุนวนซึ่งจะไปทำหน้าที่เหมือนเป็นตัวคลุมหรือช่วยกักอนุภาคให้อยู่ในหลุมได้เมื่ออนุภาคถูกดักแล้ว

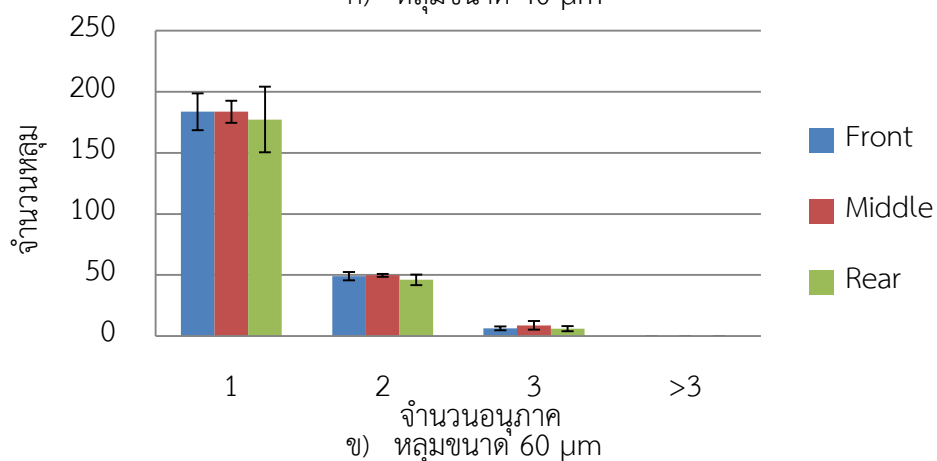
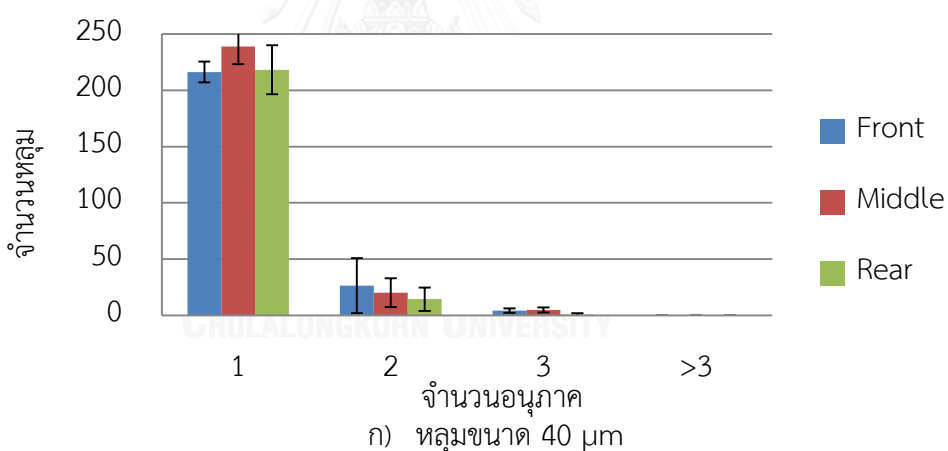
ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในการดักจับอนุภาคเดี่ยวขนาด 10 ไมโครเมตร ของหลุม 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร เป็น $21.14 \pm 7.1\%$, $18.48 \pm 6.2\%$ และ $12.94 \pm 0.5\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5.1 โดยค่าที่ได้ออกมานี้คิดจากหลุมที่มีอนุภาค/หลุมทั้งหมด

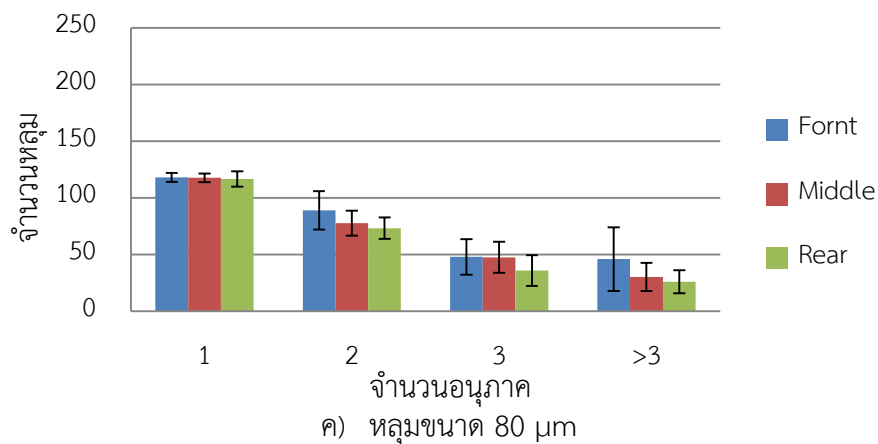
5.6 ผลการทดลองกับเซลล์จริง

ในหัวข้อนี้เราจะใช้อุปกรณ์การดักจับที่มีขนาดของหลุม 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร ที่ความลึกเท่ากัน 30 ไมโครเมตร ซึ่งจะทำให้การทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 7-15 ไมโครเมตร โดยใช้ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเงื่อนไขในการทดลองจะใช้อัตราการไหลเป็น 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจะคล้ายกับการทดลองกับอนุภาค เมื่อทำการนับจำนวนของเซลล์ของหลุมทั้งสามขนาด แล้วพบว่า การดักจับการดักเซลล์ที่หลุมขนาด 40 ไมโครเมตร สามารถดักจับเซลล์เดี่ยวได้มากกว่าหลุมขนาด 60 และ 80 ไมโครเมตร ซึ่งมีแนวโน้มไปในแนวทางเดียวกันกับการทดลองด้วยอนุภาค แต่การเพิ่มขึ้นของจำนวนการดักจับได้หลายเซลล์ต่อ 1 หลุมนั้นค่อนข้างแตกต่างกันคือจำนวนที่ดักจับได้จะมีจำนวนที่น้อยกว่าการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากความไม่สม่ำเสมอของขนาดเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งส่งผลในเรื่องน้ำหนักของแต่ละเซลล์ไม่เท่ากัน ทำให้เซลล์ขนาดเล็กที่ไหลเข้ามาในอุปกรณ์ลอยอยู่เหนือหลุมและข้ามผ่านหลุมออกจากอุปกรณ์ไปได้ง่าย ซึ่งความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นจะมีค่าที่ใกล้เคียงกันกับความหนาแน่นของอนุภาค ดังนั้นความหลากหลายของเซลล์และความไม่สม่ำเสมอของขนาดของเซลล์อาจจะส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดลองได้ โดยผลของการดักจับเซลล์เดี่ยวเฉลี่ยของหลุมขนาด 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร คือ 225, 180 และ 117 เซลล์ตามลำดับ รูปที่ 5.6 พบว่าการกระจายตัวของเซลล์ก็มีความสม่ำเสมอคล้ายกับการทดลองด้วยอนุภาคเช่นกัน โดยประสิทธิภาพของการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาวของหลุมขนาด 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร คิดเป็น $20 \pm 6.8\%$, $16.5 \pm 5.5\%$ และ $10.6 \pm 3.5\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5.2

ในการศึกษาของ นสพ. เดชชชัย เกตุพันธ์ [27] ได้มีการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์โดยการเปลี่ยนแปลงการทดลองกับหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร ลึก 30 ไมโครเมตร โดยการเปลี่ยนจากการไหลแบบต่อเนื่องเป็นแบบการปล่อยแล้วหยุดเป็นจังหวะภายใต้เงื่อนไขที่ว่า เริ่มต้นจากการป้อนเซลล์ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเห็นว่าเซลล์กระจายเต็มทั้งอุปกรณ์แล้วให้ทำการหยุดปั๊มเป็นเวลา 3 นาที เพื่ออาศัยแรงโน้มถ่วงในการดึงดูดเซลล์ให้เคลื่อนที่ลงมาใกล้หลุม เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดก็ดำเนินการต่อด้วยการปรับให้มีอัตราการไหลเป็น 0.18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเป็นเวลา 5 นาที โดยจะทำการทดลองแบบนี้ทั้งหมด 10 รอบ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เดี่ยวได้มากขึ้นกว่าการทดลองแบบการไหลต่อเนื่อง จาก 20% เป็น 30%

จากการทดลองทั้งหมดที่ผ่านมาพบว่าอุปกรณ์การดักจับที่มีหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร ลึก 30 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาว (ขนาด 7-15 ไมโครเมตร) และอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้ดีที่สุดและยังให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย รองลงมาคือหลุมขนาด 60 และ 80 ไมโครเมตร ตามลำดับ





รูปที่ 5.6 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ดักจับได้ทั้ง 15 ตำแหน่ง ก) หลุมขนาด 40 μm ข) หลุมขนาด 60 μm ค) หลุมขนาด 80 μm

ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพในการดักจับอนุภาคของหลุมขนาดต่างๆ

จำนวนอนุภาคขนาด 5 μm			
การดักจับ \backslash ขนาดหลุม	40 μm	60 μm	80 μm
Total	60.0 \pm 0.9%	59.8 \pm 1.0%	51.9 \pm 0.1%
Single	28.5 \pm 9.5%	8.5 \pm 2.8%	4.7 \pm 1.6%
Double	15.4 \pm 5.1%	12.3 \pm 4.1%	9.6 \pm 3.2%
Triple	9.4 \pm 3.1%	13.8 \pm 4.6%	14.8 \pm 4.9%
>3 Cell	6.8 \pm 2.3%	25.2 \pm 8.4%	22.9 \pm 7.6%
จำนวนอนุภาคขนาด 10 μm			
การดักจับ \backslash ขนาดหลุม	40 μm	60 μm	80 μm
Total	23.6 \pm 0.7%	29.7 \pm 1.5%	28.6 \pm 1.4%
Single	21.1 \pm 7.1%	18.5 \pm 6.2%	12.9 \pm 0.5%
Double	2.1 \pm 0.7%	7.7 \pm 2.6%	7.0 \pm 0.5%
Triple	0.3 \pm 0.1%	2.7 \pm 0.9%	4.7 \pm 0.5%
>3 Cell	0	0.8 \pm 0.3%	4.0 \pm 0.2%

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

จำนวนอนุภาคขนาด 15 μm			
การดักจับ \diagdown ขนาดหลุม	40 μm	60 μm	80 μm
Total	8.9 \pm 0.4%	17.5 \pm 0.5%	14.6 \pm 0.4%
Single	8.6 \pm 2.9%	14.5 \pm 4.8%	9.4 \pm 3.1%
Double	0.3 \pm 0.1%	2.5 \pm 0.8%	3.4 \pm 1.1%
Triple	0	0.4 \pm 0.1%	1.5 \pm 0.5%
>3 Cell	0	0.1 \pm 0.0%	0.3 \pm 0.1%
จำนวนอนุภาคขนาด 20 μm			
การดักจับ \diagdown ขนาดหลุม	40 μm	60 μm	80 μm
Total	3.6 \pm 0.1%	7.6 \pm 0.3%	15.6 \pm 0.6%
Single	3.6 \pm 1.2%	5.4 \pm 1.8%	8.5 \pm 2.8%
Double	0	1.9 \pm 0.7%	5.2 \pm 1.7%
Triple	0	0.2 \pm 0.1%	1.5 \pm 0.5%
>3 Cell	0	0	0.4 \pm 0.1%

ตารางที่ 5.2 ประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาวของหลุมขนาดต่างๆ

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว			
การดักจับ \diagdown ขนาดหลุม	40 μm	60 μm	80 μm
Total	22.5 \pm 0.5%	21.5 \pm 0.2%	25.0 \pm 0.9%
Single	20.4 \pm 6.8%	16.5 \pm 5.5%	10.6 \pm 3.5%
Double	1.8 \pm 0.6%	4.3 \pm 1.4%	7.3 \pm 2.4%
Triple	0.3 \pm 0.1%	0.63 \pm 0.2%	4.0 \pm 1.3%
>3 Cell	0	0	3.1 \pm 1.0%

5.7 สรุปผล

จากผลการทดลองใช้อัตราการไหล 0.1 ml/h และความเข้มข้นของการทดลองที่ใช้กับอนุภาค 1.8×10^5 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และเซลล์ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจะเห็นว่าแนวโน้มของการดักจับอนุภาคของอุปกรณ์มีการกระจายตัวทั่วทั้งอุปกรณ์สังเกตได้จากกราฟที่แสดงดังรูปที่ 5.2 ถึง 5.5 โดยการดักจับอนุภาคของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตรเมื่อนำคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จะสามารถดักจับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตรที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้ถึง 21% แต่เมื่อทำการดักจับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร ที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้เพียง 8.6% เท่านั้น และเมื่อพิจารณาที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตรจะสามารถดักอนุภาคขนาด 10 และ 15 ไมโครเมตรที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้ 18.5% และ 14.5% ตามลำดับ สุดท้ายขนาดของหลุม 80 ไมโครเมตร เกิดการดักจับอนุภาคขนาด 10 และ 15 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยว 12.9% และ 9.4% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อขนาดของหลุมมีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดักอนุภาคได้มากขึ้นด้วยแต่ก็จะเกิดผลที่ตามมาก็คือจะดักจับอนุภาคได้มากกว่าเซลล์เดี่ยวมากขึ้นด้วยเช่นกัน และจากการนับจำนวนของเซลล์ที่ได้ทำการทดลองแล้วพบว่าปริมาณการดักจับเซลล์เดี่ยวจะได้ค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ซึ่งหากนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วได้ 20% โดยผลการทดลองที่ได้นี้จะใช้อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

บทที่ 6

สรุปผลของงานวิจัย

ในบทนี้จะกล่าวถึงประเด็นสำคัญต่างๆ ของงานวิจัยนี้ตั้งแต่ขั้นตอนการศึกษาอุปกรณ์การดักจับอนุภาคเบื้องต้น การออกแบบอุปกรณ์ กระบวนการสร้าง การจำลองการไหล และผลการทดลองของอนุภาคและเซลล์

6.1 สรุปงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบอุปกรณ์การดักจับอนุภาคหรือเซลล์ที่ใช้สำหรับดักจับอนุภาคและเซลล์ขนาด 5-20 ไมโครเมตร ด้วยหลุมรูปสามเหลี่ยมขนาดจุลภาค

การทำงานวิจัยนี้จะเริ่มต้นจากการศึกษาการดักจับอนุภาคจากงานวิจัยอื่นๆ แล้วพบว่าในปัจจุบันมีมากมายหลายวิธีทำให้เราสามารถเลือกนำวิธีการต่างๆ มาใช้งาน ทั้งทางด้านของที่มีแรงเข้ามาเกี่ยวข้องและไม่มีแรงเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งจะนำวิธีดังกล่าวมาใช้งานเพื่อดักจับอนุภาค เซลล์แบคทีเรีย เซลล์มะเร็ง เป็นต้น โดยที่สารละลายที่ใช้สำหรับการป้อนเข้าอุปกรณ์นี้จะอยู่ในช่วง 1.8×10^5 ถึง 10^9 cell/ml ทั้งนี้วัสดุอุปกรณ์ที่นำมาใช้สร้างเป็นอุปกรณ์การดักจับนี้ส่วนใหญ่จะใช้เป็น PDMS เนื่องจาก PDMS เป็นโพลิเมอร์ที่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของเซลล์ไม่มากนักและยังสามารถหาได้ง่ายและราคาไม่สูงมาก

นอกจากนี้การดักจับเซลล์มีทั้งเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์โดยการดักจับให้เป็นเซลล์เดี่ยวเพื่อต้องการที่จะศึกษาคุณสมบัติของเซลล์นั้นและดักจับที่เป็นแบบหลายเซลล์จะเป็นการศึกษาผลที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์เหล่านั้น และการออกแบบอุปกรณ์สำหรับดักจับเซลล์นั้นจะออกแบบให้มีลักษณะเป็นหลุมซึ่งในแต่ละงานก็จะออกแบบไม่เหมือนกัน เช่น วงกลม สี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม และสามเหลี่ยม โดยส่วนใหญ่จะใช้อัตราการไหลสำหรับดักจับตั้งแต่ 0.18 ml/h ขึ้นไป

หลังจากที่ได้ศึกษาพารามิเตอร์และการทำงานของอุปกรณ์การดักจับแล้ว เราก็สามารถที่จะนำความรู้ที่ได้จากการศึกษามาทำการประยุกต์และพัฒนาเป็นอุปกรณ์การดักจับขึ้น โดยอุปกรณ์ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบนั้นจะประกอบไปด้วยท่อที่มีความกว้าง 500 ไมโครเมตร ความสูง 160 ไมโครเมตร และความยาว 15 มิลลิเมตร มีช่องทางเข้าสำหรับสารละลายผสมอนุภาคพลาสติกและช่องทางออกสำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งจะถูกสร้างด้วยเทคโนโลยีที่ชื่อว่า Soft lithography

หลังจากผ่านกระบวนการสร้างแล้วก็จะเข้าสู่ขั้นตอนของการทดลองโดยจะเริ่มจากติดตั้งอุปกรณ์ต่างๆ เข้าด้วยกัน ซึ่งในการทดลองจะใช้อนุภาคพลาสติกขนาด 10 μm และใช้อัตราการไหลของสารละลายผสมอนุภาคพลาสติก 0.3 และ 0.1 ml/h ที่ความเข้มข้น 1.8×10^5 bead/ml สำหรับ

ป้อนอนุภาคให้เข้าไปในอุปกรณ์ และใช้อัตราการไหลของสารทำความสะอาด 0.5 mL/h เพื่อให้อนุภาคที่ตกค้างอยู่หลุดออกจากอุปกรณ์ ซึ่งผลของการทดลองที่ได้พบว่าที่อัตราการไหล 0.1 mL/h สามารถดักอนุภาคได้มากกว่าอัตราการไหล 0.3 mL/h เพราะว่าความเร็วมีผลต่อการดักอนุภาคโดยตรงยิ่งมีค่าน้อยจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักอนุภาคได้มากขึ้นแต่หากมีค่าน้อยหรือมากเกินไปจะทำให้อนุภาคไม่สามารถงกลมได้ ทั้งนี้ในการทดลองควรควบคุมความเร็วให้มีค่าที่เหมาะสม

ต่อมาทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพัฒนาต่อไปว่าหากต้องการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพให้กับอุปกรณ์โดยใช้การคำนวณทางคอมพิวเตอร์เพื่อดูลักษณะการกระจายตัวของของไหลที่เกิดภายในหลุม โดยจะแบ่งการจำลองการไหลออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งทำการวางหลุมจุลภาคให้มีลักษณะของหลุมถูกวางอยู่ในแนวเดียวกัน โดยรูปร่างของจำลองการไหลจะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมโดยมีด้านกว้าง 0.08 มิลลิเมตร ด้านยาว 1 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร และส่วนที่สองจะทำการวางหลุมจุลภาคให้มีลักษณะของหลุมเป็นแบบสลับฟันปลา (Zigzag) ซึ่งรูปร่างของส่วนที่สองนี้จะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมที่มีขนาดด้านกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ด้านยาว 1 มิลลิเมตร และสูง 70 ไมโครเมตร และบริเวณด้านล่างของรูปสี่เหลี่ยมทั้งสองส่วนจะประกอบไปด้วยหลุมรูปสามเหลี่ยมที่ที่แตกต่างกันสามรูปร่างโดยมีขนาดของหลุมจุลภาคเป็น 40, 60 และ 80 ไมโครเมตรซึ่งแต่ละขนาดจะมีความลึกของหลุมจุลภาคขนาด 15, 30 และ 45 ไมโครเมตร

ผลการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์พบว่าการกระจายตัวของความเร็วและการหมุนของหลุมทั้งสามขนาดจะเกิดการกระจายตัวที่คล้ายกันโดยทั้งสามแนวนั้นจะมีขนาดของการหมุนที่บริเวณตรงกลางน้อยที่สุด ซึ่งถ้าหากมีอนุภาคเคลื่อนที่ไปบริเวณตรงกลางของการหมุนนี้ก็ไม่ส่งผลให้อนุภาคหลุดออกจากหลุมได้ แต่ถ้าอนุภาคเคลื่อนที่ไปตำแหน่งอื่นๆ ที่ไม่ใช่ตรงกลางก็อาจจะก่อให้เกิดการหลุดออกจากหลุมของอนุภาคได้เนื่องจากที่บริเวณขอบของหลุมนั้นจะมีการหมุนที่มีขนาดรุนแรงกว่า

เราสามารถสรุปการออกแบบอุปกรณ์การดักจับอนุภาคได้ดังนี้คือ หลุมสามเหลี่ยมที่ขนาดเหมาะสมที่จะดักจับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตรได้ดีที่สุดคือ 40 ไมโครเมตร และมีความลึกที่ 30 ไมโครเมตร เนื่องจากการไหลหมุนวนและการกระจายตัวของการหมุนมีค่าคงที่และยังทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวคลุมหรือกักอนุภาคไว้เมื่ออนุภาคถูกดักจับ จากนั้นจึงทำการออกแบบให้หลุมมีการวางเรียงตัวในแนวสลับฟันปลาเป็นการตรวจสอบว่าการจัดเรียงตัวแบบสลับฟันปลานั้นมีผลต่อการไหลในหลุมเหมือนหรือต่างกับการจัดเรียงแบบแถวเดียว

เมื่อทำการสรุปขนาดของอุปกรณ์ที่ได้ออกแบบมาใหม่ จึงได้ทำการสร้างอุปกรณ์ดังกล่าวขึ้นมา โดยอุปกรณ์จะประกอบไปด้วยช่องทางการไหล 3 ช่อง แต่ละช่องทางการไหลมีขนาด

5x15x0.07 มิลลิเมตร และมีหลุมรูปสามเหลี่ยมวางอยู่ที่ด้านล่างของช่องการไหลดังกล่าว โดยขนาดของรูปสามเหลี่ยมนั้นจะมีทั้งหมดสามขนาดคือ 40, 60 และ 80 ไมโครเมตร ซึ่งแต่ละขนาดนั้นจะมีความลึกของหลุม 30 ไมโครเมตร

จากนั้นก็นำมาทดลองกับอนุภาคขนาด 5 ถึง 20 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้น 1.8×10^5 bead/ml รวมไปถึงมีการทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาด 7-15 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้น 3×10^5 cell/ml ด้วยอัตราการไหล 0.1 ml/h ซึ่งจากผลการทดลองปรากฏว่าการดักจับอนุภาคของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร เมื่อนำคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จะสามารถดักจับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้ถึง 21% แต่เมื่อทำการดักจับอนุภาคขนาด 15 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้เพียง 8.6% เท่านั้น และเมื่อพิจารณาที่หลุมขนาด 60 ไมโครเมตร จะสามารถดักอนุภาคขนาด 10 และ 15 ไมโครเมตร ที่เป็นอนุภาคเดี่ยวได้ 18.5% และ 14.5% ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดขาว จากการนับจำนวนของเซลล์ที่ได้ทำการทดลองแล้วพบว่าปริมาณการดักจับเซลล์เดี่ยวจะได้ค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองกับอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ซึ่งหากนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วได้ 20% โดยผลการทดลองที่ได้นี้จะใช้อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

6.2 ข้อเสนอแนะ

ปัญหาในงานวิจัยที่เกิดขึ้นจะอยู่ที่ปัญหาในการสร้างและการทดลอง พบว่าการสร้างทำได้ในขนาดที่ค่อนข้างจำกัดทำให้ขนาดที่ได้ออกแบบไว้กับขนาดที่ได้จริงมีค่าคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการดักจับอนุภาคได้ และปัญหาในการทดลองจะเป็นในเรื่องของการตกตะกอนของสารละลายอนุภาคทั้งในสายยาง สามารถแก้ไขด้วยการทวนสารละลายสม่ำเสมอ

สำหรับการเพิ่มจำนวนการดักจับเซลล์นั้นสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนอัตราการไหลจากการไหลแบบต่อเนื่องเป็นแบบการปล่อยแล้วหยุดเป็นจังหวะ เริ่มต้นจากการป้อนเซลล์ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงจนเซลล์เต็มอุปกรณ์ หลังจากนั้นหยุดปั๊มเป็นเวลา 3 นาที เพื่ออาศัยแรงโน้มถ่วงในการดึงดูดเซลล์ให้เคลื่อนที่ลงมาใกล้หลุม เมื่อครบตามเวลาจึงทำการปรับให้มีอัตราการไหลเป็น 0.18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการทดลองแบบนี้ทั้งหมด 10 รอบ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เดี่ยวได้มากขึ้นกว่าการทดลองแบบการไหลต่อเนื่องจาก 20% เป็น 30%

สุดท้ายการดักจับเซลล์นั้นมีความยากลำบากอยู่พอสมควรเนื่องจากขนาดของเซลล์มีหลายขนาดทำให้การดักจับเซลล์เกิดความคลาดเคลื่อน เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอกันของขนาดเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์ขนาดเล็กที่ไหลเข้ามาในอุปกรณ์ลอยอยู่เหนือหลุมและข้ามผ่านหลุมออกจากอุปกรณ์ไปได้ง่าย รวมไปถึงขั้นตอนการจัดเตรียมเซลล์และการทดลองจะต้องใช้เวลาที่ห่างกันไม่มาก

หากเตรียมเซลล์ทิ้งไว้นานจะส่งผลให้เซลล์ที่เตรียมไว้เกิดความเสียหายและมีจำนวนลดลงเพราะว่าสีที่
ใช้ย้อมจะไปทำปฏิกิริยากับเซลล์จนทำให้เซลล์นั้นแตก



รายการอ้างอิง

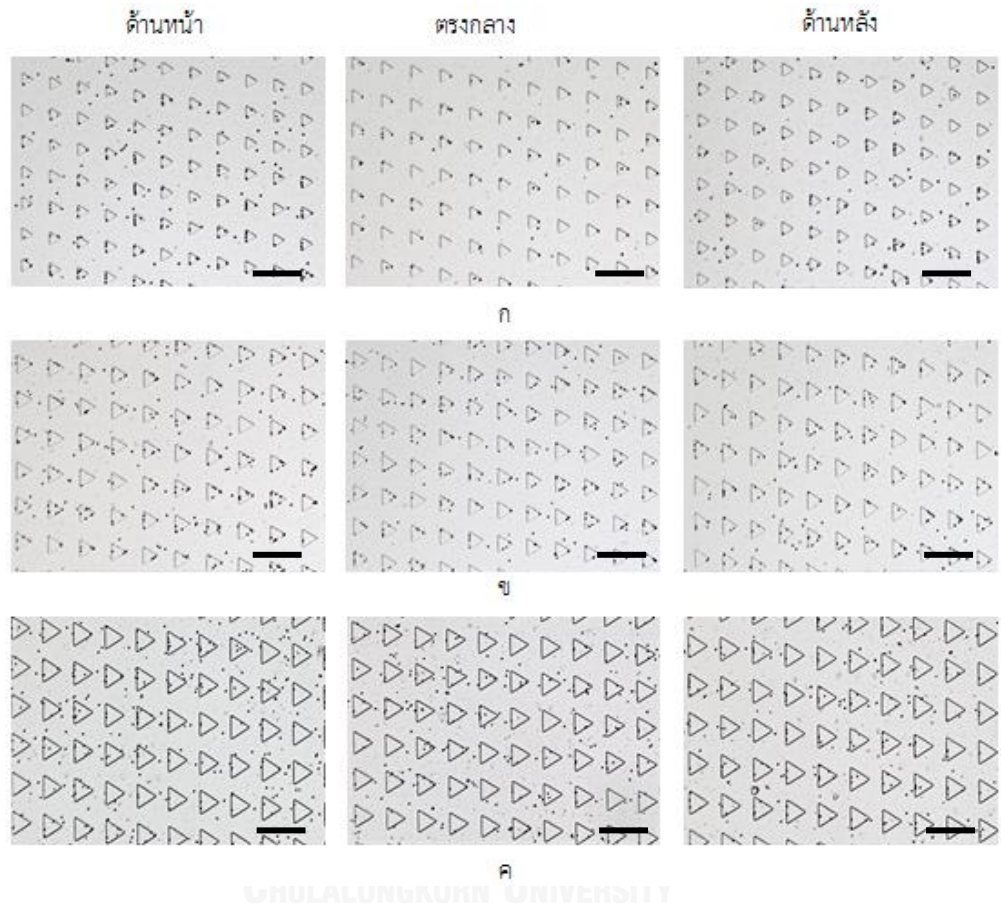
- [1] Available: <http://www.phukethospital.com/Thai/Health-Information/Cancer.php>
- [2] I. Meyvantsson and D. J. Beebe, "Cell culture models in microfluidic systems," *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, vol. 1, pp. 423-49, 2008.
- [3] S. J. Trietsch, T. Hankemeier, and H. J. van der Linden, "Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 108, pp. 64-75, 2011.
- [4] Available: www.agilent.com
- [5] A. Thanormsridetchai, D. Ketpun, A. Pimpin, W. Srituravanich, P. Piyaviriyakul, A. Sailasuta, *et al.*, "Separation of particles in spiral microchannels," *The 28 conference of mechanical engineering network of thailand*, 2015.
- [6] R. M. Johann, "Cell trapping in microfluidic chips," *Anal Bioanal Chem*, vol. 385, pp. 408-12, Jun 2006.
- [7] J. Pivetal, D. Royet, G. Ciuta, M. Frenea-Robin, N. Haddour, N. M. Dempsey, *et al.*, "Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 380, pp. 72-77, 2015.
- [8] G. Fuhr, T. Muller, V. Baukloh, and K. Lucas, "High-frequency electric field trapping of individual human spermatozoa," *Human Reproduction*, vol. 13, pp. 136-141, 1998.
- [9] M. Bocchi, M. Lombardini, A. Faenza, L. Rambelli, L. Giulianelli, N. Pecorari, *et al.*, "Dielectrophoretic trapping in microwells for manipulation of single cells and small aggregates of particles," *Biosens Bioelectron*, vol. 24, pp. 1177-83, Jan 1 2009.
- [10] W. H. Tan and S. Takeuchi, "A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 1146-51, Jan 23 2007.

- [11] A. Banaeiyan, D. Ahmadpour, C. Adiels, and M. Goksör, "Hydrodynamic cell trapping for high throughput single-cell applications," *Micromachines*, vol. 4, pp. 414-430, 2013.
- [12] S. F. Romanuik, S. M. Grist, M. Haq, B. L. Gray, N. Gulzar, J. K. Scott, *et al.*, "Microfluidic trapping of antibody-secreting cells," *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 31, pp. 121-127, 2010.
- [13] J. L. Wilson, S. Suri, A. Singh, C. A. Rivet, H. Lu, and T. C. McDevitt, "Single-cell analysis of embryoid body heterogeneity using microfluidic trapping array," *Biomed Microdevices*, vol. 16, pp. 79-90, Feb 2014.
- [14] J. Y. Park, M. Morgan, A. N. Sachs, J. Samorezov, R. Teller, Y. Shen, *et al.*, "Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation," *Microfluid Nanofluidics*, vol. 8, pp. 263-268, Feb 1 2010.
- [15] J. H. Yeon and J.-K. Park, "Microfluidic cell culture systems for cellular analysis," *BIOCHIP JOURNAL*, vol. 1, pp. 17-27, 2007.
- [16] E. W. K. Young, C. Pak, S. Miyamoto, and D. J. Beebe, "Microfluidic suspension cell culture platform for studying population heterogeneity in NF-KB signaling," *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2012.
- [17] O. Frey, F. Rudolf, G. W. Schmidt, and A. Hierlemann, "Versatile, simple-to-use microfluidic cell-culturing chip for long-term, high-resolution, time-lapse imaging," *Analytical Chemistry*, vol. 87, pp. 4144-4151, 2015.
- [18] A. Winkleman, K. L. Gudiksen, D. Ryan, G. M. Whitesides, D. Greenfield, and M. Prentiss, "A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer," *Applied Physics Letters*, vol. 85, p. 2411, 2004.
- [19] Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, and T. Yasukawa, "Cell pairing using microwell array electrodes based on dielectrophoresis," *Analytical chemistry*, vol. 86, pp. 6818-22, Jul 15 2014.
- [20] J. Chung, Y. J. Kim, and E. Yoon, "Highly-efficient single-cell capture in microfluidic array chips using differential hydrodynamic guiding structures," *Applied Physics Letters*, vol. 98, p. 123701, Mar 21 2011.

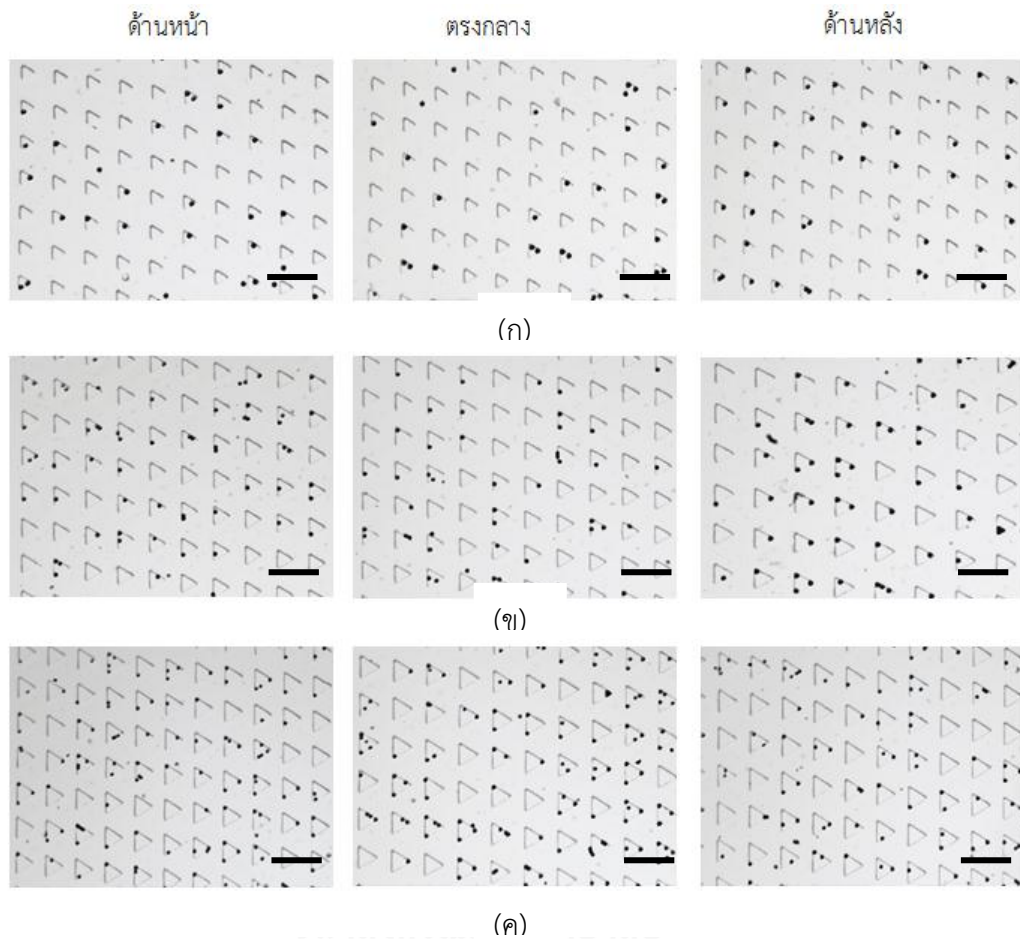
- [21] H. C. Moeller, M. K. Mian, S. Shrivastava, B. G. Chung, and A. Khademhosseini, "A microwell array system for stem cell culture," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 752-63, Feb 2008.
- [22] S. Lindstrom, K. Mori, T. Ohashi, and H. Andersson-Svahn, "A microwell array device with integrated microfluidic components for enhanced single-cell analysis," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 4166-71, Dec 2009.
- [23] N. Ferrell, D. Gallego-Perez, N. Higuera-Castro, R. T. Butler, R. K. Reen, K. J. Gooch, *et al.*, "Vacuum-assisted cell seeding in a microwell cell culture system," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 2380-6, Mar 15 2010.
- [24] Y. Wang, P. Shah, C. Phillips, C. E. Sims, and N. L. Allbritton, "Trapping cells on a stretchable microwell array for single-cell analysis," *Anal Bioanal Chem*, vol. 402, pp. 1065-72, Jan 2012.
- [25] M. Kawai, T. Nogami, K. Takano, A. Okumura, K. Nakazato, M. Ikeuchi, *et al.*, "Single-cell trapping using microwell arrays fabricated from self-assembled particle monolayers," *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, vol. 603, pp. 248-255, 2014.
- [26] K.-S. Koh, J. Chin, J. Chia, and C.-L. Chiang, "Quantitative studies on PDMS-PDMS interface bonding with piranha solution and its swelling effect," *Micromachines*, vol. 3, pp. 427-441, 2012.
- [27] D. Ketpun, "Microfluidics-based single cell isolation and characterization of the putative cancer stem cells in canine mast cell tumor," Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, 2012.



ภาคผนวก ก
 รูปภาพจากการทดลองการดักจับของอุปกรณ์

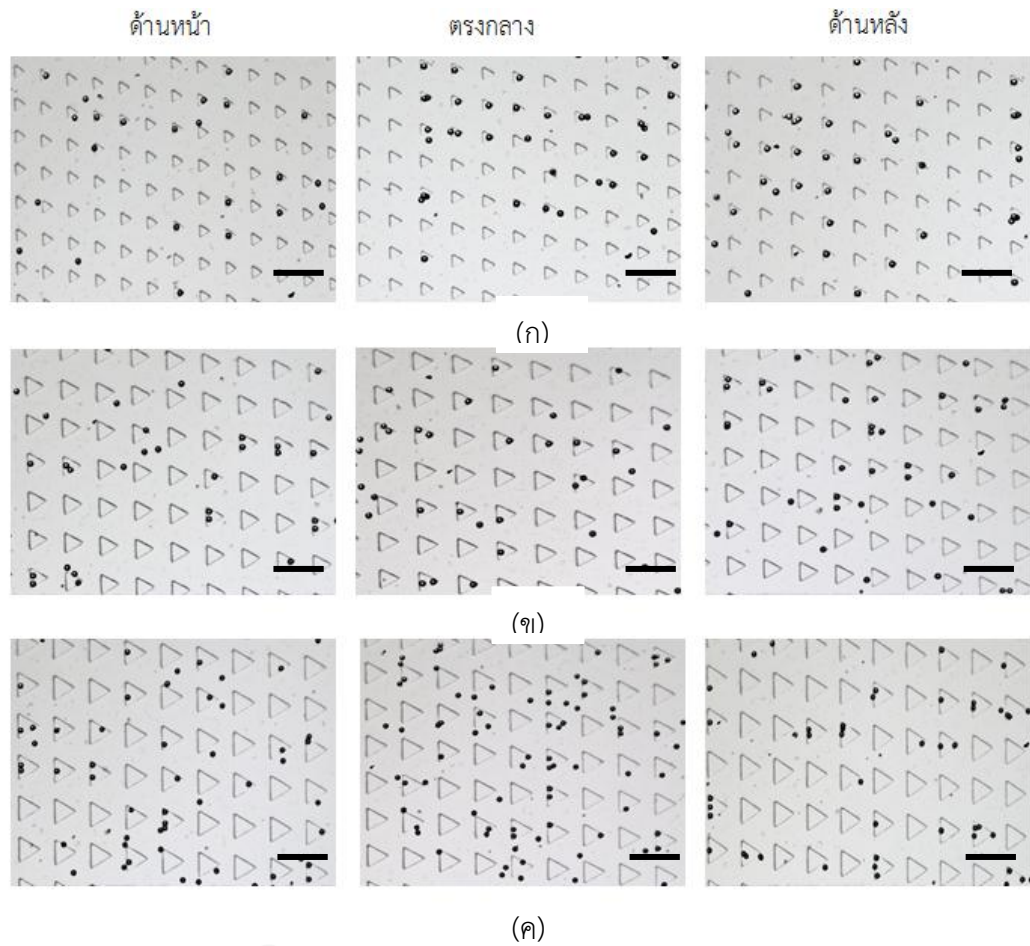


รูปภาพ ก.1 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค $5\ \mu\text{m}$ ที่ความลึกของหลุม $30\ \mu\text{m}$
 (ก) ขนาดหลุม $40\ \mu\text{m}$ (ข) ขนาดหลุม $60\ \mu\text{m}$ (ค) ขนาดหลุม $80\ \mu\text{m}$ (Scale bar $150\ \mu\text{m}$)



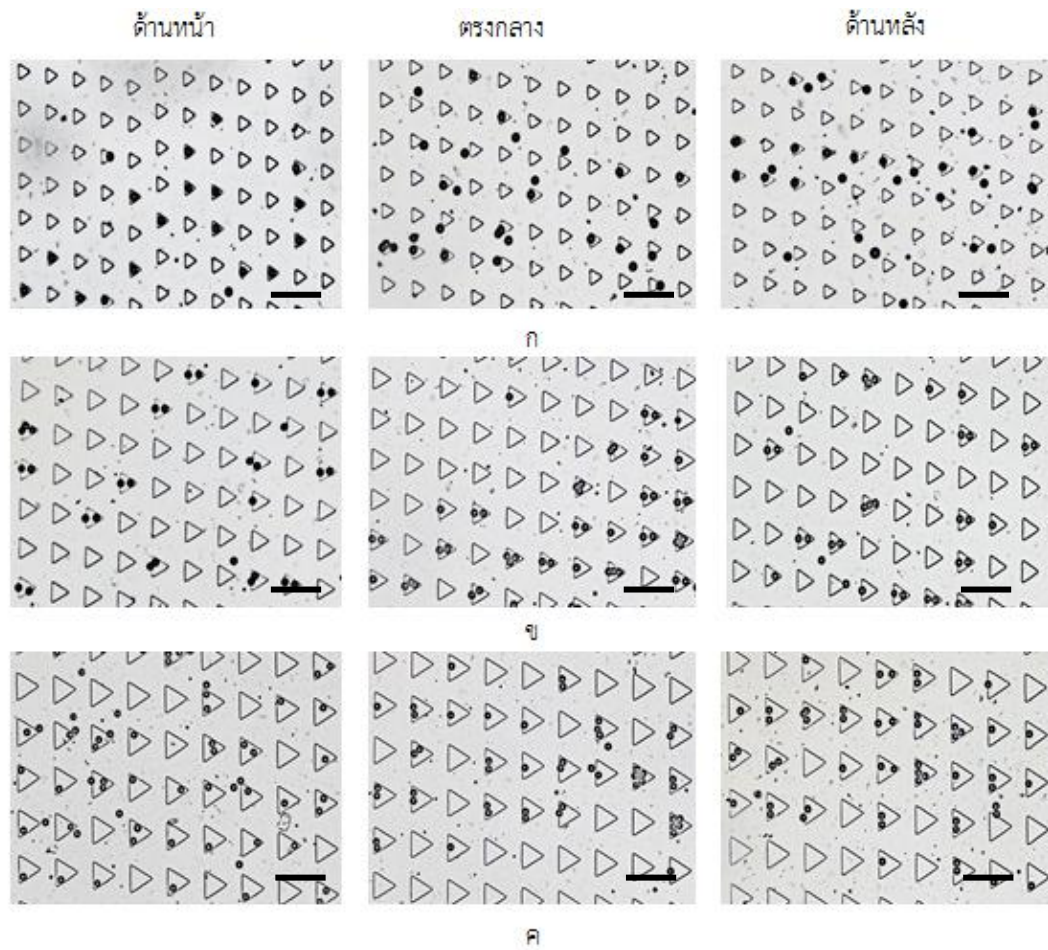
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปภาพ ก.2 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค $10\ \mu\text{m}$ ที่ความลึกของหลุม $30\ \mu\text{m}$
 (ก) ขนาดหลุม $40\ \mu\text{m}$ (ข) ขนาดหลุม $60\ \mu\text{m}$ (ค) ขนาดหลุม $80\ \mu\text{m}$ (Scale bar $150\ \mu\text{m}$)

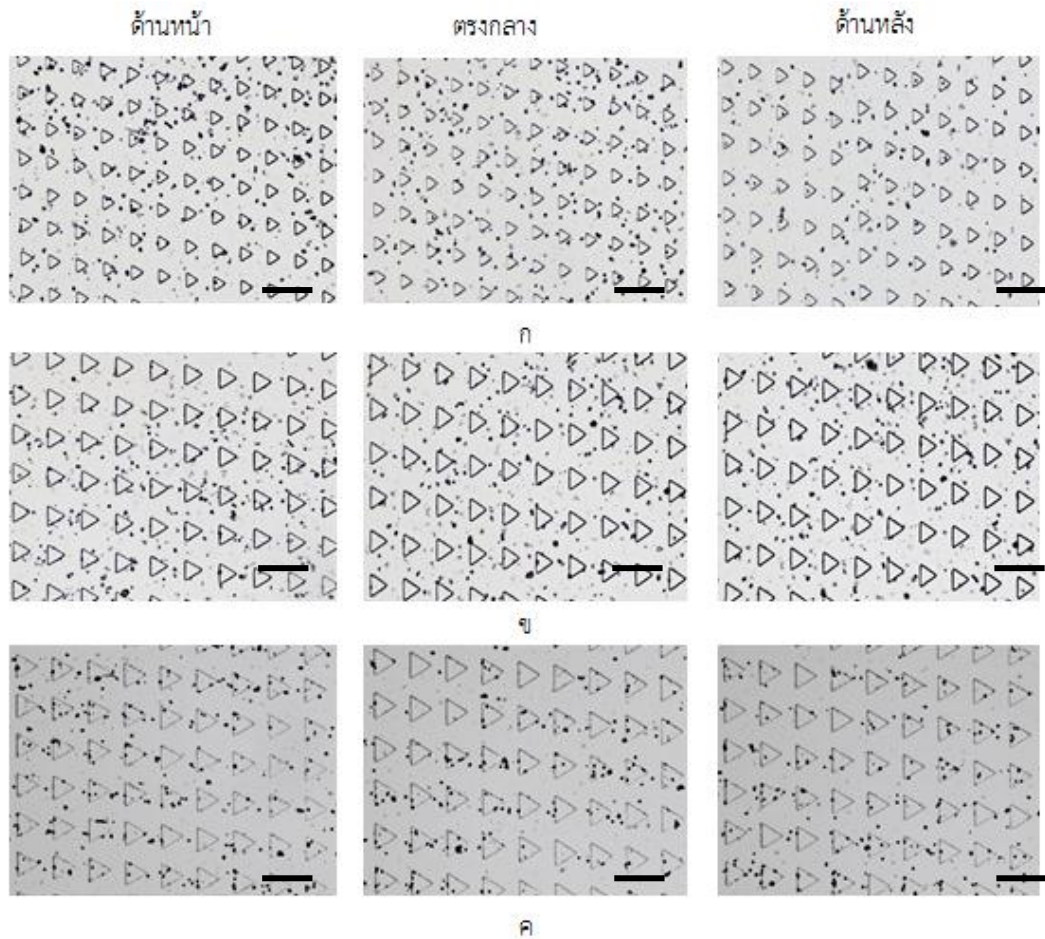


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปภาพ ก.3 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค $15\ \mu\text{m}$ ที่ความลึกของหลุม $30\ \mu\text{m}$
 (ก) ขนาดหลุม $40\ \mu\text{m}$ (ข) ขนาดหลุม $60\ \mu\text{m}$ (ค) ขนาดหลุม $80\ \mu\text{m}$ (Scale bar $150\ \mu\text{m}$)

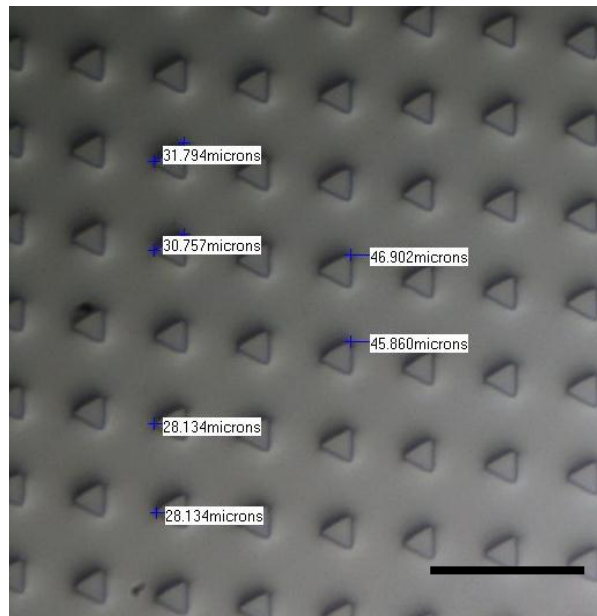


รูปภาพ ก.4 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับอนุภาค $20\ \mu\text{m}$ ที่ความลึกของหลุม $30\ \mu\text{m}$ (ก) ขนาดหลุม $40\ \mu\text{m}$ (ข) ขนาดหลุม $60\ \mu\text{m}$ (ค) ขนาดหลุม $80\ \mu\text{m}$ (Scale bar $150\ \mu\text{m}$)

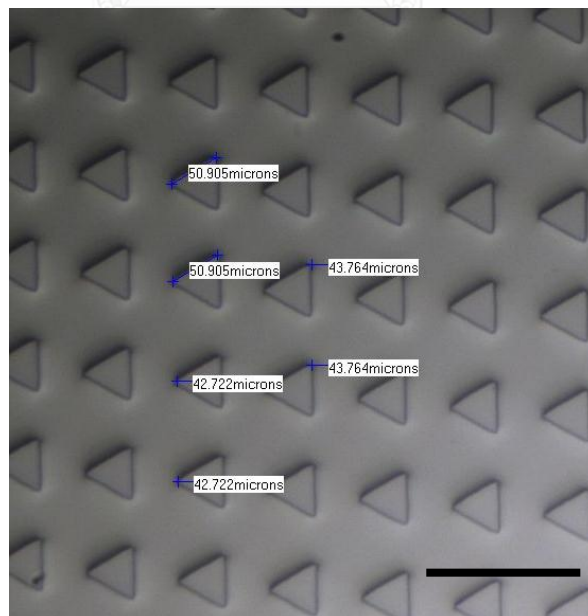


รูปภาพ ก. 5 ภาพที่ได้จากการทดลองสำหรับการดักจับเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ความลึกของหลุม 30 μm (ก) ขนาดหลุม 40 μm (ข) ขนาดหลุม 60 μm (ค) ขนาดหลุม 80 μm (Scale bar 150 μm)

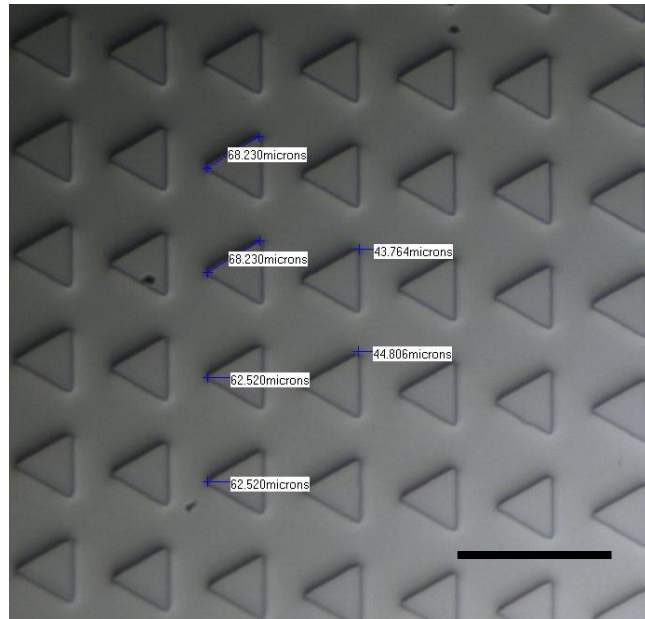
ภาคผนวก ข
ขนาดจริงของหลุมสำหรับดักจับ



รูปภาพ ข.1 ขนาดจริงของหลุมขนาด 40 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μ m)

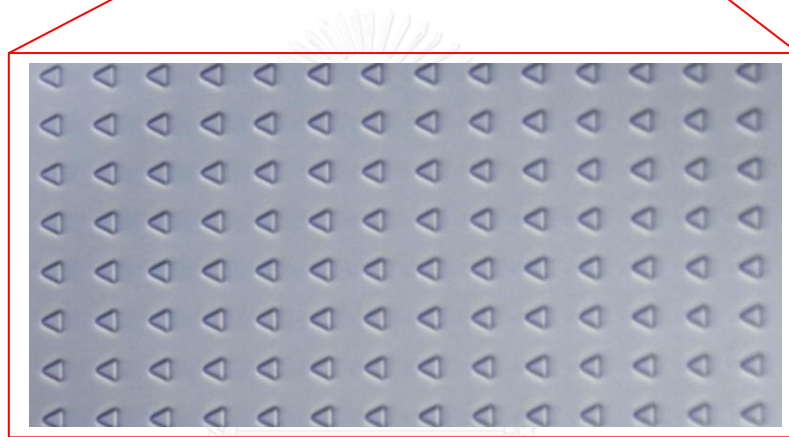
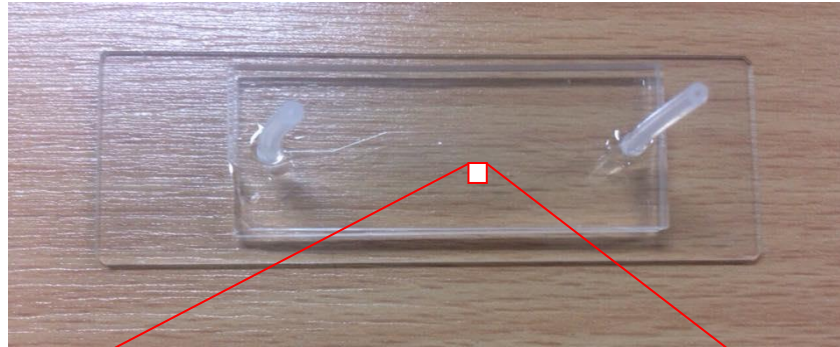


รูปภาพ ข.2 ขนาดจริงของหลุมขนาด 60 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μ m)

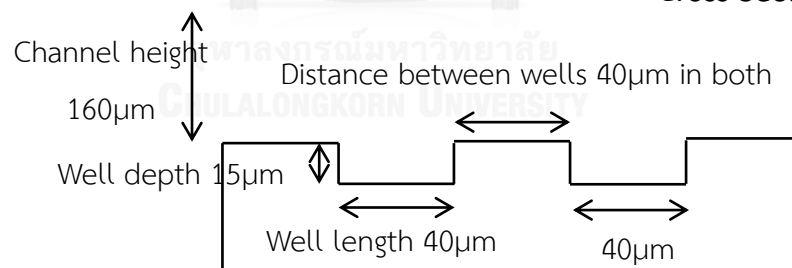


รูปภาพ ข.3 ขนาดจริงของหลุมขนาด 80 ไมโครเมตร (Scale bar 150 μm)

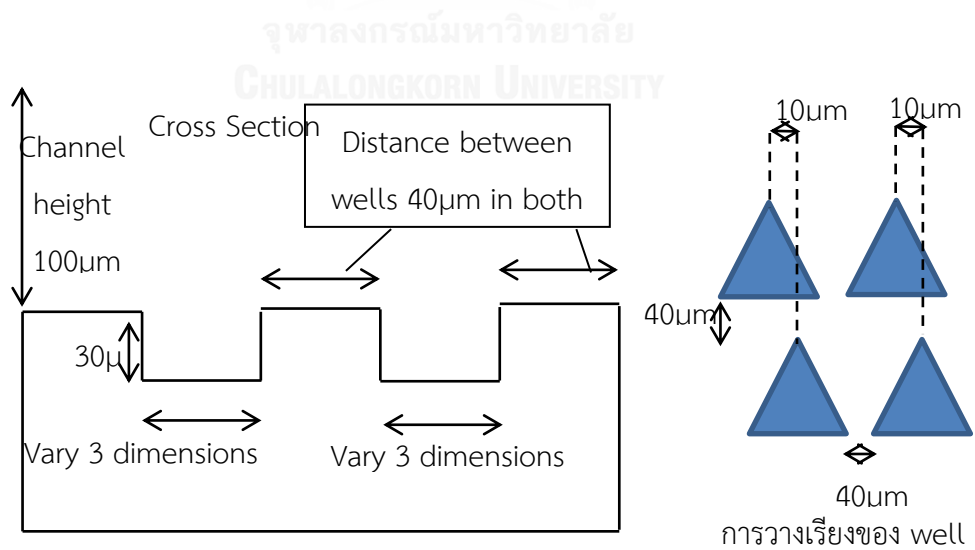
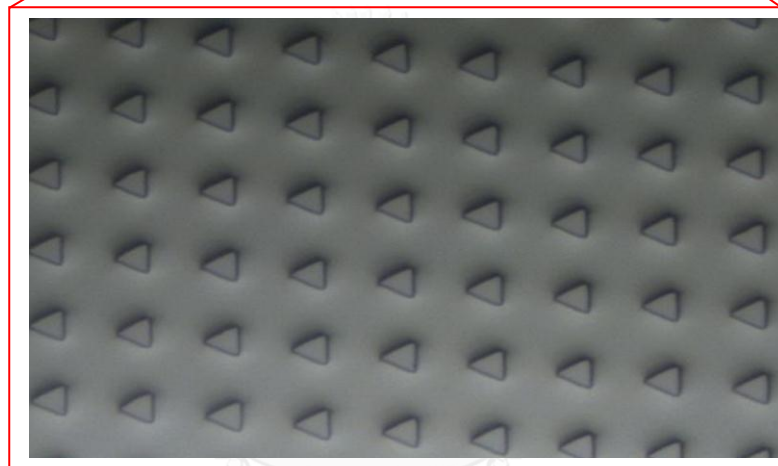
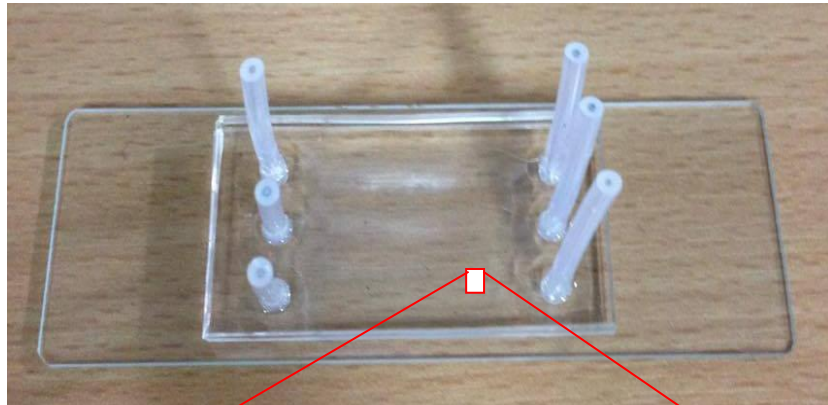
ภาคผนวก ค
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง



Cross Section



รูปภาพ ค.1 อุปกรณ์การดักจับเวอร์ชัน 1 มีความกว้าง 500 ไมโครเมตร ความยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร



รูปภาพ ค.2 อุปกรณ์การดักจับเวอร์ชัน 2 มีความกว้าง 5 มิลลิเมตร ความยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 0.07 มิลลิเมตร



รูปภาพ ค.3 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Seek



รูปภาพ ค.4 หลอดฉีดยาขนาด 10 ml และสายยาง



รูปภาพ ค.5 ปีมสำหรับสร้างอัตรการไหล รุ่น NE-1600/NE-1800



ภาคผนวก ง

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวและสารละลายอนุภาค

การเตรียมสารละลายอนุภาค

- สารทำความสะอาด

สารละลายจะประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีความบริสุทธิ์สูง (Deionized water) มาผสมกับสารลดแรงตึงผิว (Tween 20) ในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 10 ส่วน เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยลดการยึดติดเป็นกลุ่มของอนุภาคและการเกิดฟองอากาศลงได้

- สารละลายผสมเม็ดโพลีเมอร์

สารละลายจะประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการผสมสารลดแรงตึงผิวในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 10 ส่วนมาผสมกับเม็ดโพลีเมอร์ เริ่มจากนำน้ำปราศจากไอออนมาผสมกับสารละลายสีผสมอาหารเล็กน้อยใช้เป็นสีเขียวเพราะช่วยทำให้การมองเห็นอนุภาคชัดเจนยิ่งขึ้นและหลังจากนั้นนำมาผสมกับอนุภาคในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 100 ส่วน ซึ่งเม็ดโพลีเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 10 μm โดยความเข้มข้นในการทดลองจะมีค่าเท่ากับ 1.8×10^5 อนุภาคต่อมิลลิลิตร

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว

1. การสลายเม็ดเลือดแดง

เริ่มจากนำเม็ดเลือดแดง 3 มิลลิลิตรมาผสมกับสารละลาย lysing จำนวน 45 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:15) หลังจากนั้นเขย่าให้ผสมกันเป็นเวลา 5 นาทีและนำไปใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ทำการเทน้ำที่ลอยเหนือตะกอนออกและล้างด้วยสารละลาย PBS 50 มิลลิลิตรอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่เงื่อนไขเดิม

2. การคงสภาพของเซลล์ (Fixation)

เตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการคงสภาพเซลล์โดยส่วนผสมคือ 10% Neutral Formalin ผสมกับ Absolute Methanol และ PBS (อัตราส่วน 2:2:1) ในปริมาณ 20 มิลลิลิตร เมื่อผสมแล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ครบเวลาแล้วเทน้ำออก ต่อมานำมาล้างด้วย PBS 20 มิลลิลิตรอีกครั้ง และนำเข้าเครื่องปั่นเป็นขั้นตอนสุดท้าย

3. การย้อมสีของเซลล์เม็ดเลือดขาว

หลังจากเตรียมเซลล์แล้วนำมาเติมด้วยสาร Eosin 3 มิลลิลิตร ทำการเขย่า 30 นาทีและนำไปเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทน้ำออกเหลือตะกอนไว้และนำไปล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาทีและนำไปเข้าเครื่องปั่นที่เงื่อนไขเดิมอีกครั้ง ขั้นต่อไปนำไปเติมสี Methylene Blue จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าประมาณ 15 นาที และเติมด้วยสารละลาย PBS จำนวน 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนเมื่อได้ตะกอนที่ได้จากการปั่นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

**ข้อแนะนำในการนำเซลล์มาใช้คือต้องนำมาผสมกับสารละลาย PBS ในจำนวน 5-10 มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเทวีญ ตงมณี เกิดเมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ.2533 ที่จังหวัดสมุทรสาคร เป็นบุตรชายคนโตของนายสุเทพ ตงมณี และนางอัมพร ตงมณี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา 2555 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

